

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



“EVALUACIÓN DE LA APLICACIÓN DE ESTIÉRCOL ANIMAL EN RELACIÓN A LA PRESENCIA, DISPONIBILIDAD Y BIODISPONIBILIDAD DE ESTRONA (E1), 17 β -ESTRADIOL (E2) Y 17 α -ETINILESTRADIOL (EE2) EN SUELOS DEGRADADOS”

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Química área de Especialización en Química Ambiental y Memoria para optar al Título de Químico por:

CATALINA DEL CARMEN URIBE LAPLECHADE

Directores de Tesis: Mg. Q. Inés Ahumada Torres.

Dra. Loreto Ascar Estay.

Santiago, Chile

Enero 2018

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata

CATALINA DEL CARMEN URIBE LAPLECHADE

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química, Área de Especialización: Química Ambiental y Título de Química, en el examen público rendido el día

Directoras de Tesis:

Mg. Q. Inés Ahumada T. _____

Dra. Loreto Ascar E. _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Edwar Fuentes P. (Presidente) _____

Dra. Tatiana Garrido R. _____

Mg. Sylvia Copaja C. _____

Dedicada a la mujer que hizo que esto fuese realidad:
Gloria Laplechade P.

“Soy de las que piensa que la ciencia tiene una gran belleza,
un científico en su laboratorio no es solo un técnico, también
es un niño colocado ante fenómenos naturales que le
impresionan como un cuento de hadas”.

Marie Curie.

“El verdadero signo de la inteligencia no es el conocimiento,
sino la imaginación”

Albert Einstein.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar y sin dudar un segundo, tengo que agradecer a la persona más importante de mi vida, a la que hizo que todo esto fuera posible, la que me apoyó, me acompañó y estuvo conmigo de forma incondicional, mi mamá. Mil gracias por todo y cada uno de los momentos vividos, gracias por tu trabajo, tu esfuerzo y sacrificios, por levantarme cada vez que caí y por confiar siempre en mí. Este trabajo no es solo mi esfuerzo, es el tuyo también, y aunque no puedas estar físicamente acá, sé que en algún lugar estás mirando y te sentirás feliz por este logro, espero que te sientas orgullosa de lo que ambas hemos logrado, porque nadie más tú, me podría entender en este momento. No existen palabras para agradecer todo lo que hiciste, porque nuestra historia no fue fácil, y tú mejor que nadie supiste salir adelante con la frente en alto, si de algo estoy orgullosa hoy, es de haber tenido una mamá como tú, que no solo me enseñó a estudiar y conocer el mundo, si no que existen cosas mucho más importante en la vida, como aprender a ser feliz y valorar a las personas que tienes al lado. Podría escribir planas y planas de agradecimientos para mi mamá, pero un recuerdo o una vivencia valen más que mil palabras, solo decir que te amo mucho y cada día que pasa te recuerdo y extraño.

Quiero agradecer de forma especial a Emilio, mi pololo, el que me ha acompañado todos estos años, que ha estado desde el inicio de este proceso universitario conmigo, que ha sido mi apoyo incondicional y mi principal soporte. Muchísimas gracias por estar conmigo en todas, sobre todo en los momentos más difíciles de mi vida, por apoyarme cuando sentía que no podía más, y por ayudarme a parar cuando caí, nada de esto hubiese sido igual sin ti, agradezco a la vida que te haya puesto en mi camino. Te amo. Gracias también por los miles de momentos alegres y locos que hemos tenido, esta es solo una de muchas etapas que nos quedan por pasar juntos.

Agradecer a mi familia, sin el apoyo de ellos todo hubiese sido mucho más difícil, Tata, Fufi, Pancho y en especial a la Nané que siempre se ha portado súper bien conmigo y me ha apoyado en todo y a Carla, que aunque seamos primas, sin duda

es la mejor hermana que podría tener. Gracias por acompañarme, preocuparse y hacerme olvidar todo el estrés o preocupaciones, sobre todo a mi Fu. Los quiero. También dar las gracias a mi tío Dante y mi tío Mauricio, que siempre han estado conmigo, por apoyarme en todo aspecto, y por toda la preocupación.

No puedo dejar de agradecer a la familia de mi pololo, son todos un siete, encontré una segunda familia con personas maravillosas y de buenos sentimientos. Gracias por todo el apoyo durante este tiempo.

Agradezco a Dios y a la vida por haberme puesto en este camino, en esta carrera y así haber podido cumplir metas, y alcanzar distintos logros en todo ámbito de la vida.

La universidad no solo nos entrega conocimientos y un título al final de camino, hay cosas que uno gana durante este período que valen mucho más, como los amigos que se hacen y que pueden durar para toda la vida. Imposible no agradecer a la mejor amiga que me pudo dar la universidad, la mejor compañera, la más apañadora y la más maravillosa, Vale, sé que no solo encontré una amiga seca e incondicional, eres de esas amiga que duran toda la vida y pasan a ser parte de tu familia, te quiero un montón, y esto solo comienza para nosotras, gracias por compartir esta experiencia juntas, que aunque se sufrió, también se pasó excelente, fuiste una de las mejores cosas que me pasaron en la universidad.

A mi amiga de la vida, muchos años juntas, Gaby, gracias por estar siempre, por preocuparte y hacerte parte de mi vida, mis problemas y alegrías, eres de esas personas que jamás uno puede dejar, que siempre dejan una huella, se viene miles de cosas más, y estoy segurísima que estaremos en todas juntas. Love you.

A los amigos y compañeros que conocí en la facultad, Dani, Ahirton, Elias, Maty, Leo, Chi, Ale, Egao, a Mariam, que si bien nos separamos en el camino universitario, la vida nos sigue juntando, gracias por apañarme sobre todo al principio, y en forma especial a Naty, mil gracias no solo por toda la ayuda que nos diste, si no por lo buena persona y amiga que eres.

A cada una de las personas del laboratorio de química ambiental, en donde trabajé estos dos últimos años, Vanti, Mercedes, Dani, Inma, Francia, Jeannette, Cristi, Profesor Pablo, gracias por toda la buena onda y el apoyo brindado, me encantó ser parte de este grupo de investigación. Y agradecer de forma especial a Luis que más que compañero de laboratorio, se convirtió en un amigo de la vida, otra de las cosas buenas que me dejó la universidad. También agradecer a Betsabet, gracias por todo, por ayudarme a partir y darme el empujón que necesitaba, la paciencia y disponibilidad que tuviste, mil gracias por toda la ayuda. Sin olvidar a Alejandro, que sin duda aprendí a conocerte y ya eres parte de mis amigos.

Por supuesto a mis profesoras guías Profesora Inés y Profesora Loreto gracias a cada una de ustedes por toda la ayuda, la paciencia, y la buena onda entregada día a día en todo este tiempo, me alegra mucho haberlas conocido y haber podido trabajar con ustedes, son excelentes profesoras y mejores personas aún.

Al tío Julito de la biblioteca, lejos el mejor funcionario que tiene la facultad, gracias por toda la buena vibra que siempre nos entregó.

Agradecer a mi otro lado universitario, el lado deportivo que me acompañó desde mis inicios, gracias a cada una de las personas de la rama de natación de la facultad de química, son lo máximo y los más jugados, por supuesto destacar al profesor Alfredo Grassau, que más que profesor fue un guía, un compañero, mil gracias profe por todo, por la buena onda, las miles de conversaciones que tuvimos, por la preocupación y por estar siempre ahí.

Agradezco a cada uno de los miembros de la comisión Profesor Edwar Fuentes, profesora Sylvia Copaja y en especial a la Profesora Tatiana Garrido, que fue un apoyo importante en momentos difíciles de la carrera, gracias a todos por su buena disposición y ayuda en esta etapa final de universidad.

Finalmente agradezco al proyecto FONDECYT 1150502, por el financiamiento para desarrollar este trabajo de tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Índice de Tablas	xi
Índice de Figuras	xiii
Resumen	xvi
Summary	xviii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. HIPÓTESIS	14
III. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo general	15
3.2 Objetivos específicos	15
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	16
4.1 Reactivos	16
4.2 Estándares	17
4.3 Materiales	17
4.4 Semillas	18
4.5 Instrumentos y equipos	18
4.6 Condiciones del cromatógrafo GC-MS	19
4.7 Identificación mediante GC-MS	19
4.8 Caracterización química y física de muestras de estiércol y suelos	20
4.8.1 Determinación del pH	20
4.8.2 Determinación de la humedad	21
4.8.3 Determinación de la conductividad	21
4.8.4 Determinación de la capacidad de intercambio catiónico (CIC)	22
4.8.5 Determinación de carbono orgánico (CO) y materia orgánica (MO).	23
4.8.6 Determinación de la textura de los suelos.	24
4.8.7 Determinación del nitrógeno total mediante digestión Kjeldalh.	26
4.8.8 Determinación de metales pesados.	27
4.9 Determinación de la concentración de hormonas E1, E2 y EE2 en estiércol de vacuno, caballo y cerdo.	27

4.9.1 Extracción de analitos.	27
4.9.2 Purificación de extractos.	28
4.9.3 Derivatización.	28
4.10 Determinación de la fracción biodisponible de E1, E2 y EE2 en plantas de trigo, cultivadas en suelos enmendados con estiércol.	29
4.11 Estimación de la fracción biodisponible mediante la extracción de las hormonas con ciclodextrina.	31
4.12 Estudio del tiempo de degradación de E1, E2 y EE2 en suelos tratados con estiércol.	32
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
5.1 Identificación mediante GC-MS.	34
5.2 Parámetros analíticos.	35
5.2.1 Parámetros instrumentales.	35
5.2.2 Parámetros de calidad analítica para la determinación de las hormonas en estiércol, suelos y plantas. Metodología 1.	36
5.2.3 Parámetros de calidad analítica para la extracción de las hormonas con ciclodextrina en suelos. Metodología 2.	37
5.3 Caracterización química y física de los estiércoles y los suelos	39
5.4 Determinación de la concentración de hormonas E1, E2 y EE2 en estiércol de vacuno, caballo y cerdo.	41
5.5 Determinación de la fracción biodisponible de E1, E2 y EE2 en plantas de trigo, cultivadas en suelos enmendados con estiércol.	41
5.6 Determinación del factor de bioacumulación de E1, E2 y EE2 en plantas de trigo.	44
5.7 Determinación de la biomasa en las plantas de trigo.	47
5.8 Estimación de la fracción biodisponible mediante la extracción de las hormonas con un método biosimulador con ciclodextrina.	48
5.9 Determinación del factor de bioacumulación de E1, E2 y EE2 en HPCD.	52
5.10 Validación del método biosimulador con ciclodextrina, con respecto a la concentración de las hormonas en plantas de trigo.	53
5.11 Correlación lineal entre los factores de bioconcentración de HPCD y las raíces de las plantas de trigo.	56

5.12 Estudio de tiempo de degradación de E1, E2 y EE2 en suelos tratados con estiércol y suelos no tratados.	57
VI. CONCLUSIONES.	64
VII. REFERENCIAS.	67
VIII. ANEXOS.	73

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Contenido de nitrógeno, fósforo y potasio en diversos tipos de estiércoles.
- Tabla 2.** Concentraciones máximas de metales en suelos receptores de enmiendas.
- Tabla 3.** Propiedades fisicoquímicas de las hormonas estrogénicas E1, E2 y EE2.
- Tabla 4.** Masa de estiércol agregada a 500 g de suelo en dosis de 90 Mgha⁻¹.
- Tabla 5.** Estiércol agregado a cada suelo para obtener una concentración de 90 Mgha⁻¹.
- Tabla 6.** Fragmentos cuantificador y cualificador de E1, E2 y EE2.
- Tabla 7.** Parámetros de las curva de calibración para E1, E2 y EE2.
- Tabla 8.** Límites de cuantificación y detección, desviación estándar y coeficiente de variación instrumentales para las hormonas E1, E2 y EE2.
- Tabla 9.** Parámetros de la curva de calibración con matriz para E1, E2 y EE2 en metodología 1.
- Tabla 10.** Límites de cuantificación y detección, desviación estándar, coeficiente de variación y recuperación de la metodología 1 para las hormonas E1, E2 y EE2.
- Tabla 11.** Parámetros de la curva de calibración con matriz para E1, E2 y EE2 en metodología 2.
- Tabla 12.** Límites de cuantificación y detección, desviación estándar, coeficiente de variación y recuperación de la metodología 2 para las hormonas E1, E2 y EE2.
- Tabla 13.** Características fisicoquímicas de suelos, Codigua, Melipilla y Pomaire.
- Tabla 14.** Concentración de metales en suelos Codigua, Melipilla y Pomaire.
- Tabla 15.** Propiedades fisicoquímicas de los estiércoles de caballo, cerdo y vacuno.

- Tabla 16. Concentración de E1, E2 y EE2 en estiércoles de caballo, vacuno y cerdo.**
- Tabla 17. Valores de p-value para la correlación simple entre las hormonas E1, E2 y EE2 y las características de los suelos.**
- Tabla 18. Factor de bioconcentración en raíces cultivadas en suelos Codigua, Melipilla y Pomaire.**
- Tabla 19. Biomasa en raíces y hojas de las plantas de trigo cultivadas en suelos Codigua, Melipilla y Pomaire.**
- Tabla 20. Factor de bioconcentración de las hormonas E1, E2 y EE2 determinado por extracción con HPCD.**
- Tabla 21. Correlación del método de extracción biosimulador y las plantas de trigo en suelos Codigua, Melipilla y Pomaire.**
- Tabla 22. Correlación lineal de los factores de bioacumulación entre la HPCD y las plantas de trigo en suelos Codigua, Melipilla y Pomaire.**
- Tabla 23. Concentración de E1, E2 y EE2 en raíces de trigo cultivadas en suelo Codigua, Melipilla y Pomaire.**
- Tabla 24. Concentración de hormonas extraídas con HPCD en los tres suelos.**
- Tabla 25. ANOVA multifactor (test de intervalo múltiple) para plantas de trigo cultivadas en tres sistemas de suelos.**

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura molecular de la Estrona (E1).
- Figura 2.** Estructura molecular del 17 β -estradiol (E2).
- Figura 3.** Estructura molecular 17 α -etinilestradiol (EE2).
- Figura 4.** Representación de la estructura de concavidad de la ciclodextrina.
- Figura 5.** Estructura de α , β , y γ -ciclodextrina, sus respectivas medidas de diámetro y altura.
- Figura 6.** Representación de una ciclodextrina indicando las regiones hidrofóbica (interior) e hidrofílica (exterior).
- Figura 7.** Rampa de temperatura del horno del cromatógrafo de gases.
- Figura 8.** Triángulo para determinar texturas de suelos.
- Figura 9.** Instrumentos para realizar medición de nitrógeno total. 1. Digestor. 2. Destilador. 3. Titulación.
- Figura 10.** Sistema Manifold para etapa de clean up.
- Figura 11.** Rotavapor para homogeneizar las muestras de estiércol enriquecidos con las hormonas E1, E2 y EE2.
- Figura 12.** Elementos necesarios para el cultivo de plantas de trigo. 1. Malla Raschel, 2. Cuarzo, 3. Suelos incubado, 4. Maceta plástica de 500 cc y 5. Sistema completo armado.
- Figura 13.** Cultivo de plantas de trigo.
- Figura 14.** Muestras de suelos y suelos-estiércol para estudios de degradación.
- Figura 15.** Cromatograma SIM para estándar interno PCB y hormonas E1, E2 y EE2 derivatizadas con piridina y MSTFA a 80°C.
- Figura 16.** Estructura química de fase sorbente Oasis HLB.

- Figura 17.** Concentración de hormonas en las raíces de las plantas, cultivadas en los tres suelos con estiércol enriquecido.
- Figura 18.** Biomosas en raíces y hojas de plantas de trigo cultivadas en suelos Codigua, Melipilla y Pomaire.
- Figura 19.** Estructura de β -ciclodextrina y hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD).
- Figura 20.** Extracción de hormonas E1, E2 y EE2 con HPCD en los tres suelos con estiércol enriquecido.
- Figura 21.** Concentración de E1 extraída con la raíz de la planta de trigo y con HPCD en los tres suelos.
- Figura 22.** Concentración de E2 extraída con la raíz de la planta de trigo y con HPCD en los tres suelos.
- Figura 23.** Concentración de EE2 extraída con la raíz de la planta de trigo y con HPCD en los tres suelos.
- Figura 24.** Curva de degradación 1^{er} estudio en suelo Codigua para E1, E2 y EE2.
- Figura 25.** Curva de degradación 1^{er} estudio en suelo Melipilla para E1, E2 y EE2.
- Figura 26.** Curva de degradación 1^{er} estudio en suelo Pomaire para E1, E2 y EE2.
- Figura 27.** Curva de degradación 1^{er} estudio en suelo Codigua + Estiércol para E1, E2 y EE2.
- Figura 28.** Curva de degradación 1^{er} estudio en suelo Melipilla + Estiércol para E1, E2 y EE2.
- Figura 29.** Curva de degradación 1^{er} estudio en suelo Pomaire + Estiércol para E1, E2 y EE2.
- Figura 30.** Curva de degradación 2^o estudio en suelo Codigua para E1, E2 y EE2.
- Figura 31.** Curva de degradación 2^o estudio en suelo Melipilla para E1, E2 y EE2.
- Figura 32.** Curva de degradación 2^o estudio en suelo Pomaire para E1, E2 y EE2.

Figura 33. Curva de degradación 2° estudio en suelo Codigua + Estiércol para E1, E2 y EE2.

Figura 34. Curva de degradación 2° estudio en suelo Melipilla + Estiércol para E1, E2 y EE2.

Figura 35. Curva de degradación 2° estudio en suelo Pomaire + Estiércol para E1, E2 y EE2.

Figura 36. Degradación de Estradiol (E2) a Estrona (E1).

RESUMEN

Con el objeto de buscar alternativas de producción más amigables con el medio ambiente, y evitar el deterioro de los ecosistemas, la producción silvoagropecuaria ha generado opciones sustentables y ecológicas como la agricultura orgánica, la cual conserva o aumenta la materia orgánica del suelo reciclando los residuos de cosecha, poda, estiércol y guano de animales, a través de distintos sistemas de incorporación al suelo. Según la Ley 20.089, el estiércol corresponde a fecas, orinas y productos de cama de animales, que no han sido compostado. El guano y la orina de los animales contienen cantidades importantes de nitrógeno, fósforo, potasio y otros elementos necesarios para el crecimiento de las plantas. La combinación de estiércol, paja de cereales y restos hortícolas es una mezcla de alta calidad como abono para el suelo. La composición de los guanos es muy variable y generalmente depende de la dieta que se le suministra al animal. La legislación chilena señala que la carga ganadera establecida se debe fijar considerando que no se debe sobrepasar el límite de 170 kg de nitrógeno·ha⁻¹·año⁻¹.

Por otro lado, la ganadería intensiva crea problemas de depósito de estiércol y contaminación de agua. En este tipo de ganadería de producción intensiva el uso de fármacos u otros insumos es una práctica habitual que tiene como objetivos, aumentar la eficiencia en la engorda de los animales y la producción de leche. Uno de los problemas que puede provocar este hecho, es el aumento de la concentración de algunos contaminantes emergentes como lo son las hormonas estrogénicas naturales y sintéticas, por ejemplo, la estrona (E1), el 17β-estradiol (E2) y el 17α-etinilestradiol (EE2), que están consideradas disruptores endocrinos, y aunque se encuentren en muy bajas concentraciones, pueden provocar serios daños en animales y en seres humanos.

Por esto, el objetivo de este trabajo fue evaluar la biodisponibilidad de dos hormonas naturales (E1 y E2) y una hormona sintética (EE2) en suelos restaurados

con estiércol, empleando plantas de trigo como indicadores y compararlas con una extracción mediante hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD).

Para esto se evaluó la concentración de los tres analitos (E1, E2 y EE2) en estiércol de vacuno, cerdo y caballo, realizando una extracción asistida con ultrasonido, seguido de una etapa de clean up, derivatización y cuantificación en un cromatógrafo de gases acoplado a espectrometría de masas. También se realizó una caracterización física y química de los tres tipos de suelos y los distintos estiércoles, se determinó la fracción biodisponible en plantas de trigo cultivadas en suelos enmendados con estiércol y se estimó la concentración biodisponible mediante la extracción de las hormonas con ciclodextrina, para así validar este método como biosimulador a través de la comparación con los resultados obtenidos en el bioensayo con plantas de trigo. Finalmente, se realizó un estudio de degradación de las tres hormonas estrogénicas, aplicadas directamente a los suelos o agregadas a través del estiércol enriquecido con éstas, en dos periodos de tiempo, el primero durante treinta días y el segundo en siete días.

Las hormonas naturales E1 y E2 se encontraron en los tres estiércoles, mientras que solo en el estiércol de cerdo se encontró la hormona sintética EE2. Los tres analitos se encontraron biodisponibles en las raíces de las plantas de trigo, siendo la EE2 en el suelo Codigua la que presentó mayor biodisponibilidad, el bioensayo con ciclodextrina correlacionó con la fracción biodisponible en las plantas de trigo, por lo tanto, el método biosimulador serviría como sistema predictivo en los tres suelos utilizados. Finalmente, el tiempo de degradación de las hormonas fue en general rápido, las tres hormonas se degradaron en su mayoría dentro de los dos primeros días, siendo la EE2 la más estable y la E2 la menos estable, ya que posiblemente ocurriría su degradación por oxidación a E1, por lo tanto, la concentración de E1 en las primeras horas tendería a aumentar.

SUMMARY

Intending to find environmentally production alternatives and avoid ecosystem damage, is that agro forestry production has generated sustainable and ecological alternatives as organic agriculture, which preserves or increases organic material from the ground by recycling harvest, pruning, manure and animal guano remains, all these through different ground incorporation systems. According to law no. 20.089, manure is composed by non composted feces, urine and animal bed products. Guano and urine from animals contains a significant amount of nitrogen, phosphor, potassium and some other elements needed for plants growth. The mixture made of manure, cereal straw and horticultural remains is a high quality fertilizer for the soil. Different guano compositions is very variable y generally depends on the animal diet. Current legislation points that established livestock load must be determinated considering not exceeding 170 kilograms limit of nitrogen·ha⁻¹·year⁻¹.

On the other hand, intensive animal breeding creates manure deposit and water pollution problems. In this type of intensive animal breeding production, it is usual practice the use of drugs and other supplies that look for increase efficiency on animal fattening and milk production. One of the problems that this fact could cause is the increase on some emerging pollutants concentration as natural and synthetic estrogen hormones, like estrone (E1), 17 β -estradiol (E2) y 17 β -ethinylestradiol (EE2), which are considered as endocrine disruptors, that although are found on low concentration, can cause serious damage both in animals and in humans.

Therefore, the main objective of this work was to evaluate the effect of the application of manure on soils and determine the bioavailable fraction of two natural hormones (E1 and E2) and a synthetic hormone (EE2) in wheat plants grown in the soils restored with manure, comparing the results with a bioassay using hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HPCD) as an extractant.

For this, the concentration of the three analytes (E1, E2 and EE2) in cow, pig and horse manure was evaluated, performing an assisted extraction with ultrasound, then a clean up, derivatization and measuring were made by in a coupled gas chromatograph to mass spectroscopy. A physical and chemical characterization of the three types of soils and the different manure was also carried out, the bioavailable fraction in wheat plants cultivated in soils amended with manure was determined and the bioavailable concentration was estimated by extracting the hormones with cyclodextrin, to validate this method as a biosimulator through the comparison with the results obtained in the bioassay with wheat plants. Finally, a study of degradation of the three estrogenic hormones, applied directly in the soil or added through the manure enriched with these, in two periods of time, the first during a month and the second for seven days.

The natural hormones E1 and E2 were found in the three manures, and only synthetic mannitol EE2 was found in pig manure. The three analytes were found bioavailable in the roots of wheat plants with EE2 in Codigua soil having the highest bioavailability, the bioassay with cyclodextrin correlated with the bioavailable fraction in wheat plants, validating the biosimulator method as a predictive method, and finally, the time of degradation of hormones is generally fast, the three hormones are degraded mostly within the first two days, EE2 being the most stable and E2 the least stable, may because of this is degraded by oxidation to E1, therefore the concentration of E1 in the first hours tends to increase.

I. INTRODUCCIÓN

Desde hace varios años se sabe que la producción agrícola impacta directa e indirectamente sobre el medio ambiente. Estos impactos tienen cada vez mayor relevancia a nivel mundial, lo que se ve reflejado en los requisitos y estándares de importación que exigen los principales mercados de destino de los diversos productos. En nuestro país, que es eminentemente exportador, se ha tenido que considerar sistemas productivos más cuidadosos desde el punto de vista ambiental para lograr subsanar estos requerimientos más exigentes. La alimentación sana y de calidad es otro factor que se considera importante al momento de cumplir con las exigencias del mercado tanto internacional como nacional.

Los crecientes niveles de deterioro de los ecosistemas han obligado a la sociedad a buscar alternativas de producción más amigables con el medioambiente. La producción silvoagropecuaria, no ajena a este problema global, ha generado alternativas sustentables y ecológicas, destacando la agricultura orgánica con un creciente desarrollo, tanto en el ámbito nacional como mundial. Algunas de las principales funciones de la agricultura orgánica son favorecer la fertilidad del suelo, desde el punto de vista químico, físico y biológico, y conservar o aumentar la materia orgánica del suelo, lo cual se puede lograr reciclando los restos de cosecha, poda, estiércol y guano de animales por medio de diversos sistemas para así incorporarlos al suelo, como por ejemplo; el Compost, Bokashi, Humus de lombriz, Supermagro, Té de compost, Té de guano – humus y Bokashi, Biofertilizante líquido y Biol, logrando así eliminar el uso de insumos de origen químico sintético que dañen el medio ambiente o afecten la salud humana (SAG, 2013).

Desde el punto de vista económico, este sistema de producción, presenta como principales ventajas; un menor costo del manejo productivo, logrando una mayor rentabilidad, el valor del predio aumenta en la medida que se van mejorando y recuperando sus recursos naturales. En general la Agricultura Orgánica favorece el desarrollo de los agroecosistemas, lo cual implica una serie de ventajas medioambientales, tales como, el aumento de la biodiversidad que le da estabilidad al sistema, el equilibrio de los distintos elementos que los componen, el uso eficiente

de los recursos, la mantención de la fauna y flora, el estímulo al reciclaje, la protección de las aguas subterráneas, entre los más importantes (SAG, 2013).

Según la Ley 20.089, el estiércol corresponde a fecas, orinas y productos de cama de animales, que no han sido compostados. Por otra parte, el estiércol compostado, lo define como productos constituidos mediante la mezcla de excrementos de animales y de materia vegetal (cama) (Ministerio de Agricultura, 2016). Una forma para hacer una cama es agregar paja, otros restos de cosechas o malezas secas en el corral de los animales. De esta manera, los animales estarán en mejores condiciones (especialmente con menos barro y humedad en invierno) y se podrá aprovechar no sólo el guano, sino también la orina que se va mezclando con la paja. El estiércol se utiliza para aportar materia orgánica a los suelos que contengan bajo porcentaje de ésta, el aporte de materia orgánica supone una mejora en la estructura de los suelos degradados, así como la mejora en la retención de agua (Iglesias, 1995).

El guano y la orina de los animales contienen cantidades importantes de nitrógeno, fósforo, potasio y otros elementos que necesarios para el crecimiento y desarrollo de las plantas. La composición de los guanos es muy variable y generalmente depende de la dieta que se suministre al animal. Se ha estudiado que más del 75% de los minerales que consumen los animales en pastoreo vuelve al suelo. (Tabla 1).

El estiércol que más se utiliza para hacer este tipo de abonos proviene de vacunos, ovejas, cerdos, aves de corral, conejos, cabras y caballos. Este último es uno de los que mayor aporte de nutrientes hace a los suelos teniendo un alto contenido de nitrógeno ($17 \text{ kg}\cdot\text{ton}^{-1}$) (M^a Romera, 2017).

Tabla 1. Contenido de nitrógeno, fósforo y potasio en diversos tipos de estiércoles. (García A., 1987).

Estiércol	Contenido de nutrientes en estiércoles [kg·t ⁻¹]		
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
Vacuno	7	6	8
Oveja	14	4	12
Cerdo	5	3	5
Caballo	17	18	18
Gallina	16	16	9

La principal forma de contaminación por estiércol es la contaminación del agua con nitratos que puede utilizarse posteriormente para consumo humano, además no hay que olvidar la posible contaminación que se puede producir debido a los malos olores (Iglesias, 1995). Por otro lado, la ganadería intensiva crea problemas de depósito de estiércol y contaminación de agua, además contribuye fuertemente a las emisiones de gases del efecto invernadero. El uso de fármacos u otros insumos en la producción de ganadería intensiva es una práctica habitual que tiene como objetivos, entre otros, aumentar la eficiencia en la engorda y producción de leche. Así mismo el uso de antibióticos como promotor de crecimiento destruye o inhibe la población de bacterias (SAG, 2013).

Aunque toda forma de materia orgánica es reciclable y aplicable al suelo, los efectos diferirán de acuerdo a su calidad. Los mayores efectos sobre el balance de nitrógeno y la solubilización de fósforo se lograrán mediante la aplicación de materias orgánicas diversificadas y con una relación C:N más bien alta. La mezcla de estiércol, paja de cereales y restos hortícolas sería, por ejemplo, una mezcla de alta calidad (M^a Romera, 2017). Una relación C:N menor a 8,5 nos indicaría una falta de energía en el suelo y una alta liberación de nitrógeno mineral; una relación entre 8,5 y 11,5 nos indicaría un suelo equilibrado, tanto en la liberación de nitrógeno, como en el contenido de carbono; y una relación mayor a 11,5 nos indicaría un suelo con exceso de energía y de carbono. (Agromática, 2017).

Respecto de la aplicación de estiércol o cualquier fuente de nitrógeno la legislación chilena señala que la carga ganadera establecida se debe fijar considerando que no se debe sobrepasar el límite de 170 kg de nitrógeno ha⁻¹año⁻¹ y en caso de haber excesos de nitrógeno debe retirarse y destinarse a otros usos (Ministerio de Agricultura, 2016). Por esto, se deben realizar análisis de metales pesados, salinidad, conductividad eléctrica, nitrógeno total, fósforo, entre otros, esto, para asegurar que los estiércoles agregados no afecten las condiciones del sistema productivo. Un volumen de dos metros cúbicos de este material compostado equivale a una tonelada de abono. En aquellos suelos que cumplan con los requisitos establecidos por el D.S. 004/2009 en relación a la concentración máxima de metales en suelos (Tabla 2), la tasa de residuos sólidos que se pueden aplicar corresponde a 90 ton·ha⁻¹ por año, en base a materia seca (SAG, 2008).

Tabla 2. Concentraciones máximas de metales en suelos receptores de enmiendas.

Metal	Concentración máxima en mg·kg ⁻¹ suelos (en base materia seca)		
	Macrozona Norte		Macrozona Sur
	pH > 6,5	pH < 6,5	pH > 5
Arsénico	20	12,5	10
Cadmio	2	1,25	2
Cobre	150	100	75
Mercurio	1,5	1	1
Níquel	112	50	30
Plomo	75	50	50
Selenio	4	3	4
Zinc	175	120	175

Una parte de los compuestos que elimina el animal, especialmente los que están en la orina o en sus fecas, pueden ser utilizados rápidamente por las plantas. Pero una fracción importante sufrirá primero transformaciones en el suelo y posteriormente quedará a disposición de las plantas. Por estas razones, es de vital

importancia, conocer que tipos de contaminantes se encuentran en el medio ambiente y que consecuencias pueden provocar en los diversos ecosistemas.

Existen una serie de contaminantes que no están regulados y se encuentran dentro de la categoría de contaminantes emergentes, los cuales son compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el medioambiente, o las posibles consecuencias de la misma, han pasado en gran medida inadvertidas, causando problemas ambientales y de riesgo para la salud. Son compuestos de los que relativamente se conoce poco, en cuanto a su presencia, impacto y tratamiento. Pueden ser candidatos a regulación futura, dependiendo de investigaciones sobre sus efectos potenciales en la salud y los datos de monitoreo con respecto a su incidencia.

Dentro de los contaminantes emergentes, se encuentran algunos que tienen efectos de disruptores endocrinos (EDCs), ya que se ha determinado que su presencia aún en concentraciones muy bajas, podrían causar serios problemas en organismos vivos. Los EDCs son compuestos químicos capaces de alterar el sistema endocrino, tanto en seres humanos como en animales, responsables de múltiples funciones vitales como el crecimiento, el metabolismo y el desarrollo sexual, con capacidad de provocar efectos adversos sobre la salud de un organismo o de su progenie. Los EDCs se consideran “sustancias camaleónicas” ya que una misma sustancia EDCs tiene diferentes modos de actuación según la concentración a la que se encuentre. Una misma sustancia EDCs puede tener diferentes modos de acción según el momento específico de contacto con el tejido, dependiendo también del equilibrio hormonal de la persona expuesta (Romano D., 2012).

Al imitar o alterar el efecto de las hormonas, los EDCs pueden enviar mensajes confusos al organismo ocasionando diversas disfunciones. Estudios en animales han demostrado que los disruptores endocrinos afectan al sistema nervioso (cognitivo), la salud reproductiva (problemas de fertilidad y pubertad precoz), causan cáncer de ovario, próstata y mamario, así como obesidad, diabetes y problemas cardiovasculares, generando preocupación en relación a sus efectos en la salud de los seres humanos (Rivas A., 2004). Los EDCs se encuentran en muchos productos

de uso cotidiano, como por ejemplo, cosméticos, botellas de plástico, juguetes, pesticidas, fármacos, entre otros. Estos pueden ingresar al medio ambiente, a través de plantas de tratamiento de aguas servidas, o por medio del uso de enmiendas en el área agrícola. Debido a su baja concentración y variedad de compuestos éstos son difíciles de determinar (Moreno E., 2012).

Un ejemplo de disruptores endocrinos son los estrógenos, que son hormonas sexuales esteroideas (derivadas del colesterol) de tipo femenino principalmente, producidos por los ovarios, la placenta durante el embarazo y, en menores cantidades, por las glándulas adrenales. En su función endocrina, los estrógenos atraviesan la membrana celular para llegar al núcleo, en el que se encargan de activar o desactivar determinados genes, regulando la síntesis de proteínas (Thakur M.K., 2009). Una de las características por la cual los estrógenos se conocen, es por inducir a muy bajas concentraciones, del orden de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, efectos adversos en sistemas vivos, ya sean animales, plantas o seres humanos (Fine D., 2003). Exposiciones a concentraciones tan bajas como $10 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ de 17β -estradiol durante un período de tiempo corto pueden inducir la feminización completa de peces como la Medaka (Lafrance P., 2013). Una de las razones de por qué puede suceder esto, es debido a la aplicación de enmiendas de animales en campos de agricultura cercanos a ríos o canales, los cuales arrastrarían parte del suelo que contiene estos estrógenos. Por otro lado, hay que tener en cuenta que los estrógenos que provienen de los desechos del ganado aplicados en campos agrícolas pueden percolar hacia aguas subterráneas. Una fuente importante de ingreso de algunos estrógenos hacia el medio ambiente es a través de los diferentes tipos de excreciones de animales, la cantidad de estrógenos depende de la especie de animal, del sexo, la edad y estado reproductivo en que se encuentre (Zhang H., 2014). Las cantidades de estrógenos que se pueden producir a diario por algunos animales son importantes, como por ejemplo, cerdos preñados pueden excretar entre 700 y 1700 μg de estrona por día en su orina (Johnson A.C, 2005). Mientras que un ganado vacuno puede excretar alrededor de 384 μg de 17β -estradiol diariamente por medio de sus fecas y orina (Lafrance P., 2013).

En este trabajo de investigación se estudió la biodisponibilidad de dos estrógenos naturales (estrona (E1), 17 β -estradiol (E2)) y un estrógeno sintético (17 α -etinilestradiol (EE2)).

La estrona (E1) (Figura 1) es la hormona menos abundante dentro de las hormonas naturales estrogénicas, esta es secretada por los ovarios y el tejido adiposo. Se encuentra principalmente en las mujeres menopáusicas, es el principal estrógeno en hombres, y contiene un anillo de benceno en su estructura molecular. Su biosíntesis se logra a partir de la androstenediona, por medio de la desmetilización del carbono 19 y la aromatización del anillo A. También puede ser almacenada como sulfato de estrona para su posterior conversión en estradiol, un estrógeno más activo (Patrón D., 2013). Actúa en el desarrollo de características sexuales y órganos reproductores femeninos, realiza el mantenimiento del control electrolítico y aumenta el anabolismo de proteínas. El mecanismo de acción de esta hormona ocurre atravesando las membranas celulares por difusión, se unen a receptores proteicos y posteriormente cuando llegan al núcleo modifican el gen y realizan su función (producir sustancias o inhibirlas) (Albornoz M., 2016).

El 17 β -estradiol (E2) (Figura 2) es una hormona natural sexual femenina en donde sus niveles sanguíneos son más altos durante los años reproductivos de la mujer, se producen diariamente alrededor de 700 μg de E2, y se encuentra en menor concentración durante la menopausia, esto debido al agotamiento de los folículos ovárico funcionales responsables de la producción de estradiol. Los niveles de estradiol en hombres son comparables con los que existen en las mujeres durante la menopausia, son niveles muy bajos (8-40 $\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$) (Stricker R, 2011). En las mujeres es producido por las células granulosas de los ovarios por la aromatización de la androstenediona a estrona, seguido por la conversión de estrona a estradiol a partir de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y también pequeñas cantidades de estradiol son producidas por los testículos en los hombres y en la corteza suprarrenal (Gianguzza A.). En ambos géneros puede ser producida en el cerebro y en las paredes arteriales (Prado L., 2017). El estradiol representa el principal estrógeno en los humanos y el más potente, éste no sólo tiene un impacto crítico sobre el funcionamiento sexual y reproductivo, sino que afecta también a

otros órganos, incluidos los huesos. La E2 tiene una vida media corta ya que se oxida irreversiblemente a estrona y estriol. La regulación de su producción y sus niveles de concentración se hallan sujetos a un ciclo complejo: los mensajeros del hipotálamo y de la hipófisis regulan la producción hormonal de los ovarios y por otro lado estos compuestos actúan sobre estructuras encefálicas (López N., 2011).

El 17α -etinilestradiol (EE2) (Figura 3) es un estrógeno derivado del estradiol, fue el primer análogo del estrógeno sintetizado. Una manera de evitar la oxidación de Estradiol a Estrona es bloquear la función alcohólica en C17 con un sustituyente apropiado, como el etinil, dando lugar a la EE2. Es uno de los medicamentos más utilizados en el mundo, ya que se utiliza en fórmulas para producir anticonceptivos. Esto debido a que el estradiol se absorbe bien por vía oral, pero es rápidamente inactivado por el hígado mediante oxidación del hidroxilo y en la EE2 la sustitución del carbono 17 con un grupo etinil le otorga a este estrógeno gran resistencia a la degradación del hígado. La actividad de la EE2 es 2,46 veces más fuerte que la E2 (Pillon A., 2005).

Cada una de estas moléculas es un esteroide de 18 carbonos, que contiene un anillo fenólico A y un grupo β -hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y de alta afinidad a receptores de estrógenos. Las propiedades fisicoquímicas de cada una de estas hormonas se aprecian en la Tabla 3.

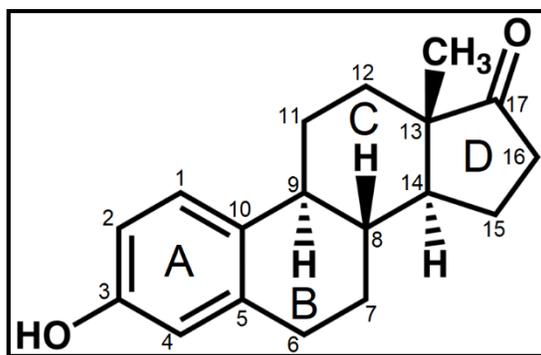


Figura 1. Estructura molecular de la Estrona (E1).

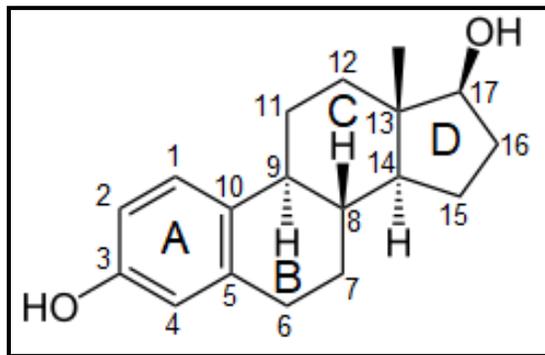


Figura 2. Estructura molecular del 17β -estradiol (E2).

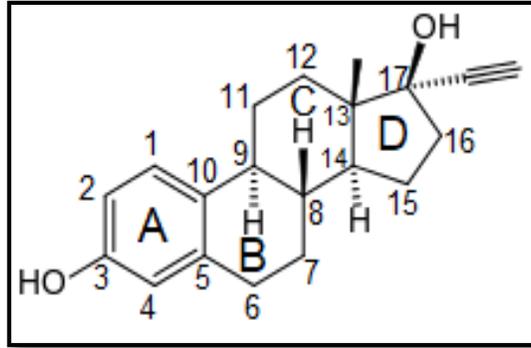


Figura 3. Estructura molecular 17 α -etinilestradiol (EE2).

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de las hormonas estrogénicas E1, E2 y EE2.

Propiedad	Estrona (E1)	17 β -estradiol (E2)	17 α -etinilestradiol (EE2)
Masa molecular ^a [g·mol ⁻¹]	270,4	272,4	296,4
pK _a ^b	10,34	10,23	10,05
Log K _{ow} ^b	3,43	3,95	4,15
Solubilidad en agua ^{a,c} [mg·L ⁻¹]	19,90	3,60	11,30
Presión de vapor ^a [mmHg]	1,4·10 ⁻⁷ 2,3·10 ⁻¹⁰	1,3·10 ⁻⁸ 2,3·10 ⁻¹⁰	2,7·10 ⁻⁹ 4,5·10 ⁻¹¹
Constante de Henry ^a [atm·m ³ ·mol ⁻¹]	3,8·10 ⁻¹⁰	3,6·10 ⁻¹¹	7,9·10 ⁻¹²

a: (Kuster M, 2004), **b:** (Goepfert N., 2014), **c:** (Pi N, 2017).

La aplicación de enmiendas a los suelos, tales como estiércol, implica que los estrógenos que estos puedan contener, se adsorban en los suelos y posteriormente sean absorbidos por las plantas. La absorción de estas hormonas por las raíces de las plantas, y su translocación en el tejido vegetal, son fundamentales para la evaluación de los potenciales riesgos para la salud humana y el medio ambiente (Karnjanapiboonwng A., 2011). La mayoría de los contaminantes orgánicos se absorben de forma pasiva por la planta a través de las raíces por medio del agua. Esto significa que tanto la concentración del contaminante en el suelo, el agua de riego, y la cantidad de agua disponible son factores que influye en el aumento de la absorción química por las plantas (Wu Ch., 2012).

Según estudios la toxicidad de estas hormonas sobre los cultivos, se ha encontrado que su nivel de concentración en las plantas es insignificante para posibles efectos fisiológicos si se llegasen a consumir (Prater J., 2015). Sin embargo, una exposición a largo plazo del suelo a las hormonas, puede resultar en altas concentraciones de hormonas en las plantas a niveles que provocarían interrupción de las funciones reproductivas o metabólicas. Un estudio reveló que las hormonas que están frecuentemente en el agua de riego son absorbidas por las plantas de lechuga y se pueden encontrar en altas concentraciones; el efecto de los biosólidos es insignificante cuando se compara con el del agua de riego, y los niveles de hormonas que se encuentran en los vegetales (como la lechuga) pueden tener efectos perjudiciales para la salud humana (Shargil D., 2015).

Se ha mostrado en estudios una gran y rápida sorción de estrógenos en suelos tal como una rápida degradación de E2 a E1 y de E1 a estriol (E3). La degradación de E2 por oxidación es de gran importancia ambiental, ya que la E1 es dos a tres veces menos potente que la E2 como disruptor endocrino. La persistencia de E1 podría ser incrementada por su lenta degradación a bajas temperaturas o por los bajos niveles de oxígeno que acompañan la aplicación de enmiendas (Prater J., 2015). Las tasas de degradación de los isómeros 17 α y 17 β -estradiol en suelos aeróbicos son las mismas y el metabolito de producto principal de ambos isómeros es la E1, siendo el principal mecanismo la oxidación de la E2 (Mashtare M., 2013). Por otra parte, la reducción de E1 a E2 se puede producir sin la presencia de oxígeno. Por lo tanto, puede ocurrir un ciclo completo de degradación de E1 a E2 y viceversa (Fernández L., 2016). Estas condiciones se pueden cumplir en suelos que estén bajo o alrededor de una laguna de estiércol, que es donde éste se puede almacenar, o también en suelos enmendados con estiércol. La degradación de E2 a E1 puede ocurrir en horizontes superficiales del suelo, y la situación contraria podría ocurrir en horizontes más profundos y acuíferos donde se esperan condiciones reductoras (Jürgens M., 2001), donde la materia orgánica es un buen reductor, ya que se oxida, libera energía para microorganismos y se origina CO₂, también procesos como la desnitrificación, desulfuración y la formación de Fe²⁺ y Mn²⁺ ocurrirían en condiciones reductoras. Al aumentar las condiciones anaeróbicas

la reducción en el suelo sigue la siguiente secuencia: O_2 - NO_3^- - Mn^{4+} - Fe^{3+} - SO_4^{2-} - CO_2^- , donde un componente empezará a reducirse cuando todas las formas oxidadas con mayores potenciales de oxidación se hayan reducido.

Las degradaciones de E1 a E2 y viceversa son importantes ya que sugieren un riesgo ambiental que no necesariamente disminuye cuando entran en contacto con el suelo, por otro lado, existe un potencial para el transporte de largo alcance debido a una mayor persistencia de los estrógenos en condiciones anaeróbicas.

Con respecto a la biodisponibilidad de un compuesto, esta se refiere a la fracción del compuesto que es accesible para los organismos vivos y determina su toxicidad. Los principales responsables de la disminución de la biodisponibilidad son la incorporación de materia orgánica al suelo y/o la migración lenta del compuesto a microporos inaccesibles para los microorganismos del suelo. En el medio natural todos los procesos involucrados en la movilidad y degradación de los compuestos, están estrechamente relacionados con la biodisponibilidad, de tal forma que los procesos que favorecen la movilidad aumentan también su biodisponibilidad, y los procesos degradativos disminuyen la cantidad de contaminante disponibles para su asimilación por organismos vivos (Rodríguez B., 2009). Según aumenta el tiempo de contacto entre los contaminantes orgánicos y el suelo, la biodisponibilidad disminuye; a este fenómeno se le conoce como envejecimiento o efecto aging (Alexander M., 2000).

Para poder probar y comprobar esta dinámica de absorción y biodisponibilidad de los estrógenos se pueden realizar bioensayos, que son experimentos que se realizan bajo condiciones controladas de laboratorio con el fin de evaluar cualitativa y cuantitativamente el efecto que los agentes xenobióticos producen sobre organismos vegetales o animales, por ejemplo plantas, sin embargo, estos métodos consumen mucho tiempo, por lo que resulta adecuado utilizar métodos biosimuladores, los cuales imitan las condiciones de los bioensayos, pero con compuestos que reemplacen a los que existen de forma natural, de tal forma que se puedan obtener resultados en un menor tiempo, y se correlacionen los valores de concentración o de los factores de bioconcentración encontrados en las plantas

con los que arroje un método de extracción químico. Para esto se puede utilizar como un método químico biosimulador la extracción con hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD).

Las ciclodextrinas son oligómeros cíclicos de amilosa derivados de compuestos de un número variable de unidades de glucosa. Estas cadenas de glucosa forman una cavidad en forma de cono, en donde los OH secundarios apuntan hacia afuera en el borde más grande, y los CH₂OH también se dirigen hacia afuera en torno al borde menor, tal como se muestra en la Figura 4. Los compuestos pueden entrar y formar un complejo soluble en agua y, por lo tanto, cambiar las propiedades fisicoquímicas de un compuesto (Contreras H., 2001).

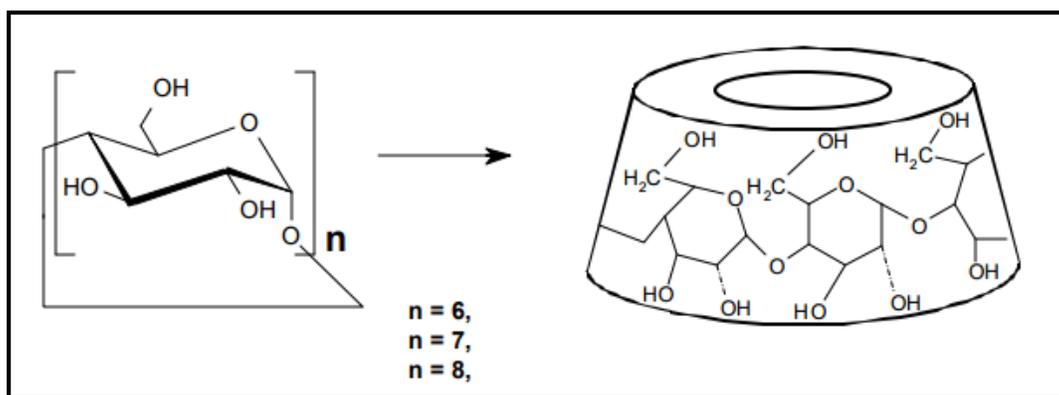


Figura 4. Representación de la estructura de concavidad de la ciclodextrina.

El número de unidades de glucosa determina el tamaño de la cavidad en forma de cono y su correspondiente nombre (Gould S., 2005). Por ejemplo, las ciclodextrinas más comunes utilizadas como vehículos de formulación son α , β , y γ -ciclodextrina, tal como se muestran sus estructuras en la Figura 5, con el número correspondiente de unidades de glucosa ($\alpha = 6$, $\beta = 7$, $\gamma = 8$). Estas moléculas de ciclodextrina, aunque similares en su unidad, poseen tasas de absorción ligeramente diferentes, posiblemente debido a diferencias en los procesos de degradación (Antlsperger G., 1996). El tamaño de la cavidad determinará el tipo de complejo que se formará dependiendo del porte de la molécula que entre en la ciclodextrina, siendo la α -ciclodextrina la más pequeña y la γ -ciclodextrina la de mayor diámetro de las tres. Las ciclodextrinas con más de ocho unidades de glucosa no muestran evidencia de la formación de complejos de inclusión, donde existiría

interacciones por fuerzas intermoleculares, como fuerzas de Van de Waals y no por formación de enlaces. La estructura elíptica de la Ciclodextrina se tuerce para aliviar el impedimento estérico y la distorsión del enlace glucosídico. (Dodziuk H., 2006)

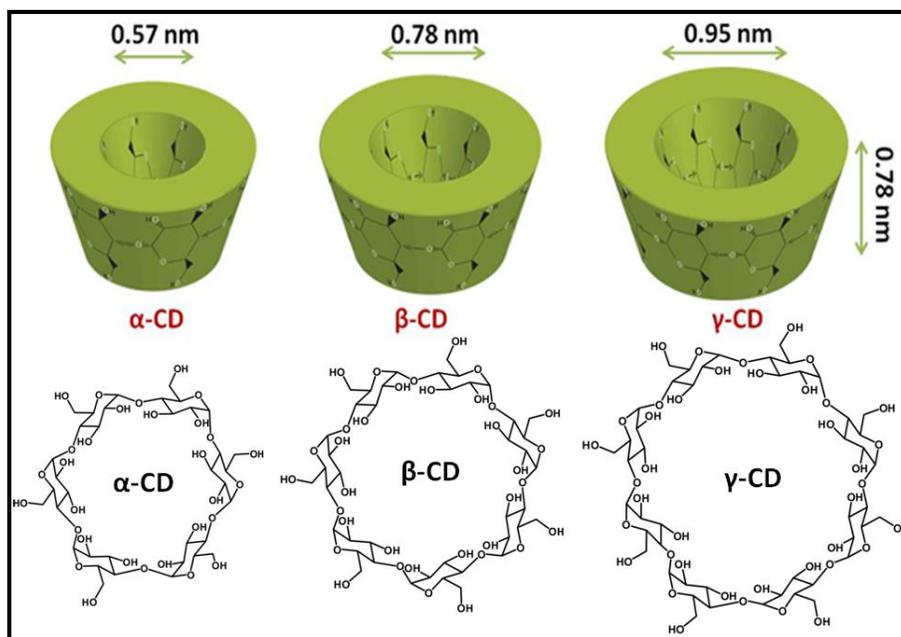


Figura 5. Estructura de α , β , y γ -ciclodextrina, sus respectivas medidas de diámetro y altura.

La cavidad de las ciclodextrinas está compuesta por átomos de hidrógeno y puentes glucosídicos de oxígeno, cuyos pares de electrones no compartidos se dirigen hacia el interior de la misma produciendo una alta densidad electrónica y haciendo que el interior de la cavidad sea hidrofóbica, tal como se muestra en la Figura 6 (Contreras H., 2001).

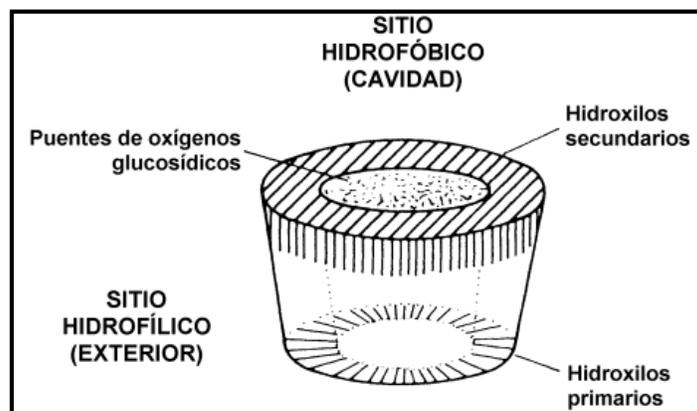


Figura 6. Representación de una ciclodextrina indicando las regiones hidrofóbica (interior) e hidrofílica (exterior).

II. HIPÓTESIS

Para poder restaurar un suelo agrícola degradado, se puede utilizar como enmienda, estiércol de diferentes animales, como cerdos, vacas, ovejas, caballos y aves, con el fin de incrementar el potencial productivo de los suelos, mejorando su composición química, además de contribuir a la disminución de la erosión. Sin embargo, el estiércol utilizado como enmienda podría contener estrógenos, tales como, estrona (E1), 17β -estradiol (E2) y 17α -etinilestradiol (EE2), lo que podría provocar un riesgo ambiental dependiendo de la concentración, biodisponibilidad, movilidad y persistencia de éstos. Por lo que se propone como hipótesis que la aplicación de enmiendas de estiércol afectaría la biodisponibilidad de E1, E2 y EE2 en los suelos.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general.

Evaluar y determinar el efecto de la aplicación de estiércol en relación a la presencia y disponibilidad de hormonas estrogénicas como, estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) y 17 α -etinilestradiol (EE2) en suelos y su fracción biodisponible a través de un bioensayo y un método de extracción químico.

3.2 Objetivos específicos.

- Determinar la concentración de las hormonas E1, E2 y EE2 en estiércol de vacuno, cerdo y caballo mediante extracción asistida por ultrasonido y posterior cuantificación por GC/MS.
- Caracterizar química y físicamente estiércoles y suelos provenientes de la Región Metropolitana.
- Determinar la fracción biodisponible de E1, E2 y EE2 en plantas de trigo cultivadas en suelos enmendados con estiércol.
- Estimar la fracción biodisponible mediante la extracción de las hormonas con ciclodextrina, validando la metodología por comparación con los resultados de biodisponibilidad en las plantas de trigo.
- Estudiar el tiempo de degradación de las tres hormonas en suelos tratados con estiércol natural y enriquecido.
- Analizar e interpretar estadísticamente los resultados obtenidos.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos.

- Agua ultrapura (Milli Q).
- Acetato de etilo, acetona, metanol, hexano, diclorometano y etanol grado HPLC, Merck (Darmstadt, Germany).
- Nitrógeno extrapuro $\geq 99,995\%$, Linde (Santiago, Chile).
- Helio extrapuro $\geq 99,9999\%$, Linde (Santiago, Chile).
- Piridina, Merck (Darmstadt, Germany).
- Agente derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA), Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA).
- Acetato de sodio y acetato de amonio, Merck (Darmstadt, Germany).
- Ácido sulfúrico (97%), ácido nítrico (65%), ácido clorhídrico (37%) Merck (Darmstadt, Germany).
- Hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD), Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA).
- Cloruro de sodio y cloruro de potasio, Merck (Darmstadt, Germany).
- Sulfato de sodio, Merck (Darmstadt, Germany).
- Hidróxido de sodio, Merck (Darmstadt, Germany).
- Dicromato de sodio, Merck (Darmstadt, Germany).
- Hexametáfosfato de sodio, Sigma Aldrich (Reino Unido).
- Sacarosa, Merck (Darmstadt, Germany).
- Ácido bórico, Merck (Darmstadt, Germany).
- Indicador rojo de metilo y verde bromo cresol.

4.2 Estándares.

- Estrona 99%, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany).
- 17 β -estradiol, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany).
- 17 α -etinilestradiol 96,5%, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany).
- Estándar Subrogate: estrona (3,4)¹³C₂ E1 90%, Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (USA).
- Estándar interno: 3,3',4,4'-Tetraclorobifenil (PCB 77), Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany).

4.3 Materiales

- Tubos de vidrio de fondo cónico (10 y 15mL)
- Viales ámbar (2, 12, 30 y 50 mL)
- Pipetas Pasteur Hirshman.
- Cartuchos OASIS HLB Waters de 3cc.
- Filtros Millipore 0,20 y 0,45 μ m de Membrana de PVDF.
- Jeringas plásticas desechables de 10 mL con aguja, Nipro Syringe.
- Matraces aforados, Erlenmeyer y de fondo redondo.
- Vasos precipitados (vidrio y plástico).
- Probetas (vidrio y plástico).
- Pipetas graduadas y aforadas.
- Tubos Falcon de 50 mL.
- Cubetas plásticas para espectrofotómetro.
- Bureta.
- Matraz Kitasato y embudo Büchner.
- Papel filtro N°2.
- Micropipetas 2-1000 μ L.
- Hidrómetro ASTM 152 H
- Termómetro BRAND

4.4 Semillas

- Trigo (*Triticumaestivum*)

4.5 Instrumentos y equipos

- * Cromatógrafo de gases Thermo Fisher modelo Thermo 1300 con detector de espectrómetro de masas con analizador de cuadrupolo, ISQ.
- * Liofilizador VirTis BenchTop Pro freeze dryers, Sp Scientific
- * Balanza analítica Precisa 125A, Swiss Quality, Suiza.
- * Balanza digital Adam AQT-2600.
- * Balanza granataria PJ precisa junior 5000.
- * Baño de ultrasonido, LUC-410, Labtech, Korea.
- * Vortex mixer MX-S.
- * Centrifuga Verifuge 3.0, Heraeus Sepatech.
- * Manifold Supelco, modelo Visiprep 24 DL.
- * Bloque de calor VWR, U.S.A.
- * Estufa, WTC Binder, Alemania.
- * pH metro WTW pmx 3000.
- * Agitador Mecánico HEIDOLPH promax 2022.
- * Agitador Orbital NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC classic C-24.
- * Conductímetro WTW LF 539.
- * Espectrómetro Perkin Elmer 1100B.
- * Espectrofotómetro UV-Visible, Unicam UV/Vis spectrometer.
- * Destilador Arquimed modelo UDK 127.
- * Digestor Arquimed DK 6.
- * Horno microondas Milestone mls 1200 Mega.
- * Rotavapor, Laborota 4001 efficient, Heidolph, Alemania.
- * Incubador Shaker C24.

4.6 Condiciones del cromatógrafo GC-MS.

Para la determinación de los analitos se utilizó un cromatógrafo de gases Thermo Fisher modelo Focus con detector de espectrómetro de masas con analizador de cuadrupolo, ISQ e inyector SSL. El modo de ionización es por impacto electrónico (EI), como gas portador se utilizó helio de 99,999 % de pureza con un flujo de 1 mL·min⁻¹ y columna capilar marca Restek RTX-5MS 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 df (µm), con un máximo de temperatura a 350°C.

El programa de temperaturas del horno inicia en 75°C por 1 minuto, luego alcanza los 150°C a una razón de 20°C·min⁻¹ manteniéndose por 5 minutos, y finalmente llega a una temperatura de 300°C a 10°C·min⁻¹ manteniéndose por 3 minutos con un *solvent delay* de 16 minutos, tal como se muestra en la Figura 7. La temperatura del inyector es de 280°C en modalidad splitless, la línea de transferencia a 250 °C y la fuente de ionización a 200°C.

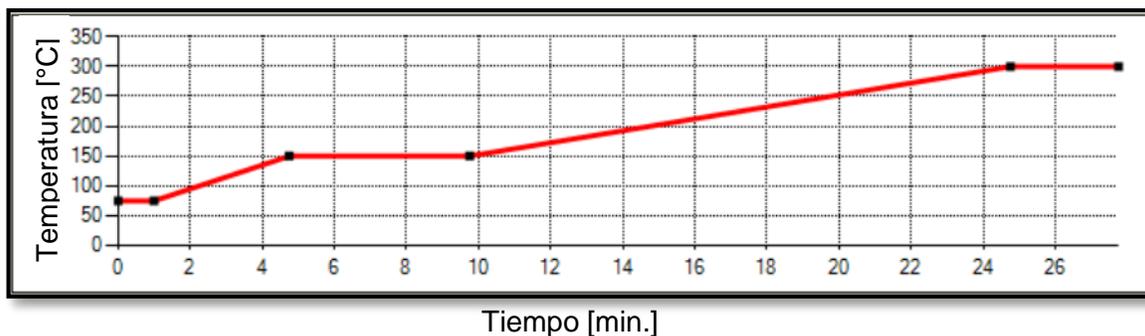


Figura 7. Rampa de temperatura del horno del cromatógrafo de gases.

4.7 Identificación mediante GC-MS.

Primero se realizó un análisis de los analitos en modo Scan, que consistió en un barrido de masas en el rango de 50-500 m/z, para tener una información total de los estándares de las tres hormonas. Este modo permitió realizar un análisis cualitativo para la identificación de los compuestos mediante una búsqueda en la biblioteca de espectros del software cromatográfico.

Luego se realizó una determinación en modo SIM (Selected Ion Monitoring) que es de alta sensibilidad, el cual consistió en una monitorización de iones

característicos para cada uno de los analitos, en donde se seleccionaron dos iones por cada analito, siendo el primero el ion cuantificador y de mayor abundancia, y el segundo el ión cualitativo, el cual nos otorga la confirmación inequívoca del analito.

Se utilizó como estándar interno bifenilo policlorado (PCB), para corregir errores instrumentales y de inyección, y como estándar subrogate Estrona marcada ((3,4)¹³C₂ E1) para corregir la recuperación de los compuestos durante el desarrollo de la metodología.

4.8 Caracterización química y física de muestras de estiércol y suelos.

Se recolectaron tres series de suelos: San Diego, Codigua y Pudahuel, provenientes de la Región Metropolitana, ubicados en Pomaire, Codigua y Melipilla, respectivamente, todas perteneciente al orden Mollisol. Se utilizaron muestras compuestas de cada suelo, las que fueron secadas al aire y tamizadas a 2 mm. Las muestras de estiércol de cerdo, vacuno y caballo provenientes de la Región Metropolitana fueron congeladas para ser liofilizadas posteriormente en condiciones de -50°C y 200 mT de presión, hasta alcanzar masa constante.

Tanto las muestras de suelos, como las de estiércol fueron caracterizadas física y químicamente a través de: pH, conductividad, contenido de carbono orgánico y materia orgánica, contenido de metales pesados y de nitrógeno total. Solo a los suelos se le determinó la capacidad de intercambio catiónico, textura, densidad aparente y factor de humedad.

4.8.1 Determinación del pH.

El pH se determinó por medio de potenciometría con un electrodo combinado de vidrio-calomelano previamente calibrado. Se preparó una suspensión de suelo o estiércol con agua en una razón de 1:2,5, luego se agitó durante 5 minutos, y se dejó reposar durante 2 horas para finalmente proceder a determinar el pH en el sobrenadante después de estabilizar, durante 1 minuto, la lectura de éste (Sadzawka, 2007).

4.8.2 Determinación de la humedad.

El procedimiento para medir la humedad fue tomar 100 g de muestra, de acuerdo al protocolo de la NCh 1515 Of 79, esa cantidad corresponde según la balanza analítica que se utiliza que es de precisión de 0,01 g. La muestra húmeda se pesó en un recipiente y luego se dejó por 24 horas en un horno a $110^{\circ} \pm 5^{\circ}\text{C}$, trascurrido dicho tiempo se pesó el recipiente con la muestra seca (NCh 1515. Of 79). Para calcular la humedad se utilizó la Ecuación 1:

$$Fh = \frac{(Mh - Ms)}{Ms - Mr} \cdot 100\% \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde: **Fh**= Factor de humedad

Mh= Peso recipiente más lectura de suelo húmedo (g).

Ms= Peso recipiente más lectura de suelo seco (g).

Mr= Peso recipiente (g).

4.8.3 Determinación de la conductividad.

La medición se realizó en un conductímetro, para esto la muestra de estiércol o suelo se mezcló con agua en una razón 1:5 en un frasco plástico. Luego, se agitó durante 30 minutos en un agitador recíproco y se filtró con papel filtro N°2, el filtrado se recolectó en un vaso plástico y se determinó la conductividad, esta medición se corrigió a 25°C (Sadzawka, 2007).

Previo a la medición de las muestras fue necesario calcular la constante de celda del conductímetro (K), la cual es necesaria para corregir las mediciones hechas, esta no debía diferir en más de un 5% del valor dado por el fabricante, para así poder obtener resultados consistentes. Para esto, fue necesario hacer tres soluciones de KCl en concentraciones de 0,1- 0,02 y 0,01 M y medir su conductividad. Para obtener el valor de K se utilizó la siguiente Ecuación:

$$K = \frac{CE_e}{CE_m} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde: **K**= Constante de celda.

CE_e= CE específica de una de las soluciones de KCL en dS·m⁻¹.

CE_m= CE medida de la misma solución de KCl en dS·m⁻¹.

4.8.4 Determinación de la capacidad de intercambio catiónico (CIC).

Se agregaron 4 g de estiércol o suelo a un tubo de centrifuga y luego 33 mL de acetato de sodio 1 M a pH 8,2. Se agitó durante 5 minutos en un agitador mecánico recíproco y se centrifugó durante 15 minutos para luego descartar el sobrenadante. El proceso se repitió otras tres veces con 33 mL de acetato de sodio 1 M y una vez con 33 mL de etanol. Finalmente, se agregaron tres veces 33 mL de acetato de amonio y el sobrenadante se colectó en un matraz de 100 mL. El extracto obtenido se diluyó 50 veces al igual que los blancos.

Se elaboró una curva de calibración con un estándar de cloruro de sodio para medir el Na⁺ del extracto por Espectroscopía de Emisión Atómica (EEA), a 589 nm (Sadzawka, 2006).

Para calcular la concentración de Na se utilizó la siguiente Ecuación:

$$Na \text{ (cmol/kg)} = (a - b) \cdot 0,435$$

(Ecuación 3)

Donde: **a** = mg·L⁻¹ de Na en el filtrado de la muestra diluida.

b = mg·L⁻¹ promedio de Na en los blancos diluidos.

4.8.5 Determinación de carbono orgánico (CO) y materia orgánica (MO).

Para determinar la materia orgánica se pesó 1 g de suelo y 0,1 g de estiércol, los cuales se colocaron por separado en matraces Erlenmeyer. Se incluyeron seis matraces con 1 mL de una serie de estándares de sacarosa (0 a 50 mg de sacarosa·mL⁻¹) y dos blancos. A cada matraz se agregaron 10 mL de solución de Na₂Cr₂O₇ 0,5 M y 20 mL de H₂SO₄ concentrado y se dejaron reposar sobre una plancha aislante bajo campana durante 30 minutos. Luego se adicionaron 70 mL de agua Milli-Q y se dejaron reposar durante la noche. Para medir el Dicromato reducido, se tomó una alícuota del sobrenadante de cada matraz y se traspasó a una cubeta para llevarla al espectrofotómetro UV-Vis y medir a una longitud de onda de 600 nm, teniendo el cuidado de no perturbar el sedimento del fondo del matraz. A partir del valor de % de CO se obtuvo el % de MO (Sadzawka, 2006).

Para calcular el %CO en las muestras que presentaban un pH mayor a 6,5 se utilizó la Ecuación 4 y para las muestras que presentaban un pH menor a 6,5 se utilizó la Ecuación 5.

$$\%CO = \frac{a-b}{10 \cdot s} \cdot fh \qquad \%CO = \frac{a-b}{10 \cdot s} \cdot 1,16 \cdot fh$$

(Ecuación 4)

(Ecuación 5)

Donde: **a** = mg de carbono en la muestra.

b = mg promedio de carbono en los blancos.

s = masa en gramos de la muestra.

fh = factor de humedad de la muestra.

El cálculo de la concentración de materia orgánica en las muestras se realizó según la siguiente Ecuación:

$$\%MO = \%CO \cdot 1,724 \qquad \text{(Ecuación 6)}$$

Donde: **%CO** = porcentaje de carbono orgánico.

1,724 = factor de conversión.

4.8.6 Determinación de la textura de los suelos.

La determinación de la textura fue realizada sólo en los suelos y se realizó a través del método del hidrómetro (Bouyoucos). Se pesaron 50 g de suelo en un frasco plástico de 1 L al que se adicionaron 700 mL de agua destilada y 20 mL de hexametáfosfato de sodio al 10%. Se agitó la solución mediante un agitador mecánico durante 15 minutos y se trasvasijó a una probeta de 1 L la que se aforó con agua destilada y agitó manualmente durante 1 minuto. Luego se dejó reposar durante 4 minutos y se midió la temperatura y la lectura del hidrómetro. Pasadas 2 horas, se volvió a tomar las lecturas del termómetro y del hidrómetro. Con los datos que se recogieron se determinan las lecturas corregidas del hidrómetro.

Para obtener las lecturas corregidas del hidrómetro a los 4 minutos (L_1) y a las 2 horas (L_2) se utilizaron las siguientes Ecuaciones.

$$L1_c = L1 + [(T_1^{\circ F} - 67^{\circ F}) \cdot 0,2] \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde: $L1_c$ = Lectura corregida del hidrómetro a los 4 minutos.

$L1$ = lectura del hidrómetro a los 4 minutos.

T_1 = temperatura en $^{\circ}F$ a los 4 minutos.

$$L2_c = L2 + [(T_2^{\circ F} - 67^{\circ F}) \cdot 0,2] \quad (\text{Ecuación 8})$$

Donde: $L2_c$ = Lectura corregida del hidrómetro a las 2 horas.

$L2$ = lectura del hidrómetro a las 2 horas.

T_2 = temperatura en $^{\circ}F$ a las 2 horas.

Con las lecturas corregidas se obtuvieron los porcentajes de arena, arcilla y limo según las Ecuaciones 9, 10 y 11 respectivamente.

$$\%Arena = 100 - (L1_c \cdot 2) \quad (\text{Ecuación 9})$$

$$\%Arcilla = L2_c \cdot 2 \quad (\text{Ecuación 10})$$

$$\%Limo = 100 - (\%Arena + \%Arcilla) \quad (\text{Ecuación 11})$$

4.8.7 Determinación del Nitrógeno total mediante digestión Kjeldalh.

La primera etapa de esta determinación es la digestión, en la cual a 1 g de suelo o estiércol se agregó 1 g de mezcla catalítica Devarda y 8 mL de ácido sulfúrico concentrado. La digestión fue programada a 420 °C durante 90 minutos y se incluyeron 2 blancos. Una vez terminada, se dejaron enfriar en el mismo digestor los tubos hasta llegar a temperatura ambiente, para luego comenzar la segunda etapa de destilación en donde se agregaron 40 mL de NaOH 25% para destilar durante 8 minutos. Para recibir el destilado se utilizó un matraz Erlenmeyer de 150 mL y se dejó bajo el extremo del condensador del destilador, el cual contenía 25 mL de ácido bórico con una solución indicadora de rojo de metilo y verde de bromocresol disueltos en etanol, con lo que ocurría el viraje de color de púrpura a verde. Finalmente, la última etapa consistió en la titulación del contenido del matraz con HCl 0,1 M hasta el viraje de verde a púrpura. Para calcular el %N se utilizó la Ecuación 12:

$$\%N = \frac{(a-b)}{s} \cdot M \cdot 1,4 \cdot fh \quad (\text{Ecuación 12})$$

Donde: **a**: mL de HCl gastados en la muestra.

b: mL promedio de HCl gastados en el blanco.

s: masa en gramos de la muestra.

M: concentración molar del HCl.

fh: factor de humedad.



Figura 9. Instrumentos para realizar medición de nitrógeno total. 1. Digestor. 2. Destilador. 3. Titulación.

4.8.8 Determinación de metales pesados.

Se tomó 200 mg de muestra de suelo o estiércol, los que fueron sometidos a una pseudo-digestión con agua regia. Se incluyeron dos blancos y a cada muestra se agregaron 6 mL de una mezcla concentrada de HCl y HNO₃ (razón 1:3), utilizando un horno microondas, Milestone mls 1200 Mega. El programa de digestión se dividió en tres etapas: 5 min a 250 W, 5 min a 400 W y 10 min a 500 W, luego se sometió a un minuto de ventilación y 30 minutos de reposo en un baño de agua fría. Las muestras digeridas, se transfirieron a matraces de 10 mL que se aforaron con agua Milli-Q y se filtraron con papel filtro N° 2 para determinar la concentración de los metales: Cu, Zn, Pb, Ni, Cr y Cd, por espectroscopía de absorción atómica (EAA) con llama (FAAS) (Gómez, 2016).

4.9 Determinación de la concentración de las hormonas E1, E2 y EE2 en estiércol de vacuno, caballo y cerdo.

Las muestras de estiércol fueron liofilizadas en condiciones de temperatura de -50°C y de presión 200 mT.

4.9.1 Extracción de analitos.

Se masó 0,25 g de cada muestra y se dispusieron en tubos de vidrio cónicos. Se agregó a cada muestra 200 ng·g⁻¹ de subrogate (3,4)¹³C₂ E1, para luego extraer los analitos con 5 mL de acetato de etilo asistido con ultrasonido durante 15 minutos, luego se centrifugó a 2000 rpm durante 15 minutos, este proceso fue repetido tres veces. Los 15 mL de extracto total se recolectaron en un vial ámbar y fueron evaporados con una corriente de gas nitrógeno hasta sequedad. Luego la muestra se reconstituyó en 10 mL de una mezcla metanol-agua (razón 1:1) y se filtró por medio de jeringas con dos filtros millipore de 0,45 y 0,22 µm.

4.9.2 Purificación de extractos.

En la purificación de los extractos (clean up) se utilizaron cartuchos Oasis HLB, los cuales fueron acondicionados con 3 mL de metanol, 3 mL de acetona, 3 mL de diclorometano y 3 mL de hexano, sucesivamente. Luego, las muestras se traspasaron a los cartuchos y se lavaron dos veces con 2 mL de hexano y dos veces con 2 mL de agua Milli-Q. La elución de los analitos se realizó con 3 mL de una mezcla metanol-agua (razón 1:1) tres veces, luego el eluido se llevó a sequedad por medio de una corriente de nitrógeno, en aproximadamente 20 minutos, para finalmente reconstituir en 1 mL de acetato de etilo.



Figura 10. Sistema Manifold para etapa de clean up.

4.9.3 Derivatización.

Previo al análisis por GC-MS, fue necesario derivatizar las muestras, para lo cual se transfirieron 100 μ L del extracto a un vial ámbar de 2 mL, donde se evaporó el solvente en su totalidad con una corriente de nitrógeno, para luego agregar 50 μ L del agente derivatizante metilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) y 50 μ L de piridina. Esto se llevó a una temperatura de 80°C durante 30 minutos, posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente para agregar 20 μ L del estándar interno PCB de 1 mg/L, y por último se inyectaron 2 μ L de las muestras en el GC-MS.

4.10 Determinación de la fracción biodisponible de E1, E2 y EE2 en plantas de trigo cultivadas en suelos enmendados con estiércol.

Se agregó estiércol de caballo a los suelos en una dosis de 90 Mgha^{-1} , como se muestra en la Tabla 4. Para cada muestra de suelo se realizó un triplicado de suelo-estiércol, suelo-estiércol enriquecido y además se utilizó controles sin estiércol.

Tabla 4. Masa de estiércol agregada a 500 g de suelo en dosis de 90 Mgha^{-1}

Suelo	Masa estiércol agregado (g)
<i>Codigua</i>	13,85
<i>Melipilla</i>	19,79
<i>Pomaire</i>	26,99

El estiércol fue enriquecido con 10 mgkg^{-1} de una mezcla de cada uno de los compuestos E1, E2 y EE2, los cuales fueron agregados con un exceso de acetona a un balón de 250 mL. La mezcla de estiércol-hormonas se llevó al rotavapor (Figura 11) durante 24 horas, se traspasó a una cápsula y se dejó secar en oscuridad.



Figura 11. Rotavapor para homogeneizar las muestras de estiércol enriquecidos con las hormonas E1, E2 y EE2.

Luego, las muestras se dejaron en incubadora dentro de bolsas plásticas por una semana en condiciones de humedad de campo a 25°C . Se masaron 10 g de semillas de trigo por cada muestra, se germinaron dejándolas en vasos de vidrio

con un exceso de agua durante 24 horas a temperatura ambiente en incubadora, se lavaron y se cultivaron en aproximadamente 500 g de suelo restaurado con estiércol de caballo, utilizando macetas plásticas de 500 cc de capacidad, las cuales contenían en su fondo una malla Raschel y cuarzo, el que fue previamente lavado con ácido nítrico durante 24 horas, para posteriormente enjuagarlo y secarlo. En la Figura 12 se muestran los elementos utilizados para el cultivo de las plantas.

Se instaló la iluminación automática del invernadero con periodos de luz en una relación de 14/10 horas (día/noche), a temperatura ambiente con una variación de temperatura $\pm 5^{\circ}\text{C}$. El período de cultivo fue de 28 días y el cultivo fue controlado diariamente regando con agua destilada a un 70% de la capacidad de campo del suelo (Figura 13). Finalizado el período de cultivo, se removieron las plantas de trigo, se lavaron con agua destilada y se separaron en dos porciones: la raíz y la parte aérea (tallos y hojas), las cuales fueron liofilizadas a temperatura de -50°C y de presión 200 mT y trituradas. Para el análisis de los analitos, se siguió el mismo procedimiento de extracción, clean up y derivatización descrito anteriormente en el punto 4.9.

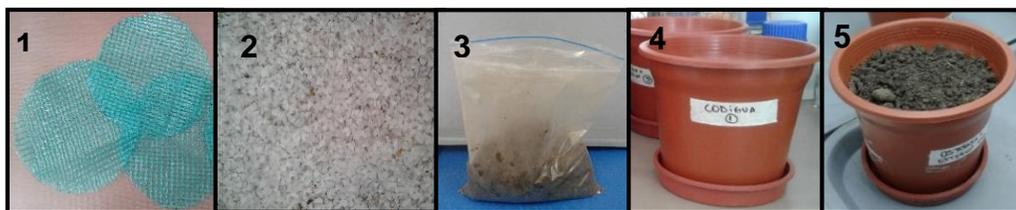


Figura 12. Elementos necesarios para el cultivo de plantas de trigo. 1. Malla Raschel, 2. Cuarzo, 3. Suelos incubado, 4. Maceta plástica de 500 cc y 5. Sistema completo armado.



Figura 13. Cultivo de plantas de trigo.

4.11 Estimación de la fracción biodisponible mediante la extracción de las hormonas con ciclodextrina.

Se enriqueció el estiércol de caballo a una concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ con cada una de las hormonas, tal como se explica en el punto 4.10. Tanto el estiércol enriquecido como el que no fue enriquecido se agregaron al suelo en una dosis de $90 \text{ mg}\cdot\text{ha}^{-1}$. Se realizaron estudios en los tres suelos mezclados con estiércol enriquecido, suelos mezclados con estiércol sin enriquecer y suelos sin estiércol, cada uno en triplicado. Para comenzar el procedimiento se tomó 1 g de cada muestra y se llevó a un tubo de centrifuga de 50 mL donde se agregaron 10 mL de una solución de hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD) 50 mM y se agitó durante 2 horas en un agitador mecánico, para posteriormente centrifugar 30 minutos a 2500 rpm. Luego que decantó la solución, se filtró el sobrenadante con filtros de jeringa de PVDF de $0,45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro, se agregaron 10 mL de metanol y el estándar subrogate (3,4)- $^{13}\text{C}_2$ E1 en concentración de $200 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$. Se sonicó durante 1 hora y se dejó en reposo por 12 horas aproximadamente.

Los analitos fueron extraídos 3 veces con 10 mL de una mezcla acetato de etilo/diclorometano (razón 1:1) mediante agitación con vórtex durante 1 minuto y posterior centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos en cada una de las extracciones. Luego para extraer los residuos de agua se agregó sulfato de sodio y se filtró con papel filtro de 90mm de tamaño de poro con sistema de vacío. La solución obtenida se evaporó a sequedad con una corriente de nitrógeno y se reconstituyó en 1 mL de acetato de etilo para finalmente filtrarlo con filtro de jeringa de PVDF de $0,22 \mu\text{m}$ de tamaño de poro.

Para la determinación por GC/MS se extrajo una alícuota de 100 μL la cual se evaporó a sequedad y se reconstituyó en 50 μL de piridina y 50 μL de derivatizante MSTFA, se llevó a temperatura de 80°C en la placa calefactora durante 30 minutos, para luego enfriar y agregar el estándar interno PCB de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Hecho esto se inyectó en el cromatógrafo para ser analizado.

4.12 Estudio del tiempo de degradación de E1, E2 y EE2 en suelos tratados con estiércol.

El estudio de degradación se llevó a cabo en los tres suelos mezclados con estiércol de caballo enriquecido con hormonas y suelos enriquecidos sin estiércol. Las muestras fueron incubadas a 25°C durante dos periodos de tiempo, el primero de 30 días y el segundo de 5 días, ambos en condiciones de humedad de campo. Se extrajeron periódicamente alícuotas de las muestras para ser analizadas.

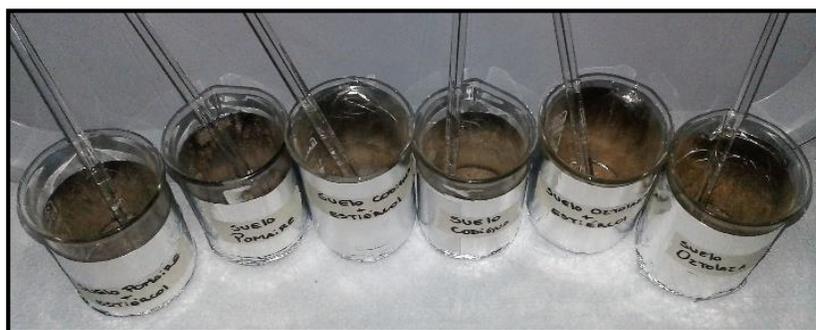


Figura 14. Muestras de suelos y suelos-estiércol para estudios de degradación.

➤ **Muestreo 1**

Se masaron 10 g de cada suelo (Codigua, Melipilla y Pomaire) en duplicado y se colocaron en vasos precipitados. Los primeros 3 sistemas que eran solo de suelos se enriquecieron con 10 mg·kg⁻¹ de un multiestándar de las hormonas en estudio y se homogenizaron. Por otro lado, se masaron 3 g de estiércol, los cuales fueron enriquecidos a una concentración de 10 mgkg⁻¹, para esto fue necesario homogenizar el estiércol con el multiestándar en un rotavapor con un exceso de acetona durante 24 horas y dejarlo secar. Hecho esto se armó el sistema de suelo-estiércol, agregando el estiércol a concentración de 90 Mg·ha⁻¹ a cada suelo, como se muestra en la Tabla 5, obteniéndose diferentes valores de masa de estiércol para los tres suelos, debido a su densidad aparente.

Tabla 5. Estiércol agregado a cada suelo para obtener una concentración de 90 Mg·ha⁻¹.

Suelo	Codigua	Melipilla	Pomaire
Estiércol [g]	0,3	0,4	0,5

Durante el primer período de 30 días se realizaron 5 muestreos, cada uno en duplicado, en distintos tiempos, donde el primero se realizó al momento justo antes de comenzar la incubación, el segundo pasado 6 horas de incubación, el tercero a los 3 días, el cuarto a los 15 días y el último a los 30 días.

➤ **Muestreo 2**

En esta segunda etapa del estudio se siguió el mismo procedimiento de la primera etapa para enriquecer los suelos con $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ con un multiestándar de las hormonas en estudio. Sin embargo, para los sistemas de suelo-estiércol, el estiércol fue enriquecido con una concentración de $33,3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ del multiestándar, de tal forma que en el sistema suelo-estiércol quedara una concentración de $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, agregando el estiércol al suelo en una dosis de $90 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$.

Durante el período que se desarrolló el segundo estudio, se realizaron 8 muestreos, cada uno en duplicado, donde los muestreos fueron: a tiempo 0 y a las 2.5, 5, 10, 24, 48, 72 y 120 horas de incubación de las muestras.

Se tomaron muestras de 0,25 g las que fueron procesadas por la metodología analítica descrita en el punto 4.9 y analizadas en el GC-MS.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Identificación mediante GC-MS.

Para la identificación de las hormonas se realizó un barrido completo de masas en modalidad scan en el rango de 50-500 m/z y un monitoreo selectivo de iones. Obteniéndose los iones cualificadores y cuantificadores de cada analito, junto con su tiempo de retención (Tabla 6).

La confirmación del analito se realiza de acuerdo a la razón de la abundancia de ambos iones en la muestra, la cual debe corresponder al mismo valor que se ha determinado en un estándar ($\pm 20\%$), de lo contrario no se puede confirmar la presencia de éste en la muestra.

Tabla 6. Fragmentos cuantificador y cualificador de E1, E2 y EE2.

Analito	Ion Cuantificador [m/z]	Ion Cualificador [m/z]	Tiempo de retención [min]
<i>E1</i>	342	257	23,57
<i>E2</i>	416	285	23,86
<i>EE2</i>	285	425	24,76
<i>PCB 77</i>	292	290	19,95
<i>(3,4)¹³C₂ E1</i>	344	259	23,57

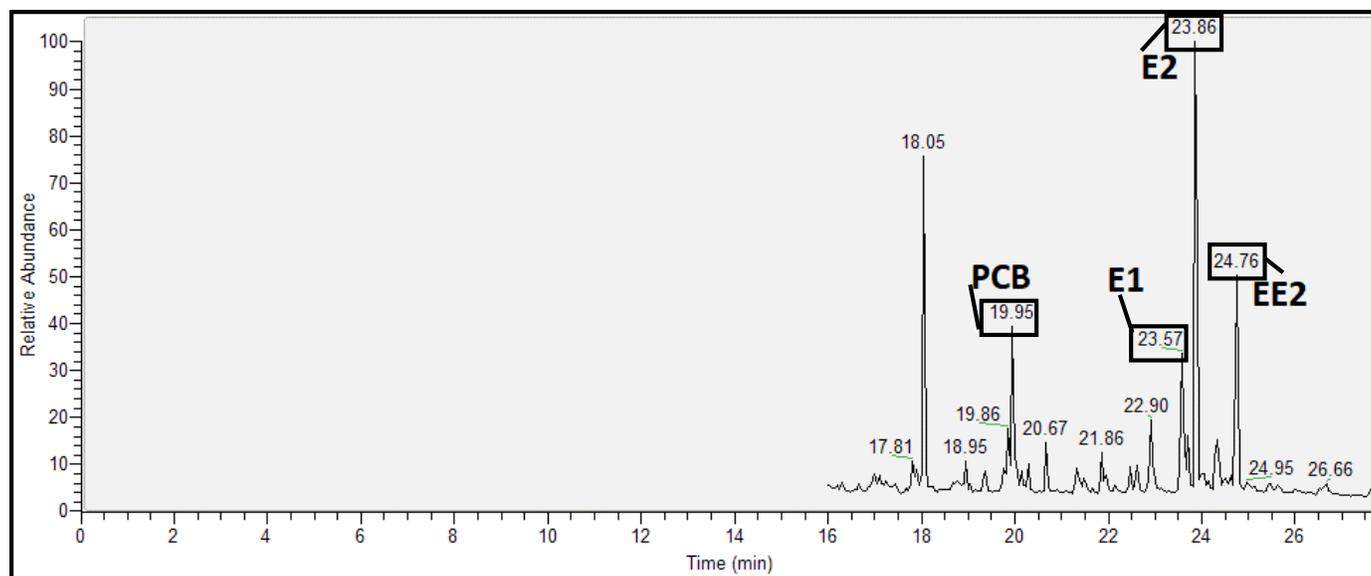


Figura 15. Cromatograma SIM para estándar interno PCB y hormonas E1, E2 y EE2 derivatizadas con piridina y MSTFA a 80°C.

5.2 Parámetros analíticos.

5.2.1 Parámetros instrumentales.

Para la validación instrumental se utilizaron estándares de las tres hormonas E1, E2 y EE2, con lo cual se determinó linealidad, límites de detección, de cuantificación y repetibilidad.

Para la linealidad se realizó una curva de calibración en duplicado con nueve puntos 2- 5- 10- 25- 50- 100- 300- 500 y 1000 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). (Tabla 7).

Tabla 7. Parámetros de las curva de calibración para E1, E2 y EE2.

	E1	E2	EE2
Pendiente	0,003	0,012	0,003
Intercepto	0,007	0,218	0,079
Coefficiente de Correlación [R]	0,999	1,000	0,999

Para obtener los límites de detección y de cuantificación (Tabla 8), se utilizó un multiestándar con las tres hormonas con concentración fija de $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, inyectado 10 veces, ya que se encontraba dentro del rango de concentración del límite de detección esperado. Para evaluar la repetibilidad (Tabla 8), se utilizó como parámetro el coeficiente de variación, utilizando una concentración de $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Las ecuaciones utilizadas para el cálculo de los límites de detección y cuantificación fueron las siguientes:

$$LD = 3 \cdot SD$$

(Ecuación 13)

$$LQ = 10 \cdot SD$$

(Ecuación 14)

Tabla 8. Límites de cuantificación y detección, desviación estándar y coeficiente de variación instrumentales para las hormonas E1, E2 y EE2.

	E1	E2	EE2
Promedio razón [analito/PCB]	14,1	9,8	10,0
SD	0,9	0,7	0,7
LD [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	2,8	2,1	2,2
LQ [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	9,2	6,9	7,5
C.V (%)	6,6	7,1	7,5

5.2.2 Parámetros de calidad analítica para la determinación de las hormonas en estiércol, suelos y plantas. Metodología 1.

Esta metodología se utilizó para la determinación y cuantificación de las hormonas en estiércol, suelos y plantas. Para la validación de la metodología se trabajó directamente con las matrices, enriqueciéndolas con un multiestándar de E1, E2 y EE2 a distintas concentraciones para obtener así una curva de calibración. Con esto se buscaba obtener los parámetros de calidad analítica: linealidad, límites de detección y cuantificación, repetibilidad y recuperación de la metodología.

En la etapa de clean up se utilizó un cartridge con fase sorbente Oasis HLB (Figura 16), debido a su polaridad, pudiendo descartar los contaminantes muy polares y los más apolares, por tanto, con los solventes utilizados fue posible aislar los analitos y eliminar la mayor cantidad de interferencias que pudiesen tener las muestras.

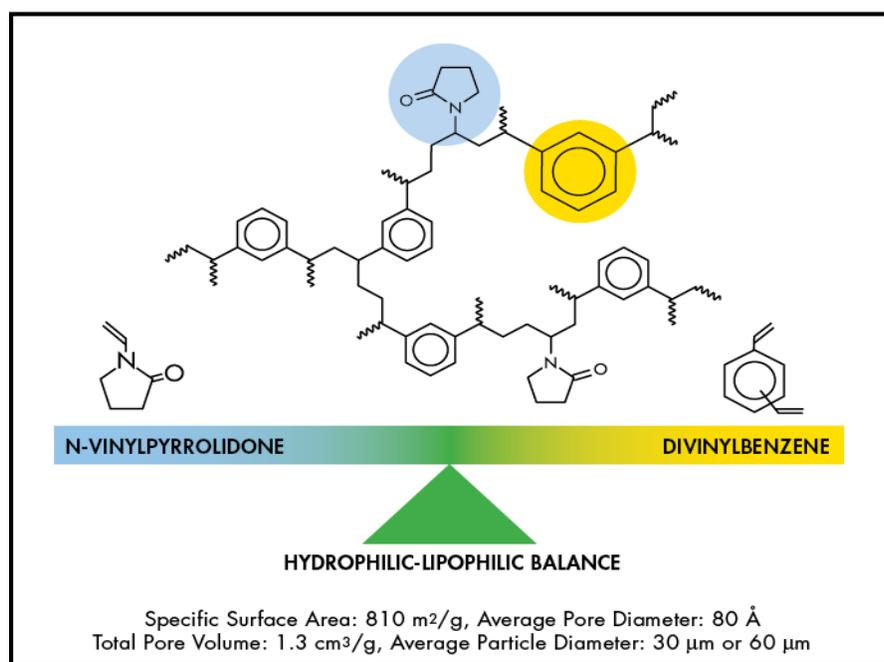


Figura 16. Estructura química de fase sorbente Oasis HLB.

Para evaluar la linealidad se realizó una curva de calibración con 8 puntos: 10- 25- 50- 100- 300- 500- 1000 y 1500 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), utilizando como matriz un extracto de estiércol de caballo (Tabla 9).

Tabla 9. Parámetros de la curva de calibración con matriz para E1, E2 y EE2 en metodología 1.

	E1	E2	EE2
Pendiente	0,001	0,003	0,002
Intercepto	0,003	-0,124	-0,094
Coefficiente de correlación [R]	0,998	0,993	0,992

Para obtener la recuperación y los límites de detección y de cuantificación, se utilizó una matriz enriquecida con 0.6 mg·kg⁻¹ del multiestándar de las tres hormonas, replicado 10 veces, ya que era la concentración que se esperaba pasado un mes en el tiempo de degradación de las hormonas en contacto con el suelo, el cálculo se realizó utilizando las ecuaciones 13 y 14. Para calcular la repetibilidad se utilizó como parámetro el coeficiente de variación (Tabla10).

Tabla 10. Límites de cuantificación y detección, desviación estándar, coeficiente de variación y recuperación de la metodología 1 para las hormonas E1, E2 y EE2.

	E1	E2	EE2
Concentración promedio [mg·kg⁻¹]	0,552	0,531	0,540
SD	0,008	0,003	0,005
LD [mg·kg⁻¹]	0,017	0,010	0,014
LQ [mg·kg⁻¹]	0,055	0,033	0,047
C.V [%]	9,7	1,7	2,2
Recuperación [%]	94,3	89,1	90,4

5.2.3 Parámetros de calidad analítica para la metodología de extracción de las hormonas con ciclodextrina en suelos. Metodología 2.

Esta metodología se utilizó para realizar el ensayo biosimulador con HPCD. Para su validación, se trabajó directamente con las matrices de suelos, las que fueron enriquecidas con un multiestándar de E1, E2 y EE2 a distintas concentraciones para obtener así una curva de calibración y posteriormente se realizó la extracción de los analitos con la solución de HPCD para la determinación de los parámetros de calidad analítica. Para la linealidad (Tabla 11) se realizó una curva de calibración con ocho puntos: 5- 10- 50- 100- 500 y 1000 (µg·L⁻¹), utilizando como matriz un extracto de suelo.

Tabla 11. Parámetros de la curva de calibración con matriz para E1, E2 y EE2 en metodología 2.

	E1	E2	EE2
Pendiente	0,007	0,004	0,008
Intercepto	0,071	-0,092	-0,130
Coefficiente de correlación [R]	1,000	0,985	0,996

Para obtener la recuperación, y los límites de detección y de cuantificación, se utilizó una matriz de suelo enriquecida con $0,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ del multiestándar de las tres hormonas, replicado diez veces, ya que era la concentración que se esperaba estuviese cercana al límite de detección. Para calcular la repetibilidad se utilizó como parámetro el coeficiente de variación (Tabla 12).

Tabla 12. Límites de cuantificación y detección, desviación estándar, coeficiente de variación y recuperación de la metodología 2 para las hormonas E1, E2 y EE2.

	E1	E2	EE2
Concentración promedio [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$]	0,581	0,543	0,549
SD	0,005	0,007	0,009
LD [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$]	0,014	0,021	0,027
LQ [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$]	0,046	0,071	0,089
C.V [%]	9,67	3,21	5,86
Recuperación [%]	97,3	91,4	92,2

Con los resultados obtenidos, la metodología 1 resultó ser más sensible, lográndose límites de detección y cuantificación más pequeños para las hormonas E2 y EE2, para la E1, los límites de detección y cuantificación en ambas metodologías fueron parecidos, siendo levemente menores los de la metodología 2. Con respecto a las repetibilidades, en las dos metodologías fueron adecuadas, siendo la repetibilidad en la metodología 1 mejor, con coeficientes de variación menores que la metodología 2, sin embargo, para la E1 el valor del coeficiente de variación fue igual en ambas. Los valores de linealidad, representados por el coeficiente de correlación, en ambas metodologías fueron en su mayoría mayores a 0,990, siendo mejor la metodología 1 para la E2 ($R = 0,993$) y la metodología 2 para la E2 ($R = 1,000$) y la EE2 ($R = 0,996$). En cuanto a las recuperaciones de las metodologías, se obtuvieron valores por sobre el 89% en ambas metodologías para

las tres hormonas, siendo la metodología 2 la que presentó mejores valores de recuperaciones para las hormonas por sobre 92% para todas. Durante el desarrollo del trabajo se utilizó un subrogate (3,4)¹³C₂ E1 para calcular la recuperación de los compuestos en ambas metodologías.

5.3 Caracterización química y física de los estiércoles y los suelos.

Tal como se muestra en la Tabla 13 los tres suelos muestran pH relativamente alcalino ($\geq 7,60$), Codigua es el suelo que presenta menor conductividad y menor CIC, sin embargo, es el suelo que presenta un mayor contenido de materia orgánica y de textura arenosa. Por otro lado, Melipilla y Pomaire presentaron una textura franco arenosa. Siendo Melipilla el suelo que presentó menor pH, mayor CIC y mayor contenido de N total. Pomaire en cambio fue el suelo de mayor pH y menor contenido de materia orgánica.

La materia orgánica proporciona un efecto tamponante en el suelo, por tanto se produciría un efecto protector al evitar que las bases intercambiables se pierdan por lixiviación. (Villaroel, 2012). El N es considerado uno de los macronutrientes que limitan en mayor medida el desarrollo de los cultivos, cerca del 95% de éste, está asociado a la materia orgánica. (Shulten, 1998).

Tabla 13. Características fisicoquímicas de suelos, Codigua, Melipilla y Pomaire.

Parámetro	Codigua	Melipilla	Pomaire
pH	7,69	7,60	7,74
Conductividad [dS·m ⁻¹]	0,07	0,19	0,11
Capacidad de intercambio catiónico [cmol·kg ⁻¹]	13,9	25,9	18,3
Carbono orgánico [%]	2,47	2,15	1,71
Materia orgánica [%]	4,25	3,71	2,95
Textura	Arenosa	Franco arenosa	Franco arenosa
% Arena	87,4	67,4	61,4
% Limo	8,56	22,6	24,6
% Arcilla	4,00	10,0	14,0
Nitrógeno total [%]	0,10	0,28	0,12
Densidad aparente [g·mL ⁻¹]	1,47	1,27	1,29
Factor de humedad	0,91	1,12	1,50

En la Tabla 14 se muestran las concentraciones de metales pesados en los tres suelos, donde todos los suelos se encuentran dentro de la norma de máxima concentración de metales permitida en suelos según el D.S. 004/2009. Por tanto, se podrá agregar estiércol en dosis de 90 ton/ha por año (base materia seca). (G-PR-GA-004 versión 3, 2008).

Tabla 14. Concentración de metales en suelos Codigua, Melipilla y Pomaire.

Metal	Codigua [mg·kg⁻¹]	Melipilla [mg·kg⁻¹]	Pomaire [mg·kg⁻¹]	Concentración máxima permitida en suelos [mg·kg⁻¹]
Cd	0,17 ± 0,02	0,07 ± 0,02	0,05 ± 0,01	2
Ni	12,9 ± 1,01	30,8 ± 2,94	5,94 ± 0,31	112
Pb	15,1 ± 1,50	13,2 ± 1,12	13,8 ± 1,09	75
Cr	87,5 ± 6,23	109 ± 9,02	102 ± 1,01	*
Cu	36,6 ± 3,14	44,6 ± 4,3	56,3 ± 4,91	150
Zn	129 ± 15,4	156 ± 13,2	154 ± 14,3	175

* No regulado en el decreto supremo 004/2009.

En la Tabla 15 se muestran las propiedades de los estiércol de cerdo, vacuno y caballo. Donde los tres cumplen con la ley 20.089, decreto 2, art. 2.7.4 para ser aplicados en suelos agrícolas.

El estiércol de caballo es el que aporta mayor cantidad de materia orgánica y presenta el mayor pH. En general los tres estiércoles son una buena fuente de carbono orgánico, sin embargo para el desarrollo de este trabajo de tesis, se eligió el estiércol de caballo, por presentar mayor pH, alto contenido de carbono orgánico, y conductividad promedio entre los tres estiércoles.

Tal como se muestra en la Tabla 15 la cantidad de nitrógeno total se encuentra inversamente relacionada con el pH, por tanto, a mayor cantidad de nitrógeno se presenta un menor pH (Marín N, 2016).

Tabla 15. Propiedades fisicoquímicas de los estiércoles de caballo, cerdo y vacuno.

Parámetro.	Caballo	Cerdo	Vacuno
pH	8,65	6,22	6,77
Conductividad [dS·m⁻¹]	3,95	5,38	2,79
Carbono orgánico [%]	45,1	43,0	36,3
Nitrógeno total [%]	1,55	3,28	1,97

5.4 Determinación de la concentración de las hormonas E1, E2 y EE2 en estiércol de vacuno, caballo y cerdo.

Se analizaron los tres estiércoles, de cerdo, caballo y vacuno, donde en los tres se detectó la presencia de las hormonas naturales E1 y E2 en distintas concentraciones, tal como se muestra en la Tabla 16. La concentración de la hormona sintética EE2 en el estiércol de caballo y vacuno estuvo bajo el límite de detección y de cuantificación, respectivamente, encontrándose presente solo en el estiércol de cerdo.

Tabla 16. Concentración de E1, E2 y EE2 en estiércoles de caballo, vacuno y cerdo.

Estiércol	E1 [mg·kg ⁻¹]	E2 [mg·kg ⁻¹]	EE2 [mg·kg ⁻¹]
Caballo	0,48 ± 0,09	0,08 ± 0,03	< LD
Vacuno	0,12 ± 0,03	0,15 ± 0,04	< LQ
Cerdo	0,24 ± 0,03	0,13 ± 0,01	0,10 ± 0,02

Los tres suelos también fueron analizados para la determinación de las tres hormonas, no encontrándose la presencia de ninguna de ellas.

5.5 Determinación de la fracción biodisponible de E1, E2 y EE2 en plantas de trigo, cultivadas en suelos enmendados con estiércol.

La biodisponibilidad y distribución de los contaminantes orgánicos que se encuentran en los suelos está sujeta a las propiedades fisicoquímicas de los compuestos, de los suelos, y de las características que presenten las plantas y las condiciones climáticas en que éstas se desarrollan. Para esto se debe considerar las propiedades fisicoquímicas de las hormonas (Tabla 3) y las características fisicoquímicas de los suelos (Tabla 13).

En este estudio se analizaron tanto las raíces, como la parte aérea de las plantas de trigo (Figura 13) que fueron cultivadas en los suelos tratados con estiércol de caballo natural y enriquecido con las tres hormonas. El agregado del estiércol fue en una dosis de 90 Mg·ha⁻¹.

Los resultados de los cultivos en suelos tratados con estiércol enriquecido, muestran que los tres compuestos, E1, E2 y EE2 se encontraron solo en las raíces de las plantas (anexo Tabla 23) y no fueron detectados en la parte aérea de éstas, tal como se muestra en la Figura 17. Esto se puede deber al carácter lipofílico que presentan las raíces, según estudios, existe una correlación positiva en el factor de bioconcentración y la cantidad de lípidos en la raíz de las plantas (Gao YZ, 2004), por tanto, los compuestos orgánicos hidrofóbicos pueden quedar retenidos en las raíces y no en la parte aérea que es de carácter hidrofóbico.

Los aniones en general son difíciles de absorber por las plantas, esto porque las células tienen un potencial eléctrico negativo en la membrana celular por lo que ocurriría una repulsión entre ambos (Wu, 2013). Debido a que las tres hormonas se encuentran en estado protonado, ya que los pK_a son 10,34 – 10,23 y 10,05 para E1, E2 y EE2 respectivamente, y los pH de los suelos fluctuaban entre 7,6 y 7,8; es factible que las células de las raíces absorbieran los compuestos neutros, y al no ser tan solubles en agua, ya que el Kow de los analitos es mayor a 3 y nos indica una mediana polaridad, estos podrían quedar retenidos en las raíces no traslocándose a la parte aérea del trigo.

En los cultivos en suelo sin estiércol y en los con estiércol sin enriquecer, no se detectó ninguna de las tres hormonas, ni en las raíces, ni en la parte aérea. En estos últimos cultivos a pesar de que el estiércol contenía de forma natural E1 y E2, la concentración de estas hormonas estaba bajo el límite de detección del método, debido a la dosis en que fue agregado el estiércol al suelo.

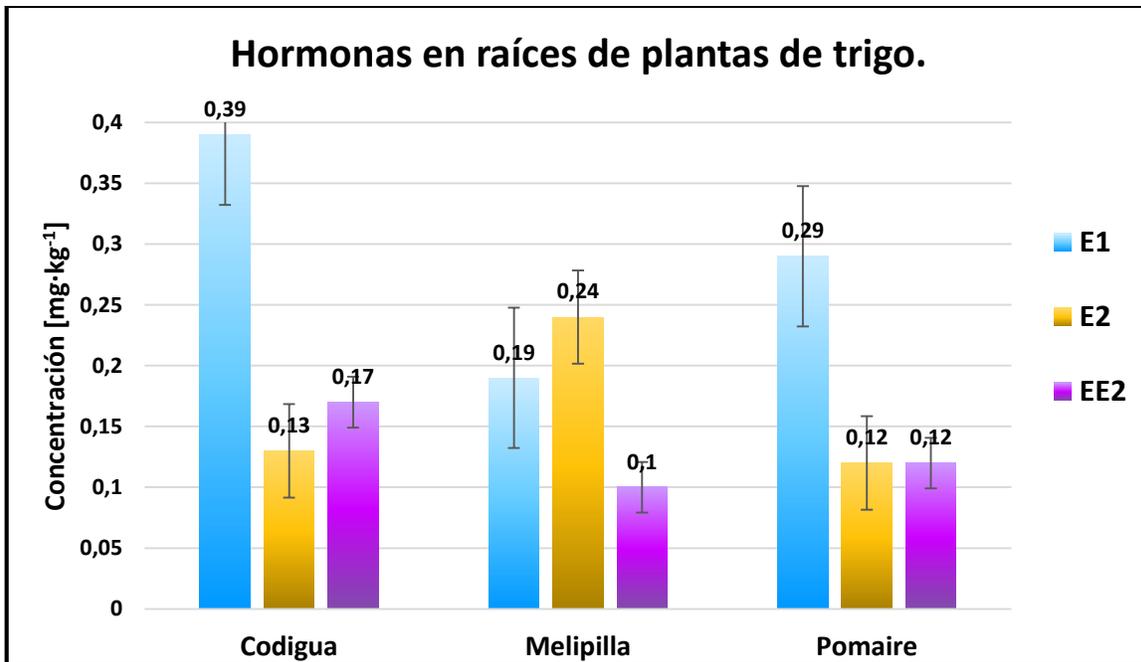


Figura 17. Concentración de hormonas en las raíces de las plantas, cultivadas en los tres suelos con estiércol enriquecido.

Según los resultados que se aprecian en la Figura 17, las plantas cultivadas en el suelo Codigua fueron las de mayor absorción de las hormonas estrogénicas, a pesar que es el que posee mayor cantidad de materia orgánica, ya que según estudios previos la materia orgánica ayudaría reducir la concentración de compuestos orgánicos biodisponibles (Stumpe B, 2010). La particularidad de éste suelo en comparación a Melipilla y Pomaire es que posee textura arenosa, por lo tanto, los compuestos quedan menos retenidos, facilitándose de esta manera la sorción en las raíces.

La estrona (E1) fue la hormona con mayor presencia en las raíces de los suelos de Codigua y Pomaire, esto se puede explicar por la degradación oxidativa que podría ocurrir desde E2 a E1, esta degradación es más rápida que la degradación de estrona a estriol (E3), por tanto, aumentan los niveles de concentración de E1 en el tiempo y disminuyen los de E2 (Prater J, 2015). En el suelo Melipilla la concentración de E1 y E2 son relativamente similares, sin embargo, la concentración de EE2 es menor y se comporta de forma similar que en el suelo Pomaire.

Según los resultados obtenidos de las correlaciones lineales simples entre las hormonas y las características de los suelos que se muestran en la Tabla 17, la única hormona que se correlacionó de forma positiva con la cantidad de materia orgánica en los suelos es la EE2, obteniéndose un p-value de 0,0341. En la correlación con la capacidad de intercambio catiónico, la E1 y la EE2 correlacionaron de forma positiva, obteniéndose p-value de 0,0077 y 0,05 respectivamente. La correlación con la conductividad eléctrica resultó ser positiva sólo para la E1, con un p-value de 0,0092. Por último, al correlacionar con el valor del pH solo resultó significativo para la E2 con un p-value de 0,0349. Por tanto, para poder justificar los valores obtenidos se debe tener en cuenta que la interacción entre el compuesto y el suelo, depende tanto del analito como de la característica fisicoquímica del suelo a la que se asocie.

Tabla 17. Valores de p-value para la correlación simple entre las hormonas E1, E2 y EE2 y las características de los suelos.

Característica	p-value E1	p-value E2	p-value EE2
Materia orgánica	0,4060	0,5549	0,0341
CIC	0,0077	0,4769	0,0500
Conductividad	0,0092	0,4381	0,0606
pH	0,5854	0,0349	0,8059

5.6 Determinación del factor de bioacumulación de E1, E2 Y EE2 en plantas de trigo.

El factor de bioconcentración (FCB) está definido como la medida de la capacidad de una sustancia presente en un medio para acumularse en los tejidos de los organismos. Se calcula como el cociente entre la concentración de la sustancia en los tejidos y la concentración en el medio. Se produce acumulación cuando FBC es mayor que uno (Repetto M, Sanz P.,1993). En el caso de este trabajo, sería la concentración de las hormonas presente en las raíces, con respecto a la concentración de éstas en el suelo. Se calcula tal como lo muestra la Ecuación 15.

$$FBC = \frac{\text{Concentración en el tejido de la planta (mg * kg}^{-1}\text{)}}{\text{Concentración en el suelo (mg * kg}^{-1}\text{)}}$$

(Ecuación 15)

Los valores de FBC en las raíces de las plantas cultivadas en los distintos suelos con estiércol enriquecido, se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Factor de bioconcentración en raíces cultivadas en suelos Codigua, Melipilla y Pomaire.

Hormona	Concentración suelo [mg·kg ⁻¹]	Concentración raíz [mg·kg ⁻¹]	FBC
Codigua			
E1	0,27	0,39	1,44
E2	0,27	0,13	0,48
EE2	0,27	0,23	0,85
Melipilla			
E1	0,39	0,19	0,49
E2	0,39	0,24	0,62
EE2	0,39	0,10	0,26
Pomaire			
E1	0,54	0,29	0,54
E2	0,54	0,12	0,22
EE2	0,54	0,12	0,22

Los valores de FBC obtenidos, muestran que las tres hormonas poseen una baja biodisponibilidad, debido a que todos los resultados obtenidos son menor que uno, con excepción de la E1 en el suelo Codigua, en donde el resultado de 1,44, lo que nos indica que este compuesto en este suelo, es más biodisponible que las otras hormonas para las plantas de trigo. Esto podría ser debido a la degradación que ocurre de E2 a E1, por lo que se estaría acumulando mayor concentración de E1 gracias a la absorción de esta misma y la degradación de E2. Esto ocurriría en mayor proporción en el suelo Codigua debido a que la textura de este suelo es arenosa, presentando un menor porcentaje de arcilla y limo, 8,56 y 4,00% respectivamente, por lo tanto, este suelo tendría menor cantidad de sitios disponibles para la retención de los analitos, quedando menos retenidos en el suelo,

lo que facilitará su absorción por las raíces. También se puede apreciar este mismo comportamiento en la EE2 en este mismo suelo, ya que se obtiene un valor mayor (0,85) en comparación a Melipilla y Pomaire.

En el suelo Melipilla y Codigua que poseen características similares, la hormona con menor FBC fue la EE2, la que posee un valor de Kow de 4,15, lo que indica que tiene una mayor afinidad a la materia orgánica que se encuentra en el suelo, por lo que ésta quedaría mayormente retenida en ella. En promedio de los tres suelos la hormona que presentó mayor valor de FBC fue la E1 con 0,88, lo que concuerda con el valor de su Kow de 3,43 siendo el menor de las tres hormonas, lo que nos indicaría que sería menos a fin a la materia orgánica del suelo y sería absorbida por las raíces con mayor facilidad.

El FBC solo se calculó en las raíces de las plantas que fueron cultivadas en suelos enmendados con estiércol de caballo, debido a que en las partes aéreas no se detectó ninguno de los analitos. Por lo tanto, tal como se explicó anteriormente, como las hormonas presentes en el suelo se encuentran protonadas, presentan carácter lipofílico, por lo que quedan retenidas en las raíces y no serían traslocadas a las hojas.

5.7 Determinación de la biomasa en las plantas de trigo.

Para evaluar si las hormonas E1, E2 y EE2 pudiesen afectar el crecimiento de las plantas, se determinó la biomasa en raíces y hojas de las plantas de trigos cultivadas en los tres suelos sin enmienda y los mismos enmendados con estiércol de caballo natural y enriquecido, como se muestra en la Tabla 19.

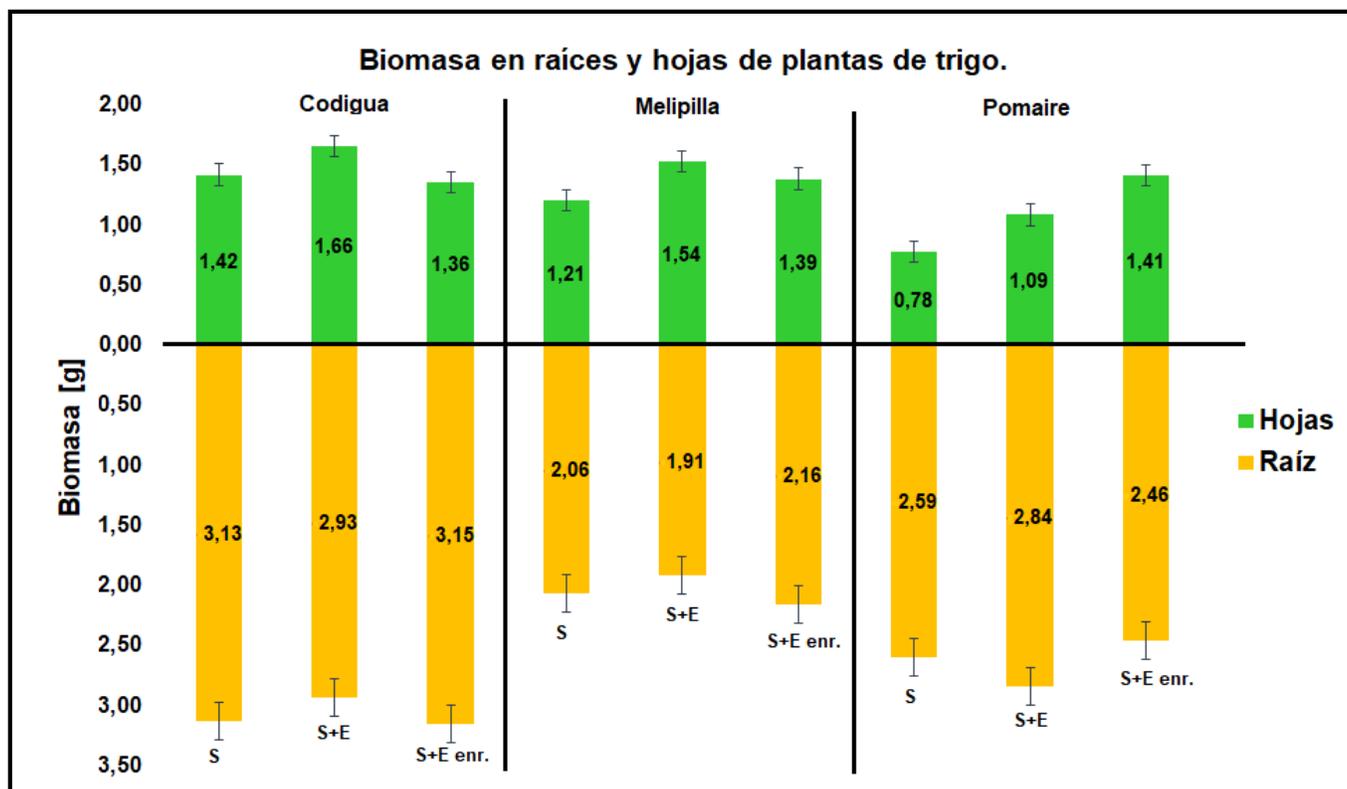
Tabla 19. Biomasa en raíces y hojas de las plantas de trigo cultivadas en suelos Codigua, Melipilla y Pomaire.

Biomasa [g]			
	Codigua	Melipilla	Pomaire
<i>Suelos sin estiércol</i>			
<i>Raíz</i>	3,13 ± 0,28	2,06 ± 0,07	2,59 ± 0,09
<i>Hojas</i>	1,42 ± 0,15	1,21 ± 0,12	0,78 ± 0,15
<i>Suelos + Estiércol</i>			
<i>Raíz</i>	2,93 ± 0,61	1,91 ± 0,40	2,84 ± 0,25
<i>Hojas</i>	1,66 ± 0,37	1,87 ± 0,41	1,09 ± 0,27
<i>Suelos + Estiércol Enriquecido</i>			
<i>Raíz</i>	3,15 ± 0,47	2,16 ± 0,12	2,46 ± 0,44
<i>Hojas</i>	1,36 ± 0,07	1,39 ± 0,22	1,41 ± 0,30

Según los valores obtenidos en la Tabla 19, considerando las desviaciones estándar de cada uno, la biomasa en las raíces y en las hojas de los tres suelos comparadas con la de los suelos enmendados con estiércol enriquecido y sin enriquecer, no varía de forma notable, por lo que la presencia de las tres hormonas, ni el mayor aporte de materia orgánica por parte de los estiércoles, afectarían el crecimiento de las raíces y las hojas. Para comprobar esto se realizó una prueba ANOVA con test de intervalo múltiple para calcular si existían diferencias (anexo Tabla 25), lo cual nos indicó que no existía una diferencia estadísticamente significativa entre las masas de las hojas y raíces de los tres sistemas utilizados (suelo, suelo+ estiércol y suelo + estiércol enriquecido) para los tres suelos, con un valor de p-value de 0,6292. Y por otro lado, el test nos indica que si existe una diferencia estadísticamente significativa para los valores de masas entre hojas y

raíces en las plantas de un mismo suelo, y para los valores de hojas y raíces en los tres suelos con valores de p-value de 0 y 0,0008 respectivamente.

Por tanto, en base a los resultados obtenidos y tal como se aprecia en la Figura 18, agregar estiércol a un suelo y estiércol enriquecido con hormonas, no afectaría la biomasa de las plantas, tanto raíces como parte aérea, sin embargo, el tipo de suelo si influiría en estas.



- **S:** Suelo sin estiércol.
- **S + E:** Suelo + estiércol natural.
- **S + E enr. :** Suelo + estiércol enriquecido con E1, E2 y EE2.

Figura 18. Biomazas en raíces y hojas de plantas de trigo cultivadas en suelos Codigua, Melipilla y Pomaire.

5.8 Estimación de la fracción biodisponible mediante la extracción de las hormonas con un método biosimulador con ciclodextrina.

Se ha demostrado que debido a las propiedades fisicoquímicas que poseen las ciclodextrinas (CDs), se pueden utilizar como método biosimulador de extracción de contaminantes orgánicos lipofílicos desde distintas matrices, tales como los suelos. (Mura P, 2014). Una de las características más importante de las ciclodextrinas se refiere a la distribución de los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. Debido a que los grupos hidrofílicos del hidroxilo ocupan ambos bordes del cono, la CD es soluble en agua. El interior de la cavidad, sin embargo, es de carácter hidrofóbico puesto que está cubierto por los hidrógenos de los grupos metilo y por los oxígenos tipo éter. Por tanto, las cavidades proporcionan una matriz hidrofóbica en la solución acuosa (Contreras, 2001).

Existen distintos tipos de ciclodextrinas, las tres principales son, α -ciclodextrina, β -ciclodextrina y γ -ciclodextrina, las cuales poseen seis, siete y ocho unidades de glucopiranosas respectivamente. Cada una de estas ciclodextrinas puede formar complejos de inclusión con moléculas de distintas características, la α -ciclodextrina puede formar complejos con halógenos, compuestos con cadenas alifáticas laterales, alcoholes y moléculas orgánicas alifáticas de baja masa molecular, la β -ciclodextrina puede formar complejos con heterociclos, fenantrenos y compuestos aromáticos, y la γ -ciclodextrina puede incluir en su cavidad moléculas como esteroides y macrociclos (Del Valle E.M. M., 2003).

A partir de las δ -ciclodextrina, que poseen nueve o más unidades de glucosas, las ciclodextrinas son tan grandes que no tienen estructuras en forma de cono truncado, sino que colapsan y su cavidad es incluso más pequeña que la de γ -ciclodextrina. De esta manera, y aunque tiene cavidades grandes, las ciclodextrinas con más de ocho unidades de glucosa no muestran evidencia de la formación de complejos de inclusión, la estructura elíptica de las δ -ciclodextrina se tuerce para aliviar el impedimento estérico y la distorsión del enlace glucosídico (Contreras, 2001).

Debido a estas razones, la β -ciclodextrina es la más idónea para formar complejos de inclusión y extraer las hormonas esteroideas E1, E2 y EE2 desde los suelos. Sin embargo, la β -ciclodextrina posee una baja solubilidad en agua (1,85 % w/v a 25°C), por tanto, se seleccionó por su mayor solubilidad en agua a la hidroxipropil- β -ciclodextrina.

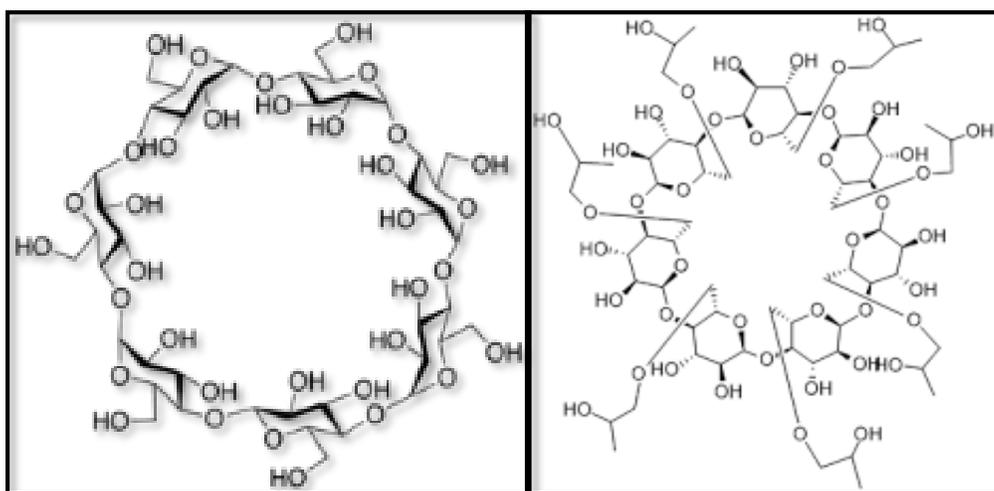


Figura19. Estructura de β -ciclodextrina y hidroxipropil- β -ciclodextrina (HPCD).

Los resultados obtenidos con el método biosimulador con HPCD (Figura 20), indican que desde los tres suelos, Codigua, Melipilla y Pomaire con estiércol enriquecido con los analitos, se logró extraer las tres hormonas en distintas concentraciones (anexo Tabla 24). Esto se debe a que como se vio anteriormente, las hormonas se encuentran en su mayoría protonadas debido a su pKa y a los pH de los suelos. Como la concavidad de la HPCD es de carácter lipofílico, se facilitaría la extracción de las hormonas en estado neutro, formando complejos de inclusión solubles en agua.

En los suelos Melipilla y Pomaire se extrajo un contenido similar de hormonas, menor al extraído en el suelo Codigua que corresponde con lo encontrado en las raíces de las plantas de trigo cultivadas en estos suelos. El patrón de extracción es similar al de las raíces de las plantas de trigo. La estrona es la hormona que más se logra extraer, esto se puede deber a la degradación que ocurre de E2 a E1, ya que el pKa de este compuesto es el mayor de las tres hormonas, encontrándose en

mayor cantidad protonada, lo cual facilita su extracción. En el suelo Codigua esta hormona se encuentra más biodisponible que en los otros suelos, lo cual puede atribuirse a que la textura de este suelo es arenosa, por lo que los compuestos están más fácilmente accesibles a algún agente extractante, debido a que el contenido de limo y arcilla, que son partículas de menor tamaño, se encuentran en menor porcentaje, y las partículas de arena, que son de mayor tamaño, se encuentra sobre un 80% lo que facilita la lixiviación y/o absorción de los analitos por la HPCD. Ya que existiría una menor área superficial de contacto entre las partículas de suelo y el compuesto, por lo que quedaría menos retenido.

Tal como se aprecia en la Figura 20 las concentraciones de hormonas extraídas no tienen una gran variación entre ellas, con excepción de la E1 en Codigua.

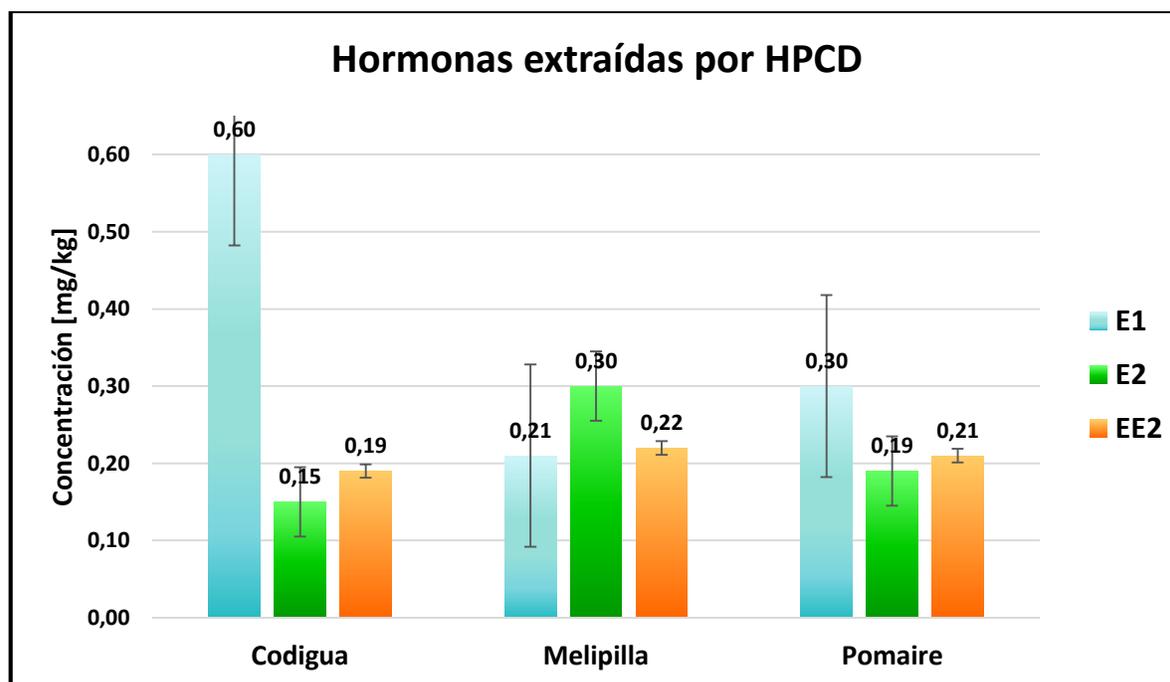


Figura 20. Extracción de hormonas E1, E2 y EE2 con HPCD en los tres suelos con estiércol enriquecido.

En los suelos sin estiércol y en los con estiércol sin enriquecer no se detectó ninguna de las tres hormonas. En estas últimas muestras a pesar de que el estiércol si contenía de forma natural E1 y E2, la concentración de estas hormonas estaba bajo

el límite de detección del método, debido a la dosis en que se agregó el estiércol al suelo.

5.9 Determinación del factor de bioacumulación de E1, E2 Y EE2 en HPCD.

Tal como se realizó con las raíces de las plantas de trigo en el punto 5.6, se determinó el factor de bioconcentración de las hormonas, en los tres suelos, con la HPCD. Utilizando la Ecuación 15 se obtuvieron los valores de factor de bioconcentración en los suelos con estiércol enriquecido en hormonas como se muestra en la Tabla 20.

Tabla 20. Factor de bioconcentración de las hormonas E1, E2 y EE2 determinado por extracción con HPCD.

Hormonas	Concentración en Suelo [mg·kg ⁻¹]	Concentración en HPCD [mg·kg ⁻¹]	FBC
Suelo Codigua			
<i>E1</i>	0,27	0,60	2,22
<i>E2</i>	0,27	0,15	0,56
<i>EE2</i>	0,27	0,19	0,70
Suelo Melipilla			
<i>E1</i>	0,39	0,21	0,54
<i>E2</i>	0,39	0,30	0,77
<i>EE2</i>	0,39	0,22	0,56
Suelo Pomaire			
<i>E1</i>	0,54	0,30	0,56
<i>E2</i>	0,54	0,19	0,35
<i>EE2</i>	0,54	0,21	0,39

Tal como se aprecia en la Tabla 20, la única hormona biodisponible en HPCD fue la estrona en el suelo Codigua, obteniéndose un valor de 2,22 de FBC. Para las demás hormonas en los tres suelos, no se encontraron valores que correspondan a una alta biodisponibilidad, siendo todos menores a uno. Los valores en el suelo Codigua fueron los más elevados, lo que concuerda con los resultados obtenidos anteriormente en la extracción con ciclodextrina y con los valores en las raíces de las plantas de trigo.

5.10 Validación del método biosimulador con ciclodextrina, con respecto a la concentración de las hormonas en plantas de trigo.

Se realizó una correlación a través del test de correlación lineal simple entre la extracción de las hormonas con el método biosimulador de ciclodextrina y la extracción con las plantas de trigo, en este caso, solo con las raíces de las plantas, ya que fue el único sitio donde se detectó la presencia de las hormonas. Para esto se tomaron los datos que se obtuvieron del triplicado de los cultivos, por tanto, se trabajó con 9 datos para las raíces y 9 para las ciclodextrina, mostrándose en la Tabla 21 el promedio de los datos de concentraciones obtenidas.

Tabla 21. Correlación del método de extracción biosimulador y las plantas de trigo en suelos Codigua, Melipilla y Pomaire.

Suelo	Raíz [mg·kg ⁻¹]	HPCD [mg·kg ⁻¹]	Ecuación	p-value	Coefficiente de correlación de Pearson
E1					
Codigua	0,39	0,60	Raíz=0,0499789 + 0,578447 * HPCD	0,0001	0,9915
Melipilla	0,19	0,21			
Pomaire	0,29	0,30			
E2					
Codigua	0,13	0,15	Raíz=0,0099505 + 0,804455 * HPCD	0,0098	0,9180
Melipilla	0,24	0,30			
Pomaire	0,12	0,19			
EE2					
Melipilla	0,1	0,22	Raíz=-0,0516176 + 0,735294 * HPCD	0,0099	0,9901
Pomaire	0,12	0,21			

El análisis de la Tabla 21 nos indica que se obtuvieron buenos coeficientes de correlación para las tres hormonas, en los tres suelos, todos con un valor superior a 0,91. Con respecto a los valores obtenidos de p-value fueron todos menor a 0,05, lo que indica que existe una relación estadísticamente significativa entre la extracción de las hormonas con ciclodextrina y la extracción de las hormonas con la raíz de la planta de trigo, en un nivel de confianza del 95%.

Según los resultados obtenidos de la correlación lineal entre los dos tipos de extracciones, con ciclodextrina y con planta de trigo, el método de extracción con ciclodextrina se valida como método biosimulador del contenido de hormonas en las raíces de plantas de trigo, debido a que se obtuvo una buena correlación entre ambos métodos. Los resultados obtenidos con la HPCD son levemente mayores que los de las raíces, sin embargo, el método biosimulador no sobreestimaría la concentración de hormonas extraídas, ya que los valores se encuentran en el mismo orden de magnitud.

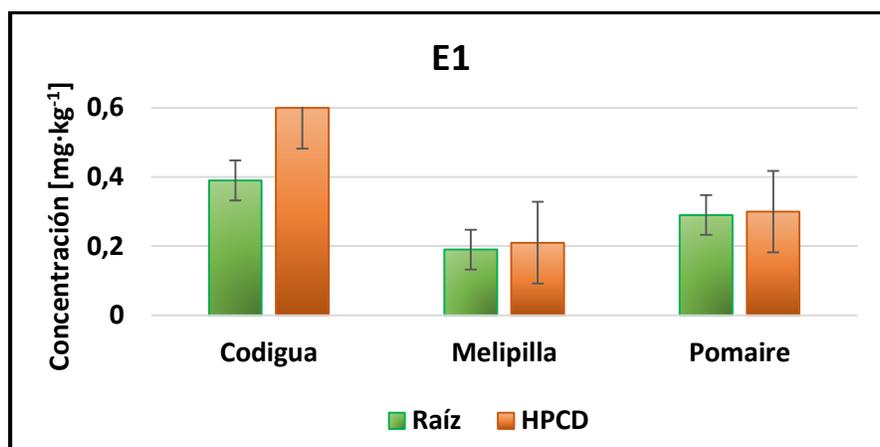


Figura 21. Concentración de E1 extraída con la raíz de la planta de trigo y con HPCD en los tres suelos.

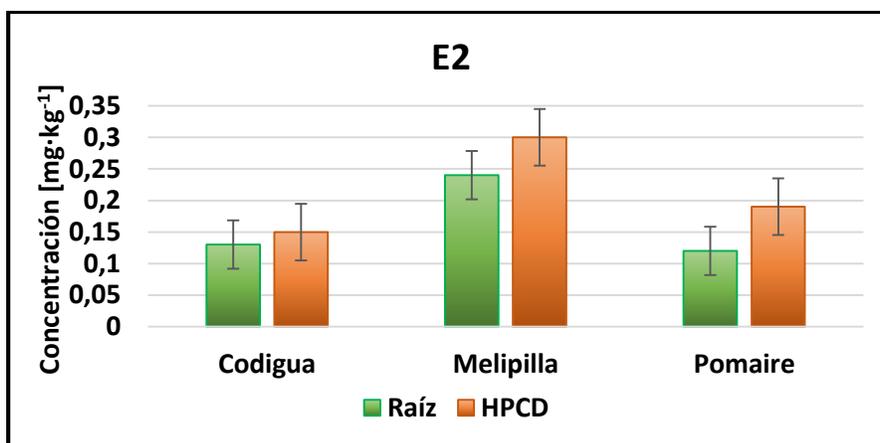


Figura 22. Concentración de E2 extraída con la raíz de la planta de trigo y con HPCD en los tres suelos.

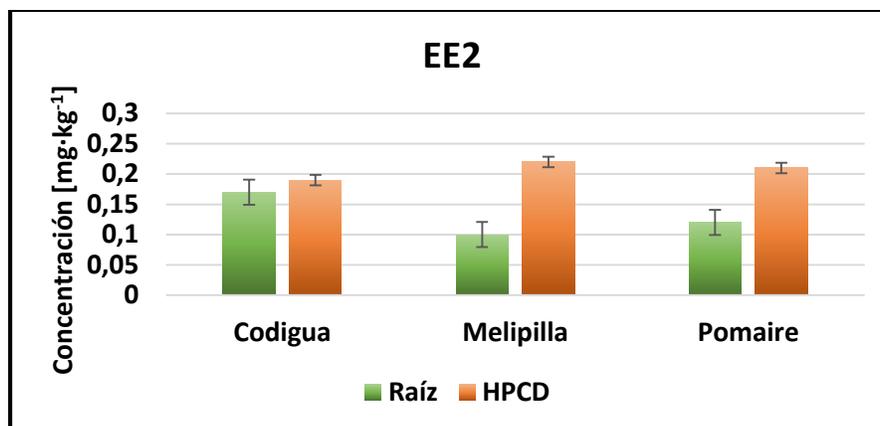


Figura 23. Concentración de EE2 extraída con la raíz de la planta de trigo y con HPCD en los tres suelos.

Respecto de la correlación lineal de la hormona EE2 se obtuvieron buenos resultados para los suelos Melipilla y Pomaire. Sin embargo, al correlacionarlos con los valores de EE2 del suelo Codigua, se obtenía un valor de p-value mayor a 0,05, lo que nos indicaba que no existía una relación estadísticamente significativa entre los valores de los tres suelos.

Las Figuras 21, 22 y 23 muestran el contenido de las hormonas extraídas desde la raíz y por el método biosimulador. La diferencia entre las concentraciones de las hormonas extraídas por ambos métodos en los suelos Melipilla y Pomaire es similar para cada una de las hormonas, sin embargo, en el suelo Codigua, la diferencia en las concentraciones de extracción de las hormonas por ambos métodos, varió con respecto a los otros suelos siendo mayor la diferencia en E1 y menor la diferencia de concentraciones en E2 y EE2. La mayor extracción de hormonas tanto con el método biosimulador HPCD, como con las raíces, se produjo para la E1, y las hormonas E2 y EE2 se extrajeron en cantidad similar. Esto se podría deber a que la estrona presenta el mayor valor de pka (10,34) de las tres hormonas, por lo tanto al encontrarse mayormente protonada, se absorbe con mayor facilidad por las raíces y por la HPCD.

5.11 Correlación lineal entre los factores de bioconcentración de la hidroxipropil-β-ciclodextrina (HPCD) y las raíces de las plantas de trigo.

Tal como en el punto anterior (5.10), se realizó una comparación de los dos métodos a través de una correlación lineal, pero esta vez entre los factores de bioconcentración de las hormonas mediante HPCD y las plantas, para ver si el método con ciclodextrina podía considerarse un método biosimulador y así validarlo para extraer las hormonas en los suelos.

En la Tabla 22 se muestran los resultados obtenidos de la corrección lineal entre los factores de bioconcentración de las tres hormonas en ambos métodos. Cabe hacer notar, que se evaluó sólo la raíz de la planta de trigo, debido a que solo en esa zona se fitoacumulaban las tres hormonas.

Tabla 22. Correlación lineal de los factores de bioacumulación entre la HPCD y las plantas de trigo en suelos Codigua, Melipilla y Pomaire.

Suelo	FBC Raíz	FBC HPCD	Ecuación	p-value	Coefficiente de correlación de Pearson
E1					
Codigua	1,44	2,19	FBC Raíz = 0,216551 + 0,564992 FBC HPCD	0,0001	0,9930
Melipilla	0,50	0,54			
Pomaire	0,56	0,56			
E2					
Codigua	0,48	0,56	FBC Raíz = -0,0243946 + 0,834737 FBC HPCD	0,0023	0,9607
Melipilla	0,62	0,77			
Pomaire	0,23	0,35			
EE2					
Codigua	0,61	0,69	FBC Raíz = -0,336175 + 1,26698 FBC HPCD	0,0271	0,8623
Melipilla	0,26	0,53			
Pomaire	0,25	0,47			

Los valores de p-value obtenidos que se muestran en la Tabla 22, fueron todos menores a 0,05, por tanto, existe una relación estadísticamente significativa entre los factores de bioconcentración en ciclodextrina y los factores de bioconcentración en las raíces de las plantas de trigo, en un nivel de confianza del 95%. Los

coeficientes obtenidos se consideran aceptables, ya que el menor fue de 0,86 y los otros dos estuvieron sobre 0,90. Con estos resultados se puede considerar el método de extracción de hormonas con HPCD como un método biosimulador para estos tres suelos, ya que correlacionaron los factores de bioacumulación de ambos métodos en los tres suelos y para las tres hormonas, E1, E2 y EE2.

5.12 Estudio del tiempo de degradación de E1, E2 y EE2 en suelos tratados con estiércol y suelos no tratados.

Las hormonas estrogénicas E1, E2 y EE2 son potentes disruptores endocrinos, que pueden actuar a muy bajas concentraciones, del orden de ngL^{-1} , afectando los sistemas endocrinos, tanto en animales como humanos, provocando serios daños ambientales y en la salud (Qingcai Chen, 2012).

La aplicación de enmiendas a los suelos agrícolas es una de las principales causas de ingreso de estas hormonas al medio ambiente. Estas hormonas se pueden comportar de distintas formas dependiendo de las características fisicoquímicas del suelo y de la enmienda en donde se encuentren (Goeppert N., 2013). La persistencia de éstas en el ambiente, en este caso el suelo, se puede ver afectada por muchos factores físicos (por ejemplo, el clima, características físicas del suelo y la enmienda, etcétera), químicos (como las interacciones con otros elementos, degradación, etcétera) y biológicos (como la actividad microbiana, entre otros).

Se ha mostrado en estudios una gran y rápida sorción de estrógenos en suelos tal como una rápida degradación de E2 a E1 y de E1 a estriol (E3) ((Prater J., 2015). La degradación de E2 a E1 por oxidación es de gran importancia ambiental, ya que la E1 es dos a tres veces menos potente que la E2 como disruptor endocrino. La persistencia de E1 podría ser incrementada por su lenta degradación a bajas temperaturas o por los bajos niveles de oxígeno que acompañan la aplicación de enmiendas (Prater J., 2015). Las tasas de degradación de 17α y 17β -estradiol en suelos aeróbicos son las mismas y el metabolito principal de ambos isómeros es la E1, siendo el principal mecanismo la oxidación de la E2 (Mashtare M, 2013). Por

otra parte, la reducción de E1 a E2 se puede producir sin la presencia de oxígeno. Por lo tanto, puede ocurrir un ciclo completo de degradación de E1 a E2 y viceversa. Estas condiciones se pueden cumplir en suelos que estén bajo o alrededor de una laguna de estiércol, que es donde éste se puede almacenar, o también en suelos enmendados con estiércol (Prater J., 2015).

Lo que se busca en este estudio es analizar la velocidad de degradación de las hormonas en el tiempo, y así poder probar la biotransformación y estabilidad de las hormonas. Para esto, se realizó un primer estudio durante un mes, en donde se incubaron en condiciones de campo los tres suelos, Codigua, Melipilla y Pomaire con y sin estiércol de caballo cada uno. Esto, para obtener resultados preliminares y una perspectiva general del comportamiento de las hormonas en estas condiciones. Los resultados obtenidos en el primer período de tiempo se muestran en las Figuras 24 a la 29.

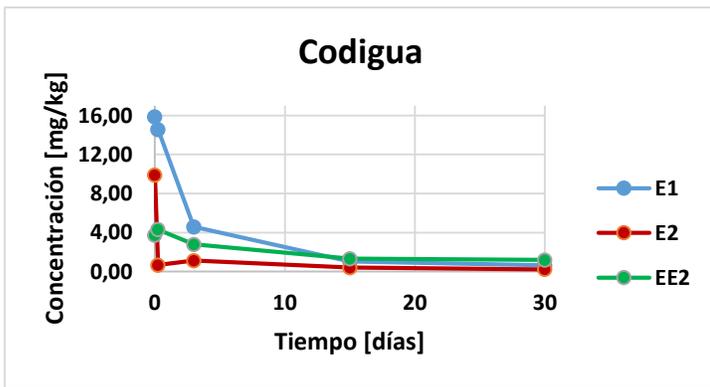


Figura 24. Curva de degradación 1^{er} estudio en suelo Codigua para E1, E2 y EE2.

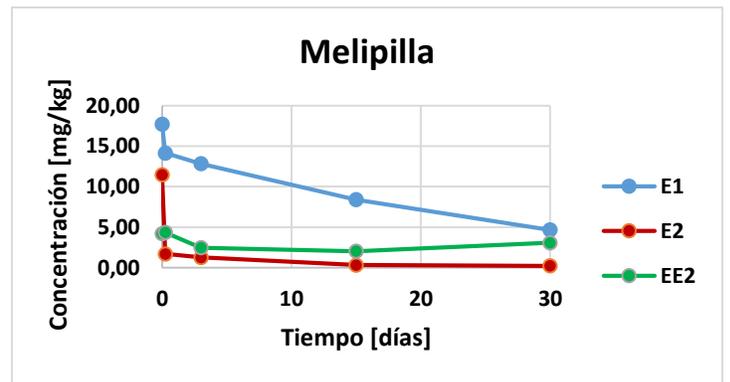


Figura 25. Curva de degradación 1^{er} estudio en suelo Melipilla para E1, E2 y EE2.

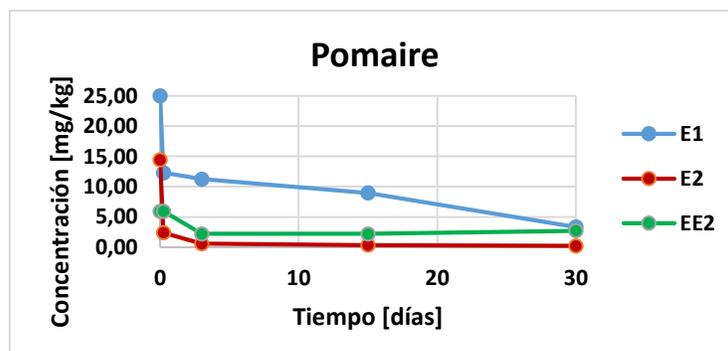


Figura 26. Curva de degradación 1^{er} estudio en suelo Pomaire para E1, E2 y EE2.

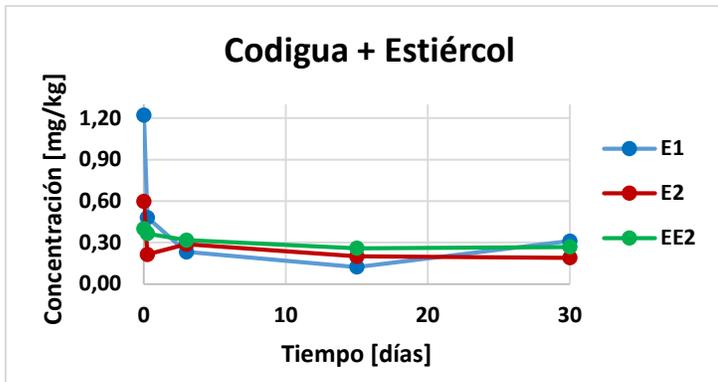


Figura 27. Curva de degradación 1^{er} estudio en suelo Codigua + Estiércol para E1, E2 y EE2.

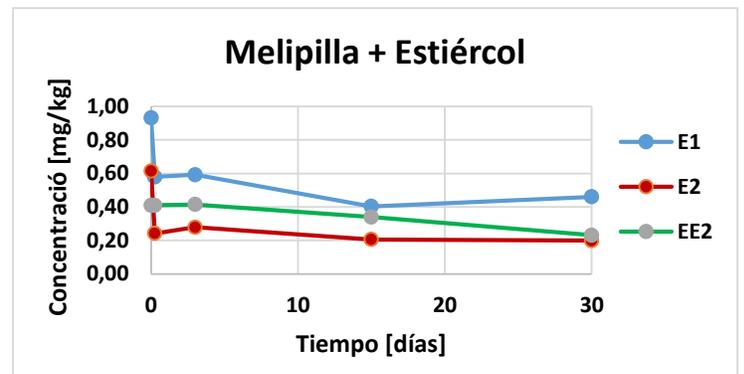


Figura 28. Curva de degradación 1^{er} estudio en suelo Melipilla + Estiércol para E1, E2 y EE2.

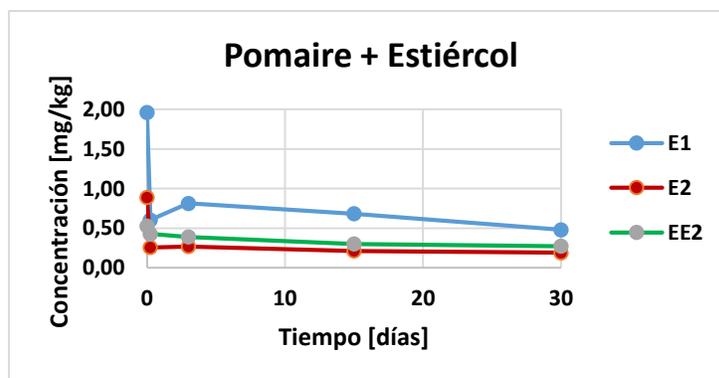


Figura 29. Curva de degradación 1^{er} estudio en suelo Pomaire + Estiércol para E1, E2 y EE2.

Según los gráficos obtenidos que se muestran en las Figuras 24 a la 29, se observa una generalidad para las tres hormonas en los tres suelos con y sin estiércol, se produjo un decaimiento brusco de la concentración de las hormonas durante los primeros dos días, obteniéndose luego de esto un comportamiento constante en el tiempo, en donde no había una variabilidad notoria de la concentración a medida que aumentaba el tiempo.

Los resultados obtenidos del decaimiento de la concentración de las tres hormonas se pueden explicar por la degradación de estas provocada por la radiación UV, haciendo que la característica de fotosensibilidad que presentan influya directamente en una rápida degradación (Xiaoyan Ma, 2015). Otra explicación a esta degradación, se puede deber a que el dióxido de manganeso (MnO_2), es uno de los agentes oxidantes más fuertes que se puede encontrar en

los suelos y oxida los esteroides a través de la deshidrogenación y la hidroxilación (Hang B, 2015). Por otro lado, en la parte más superficial del suelo donde existen condiciones aeróbicas, ocurre la degradación por oxidación de E2 a E1, y por el contrario, en las partes más profundas de los suelos donde existen condiciones de menor oxigenación, ocurre la degradación por reducción de E1 a E2.

Como los resultados obtenidos en esta primera etapa del estudio fueron muy generales, se realizó un segundo estudio en un tiempo menor, basándose en los resultados anteriores y priorizando las primeras horas de exposición de las hormonas con los suelos, ya que es en ese período de tiempo fue donde ocurrió la mayor caída de concentración de las hormonas. Se tomó un período de tiempo de 0 a 120 horas, tomando siete puntos en total. Los resultados obtenidos de esta segunda etapa del estudio se observan en las Figuras 30 a la 35.

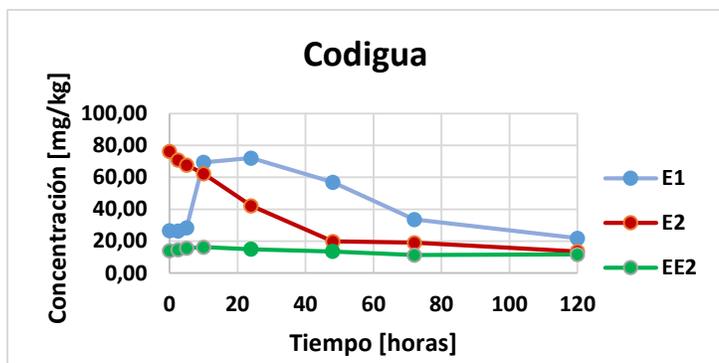


Figura 30. Curva de degradación 2° estudio en suelo Codigua para E1, E2 y EE2.

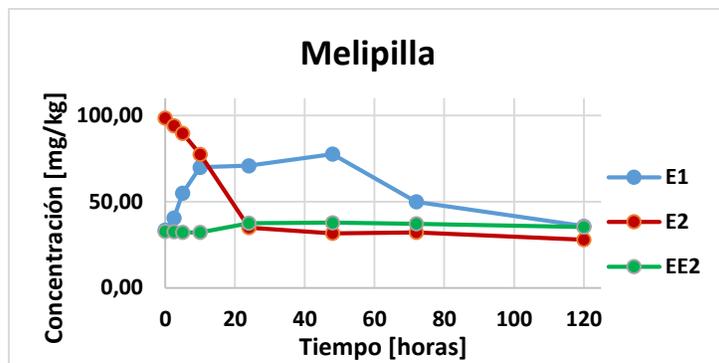


Figura 31. Curva de degradación 2° estudio en suelo Melipilla para E1, E2 y EE2.

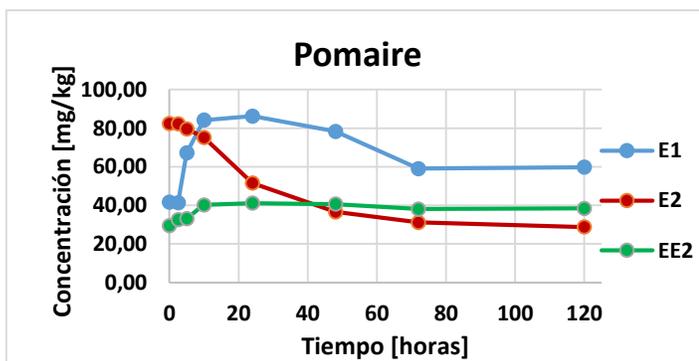


Figura 32. Curva de degradación 2° estudio en suelo Pomaire para E1, E2 y EE2.

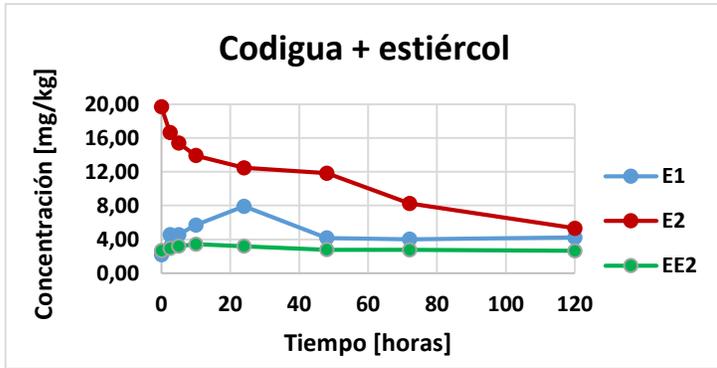


Figura 33. Curva de degradación 2° estudio en suelo Codigua + Estiércol para E1, E2 y EE2.

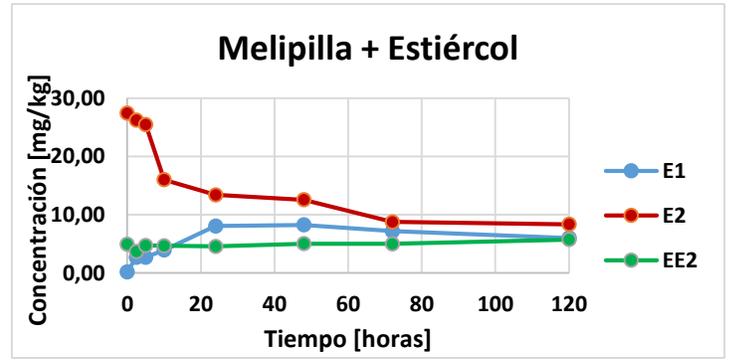


Figura 34. Curva de degradación 2° estudio en suelo Melipilla + Estiércol para E1, E2 y EE2.

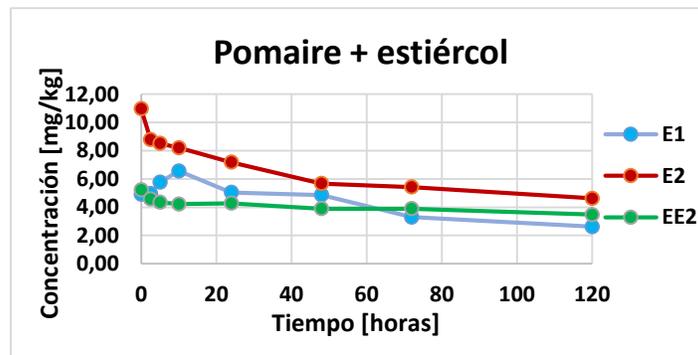


Figura 35. Curva de degradación 2° estudio en suelo Pomaire + Estiércol para E1, E2 y EE2.

La biodegradación de moléculas orgánicas involucra enzimas específicas que catalizan la transformación de contaminantes peligrosos, lo que significa que para que la biodegradación tenga lugar en un ecosistema específico, las poblaciones microbianas deben poseer y expresar las habilidades genéticas requeridas, sin embargo, la expresión génica o la actividad enzimática pueden reprimirse a bajas concentraciones, porque no existe un incentivo para que las células gasten energía para llevar a cabo las reacciones dirigidas, porque no es necesario reducir la toxicidad ni utilizar los contaminantes como fuentes de carbono o energía dada la disponibilidad de otras fuentes de alimentos. Afortunadamente, la degradación del contaminante también puede ocurrir a través de la acción de enzimas no específicas sintetizadas para otro propósito principal. (Zane N., 2016).

La fotodegradación puede ocurrir mediante fotólisis directa o fotooxidación indirecta, en donde la primera los fotones absorbidos por la molécula rompen sus enlaces

(Muxian Jiang, 2010), y en la segunda, ocurre a través de la oxidación por radicales libres producidos cuando la luz excita moléculas llamadas fotosensibilizadores tales como, ácidos orgánicos, ácidos húmicos y fúlvicos, y nitratos (K. Kadir, 2014). La presencia de otras moléculas orgánicas podrían mejorar la fotodegradación de estrógenos (Zane N., 2016).

Al comparar los gráficos de las hormonas en suelos con estiércol (Figura 33 a la 35) y sin estiércol (Figuras 30 a la 32) se aprecia una evidente baja en las concentraciones de E1, E2 y EE2 en los tres suelos con estiércol desde el momento de la primera toma de muestras (tiempo 0). Esto se puede deber a que los analitos experimentan una mayor sorción con la materia orgánica, por lo tanto, quedan mayormente retenidos en el estiércol, a diferencia de los suelos. También esta diferencia de concentraciones encontradas en un inicio se puede deber a la actividad microbiana del medio, que se ve aumentada con la adición de estiércol a los suelos, lo cual podría incrementar la degradación de las hormonas. Por otra parte, en ambos sistemas, suelos y suelos con estiércol, se evidencia el mismo comportamiento para las hormonas en el tiempo que se desarrolla el segundo estudio, la diferencia está, en que como se dijo anteriormente, en los suelos sin estiércol se extrajo una mayor concentración de hormonas.

Con respecto al comportamiento que se obtuvo de la estrona (E1), durante las primeras 48 horas aproximadamente fue aumentando su concentración de forma gradual hasta llegar a un máximo, para luego bajar lentamente, de tal forma que pareciera ser constante en el tiempo.

El 17β -estradiol (E2) al contrario de la E1, fue disminuyendo su concentración en tiempo, acentuándose ésta entre las 10 y 24 horas aproximadamente. Esto explica la creciente concentración en las primeras horas de E1, ya que como se mencionó anteriormente, ocurre una biodegradación de E2 a E1 en condiciones aeróbicas (Figura 36), provocando el aumento de E1 en un inicio y la disminución de E2. Uno de los principales mecanismos de degradación de E2 es por actividad microbiana. En un estudio de Michael L. et al, la actividad de la enzima deshidrogenasa se correlacionó positivamente con la oxidación del estradiol. El principal metabolito de

la degradación de E2 por oxidación sería E1. Adicionalmente algunos metabolitos de la E2 y la E1 por medio de oxidación se degradan a E1 (Li Ma, 2017).

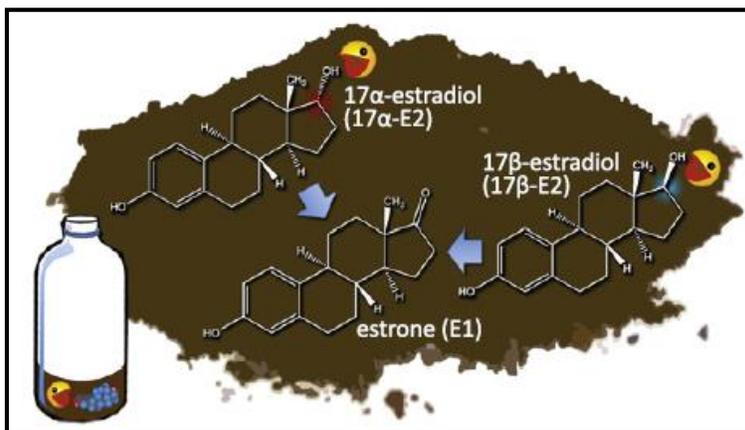


Figura 36. Degradación de Estradiol (E2) a Estrona (E1).

La E1 al encontrarse mayormente biodisponible, es menos propensa a ser degradada en los suelos, esto concuerda con los resultados obtenidos de biodisponibilidad y de degradación, ya que con respecto a la E1 se obtuvieron los mayores FBC en las raíces de las plantas de trigo, y es al mismo tiempo la hormona que se degrada de forma parcial una vez que alcanza su máximo peak de concentración.

El comportamiento del etinilestradiol (EE2) fue el más estable de las tres hormonas, en donde su concentración disminuyó en el tiempo de forma gradual y sin presentar bajas de concentración significativas. Esto lo explica la estabilidad de esta hormona sintética (Ternes T.A, 1999). Lo cual cobra relevancia ya que al poseer características de disruptor endocrino y ser estable, se puede acumular con mayor facilidad en el tiempo y se torna peligrosa para el medio ambiente y los seres vivos.

A medida que se tiene una baja concentración de estrógenos en el medio la fotodegradación de estos ocurre a mayor velocidad, sin embargo, la degradación por microorganismos se ve afectada y no ocurre con eficiencia, esto debido a que los receptores de estos no reaccionan al estímulo de los estrógenos por la baja concentración, por lo que les es preferible no gastar energía en una degradación de tan baja concentración.

VI. CONCLUSIONES

Se realizó la caracterización fisicoquímica de los tres suelos y los tres estiércoles, eligiéndose el estiércol de caballo como enmienda a utilizar en el desarrollo de esta investigación.

Con respecto a la determinación de las hormonas en los estiércoles, se detectó la presencia de las dos hormonas naturales E1 y E2 en los tres estiércoles en un rango de $0,12 - 0,48 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ y $0,08 - 0,15 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ respectivamente. La hormona sintética EE2 se logró cuantificar sólo en el estiércol de cerdo ($0,10 \pm 0,02 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

Los resultados de los cultivos de plantas de trigo en suelos con estiércol enriquecidos con E1, E2 y EE2 mostraron que las tres hormonas se encontraron sólo en las raíces de las plantas, y no en la parte aérea de estas, debido al carácter lipofílico de las raíces, al pH de los suelos, al estado protonado en que se encontraban las hormonas y a su baja solubilidad en agua.

En el suelo Codigua fue donde se observó la mayor absorción de hormonas por las raíces, por el tipo de textura arenosa que posee este. La E1 fue la hormona que se detectó en mayor concentración en Codigua y Pomaire, lo que se explicaría por la degradación oxidativa de E2 a E1. Esto se podría comprobar con los FBC en las raíces de las plantas de trigo y en la extracción con HPCD, que nos indicaron una baja biodisponibilidad de las hormonas, con excepción de la E1 en el suelo Codigua.

La correlación entre una característica fisicoquímica del suelo y la extracción de una hormona, depende de cada tipo de suelo, y de cada hormona, no pudiendo encontrar una generalidad para esto. Cada sistema actúa según las características que presenten el suelo, el estiércol y los analitos.

La biomasa en la raíces y en las hojas de las plantas de trigo no varió de forma significativa con respecto a las que se cultivaron en suelos sin estiércol y con estiércol enriquecido y sin enriquecer, por lo que la presencia de las hormonas y materia orgánica contenida en el estiércol no afectaría el crecimiento de las raíces y hojas de las plantas.

El método biosimulador con HPCD logró extraer las tres hormonas desde los tres suelos enmendados con estiércol enriquecido con las tres hormonas, E1, E2 y EE2, siguiendo el mismo patrón de extracción que las raíces de las plantas de trigo, siendo la E1 la hormona que se logra extraer en mayor concentración.

De correlación del método biosimulador y el bioensayo con las raíces de las plantas de trigo se obtuvieron coeficientes de correlación superiores a 0.91 en los tres suelos con cada hormona. Y valores de p-value menores a 0.05, lo que nos indica que existe una relación estadísticamente significativa entre la extracción con HPCD y las raíces de las plantas, con un nivel de confianza de 95%. Por lo que, el método de extracción con HPCD se valida como método biosimulador de las raíces de plantas de trigo para estos tres suelos utilizados.

El estudio de degradación, que se realizó en un tiempo de 120 horas, la E1 aumentó su concentración en las primeras 48 horas, y la E2 disminuyó su concentración en este mismo periodo de tiempo, lo que se explica por la degradación que ocurre de E2 a E1 en condiciones aeróbicas. La EE2 fue la hormona que presentó mayor estabilidad durante este período de tiempo, teniendo una baja variabilidad de concentración. Hubo una notoria diferencia de concentraciones de hormonas entre los suelos con estiércol y sin estiércol, considerando que ambos sistemas comenzaban con la misma concentración de hormonas, el hecho de que el sistema con estiércol presentara una menor extracción de las hormonas se podría explicar por la cantidad de materia orgánica que este presenta, por lo que la caída de concentración en el tiempo en estos sistemas fue menos abrupta que en los suelos sin estiércol. La degradación de las tres hormonas se puede explicar, por la fotosensibilidad y la biotransformación que estas presentan entre sí, pasado la E2 a E1, y la E1 a E3.

Por tanto, luego del análisis completo de este trabajo, se confirma la hipótesis planteada, donde la presencia de E1, E2 y EE2 en los suelos aumenta por la aplicación de estiércol y aumenta la biodisponibilidad de estos compuestos.

VII. REFERENCIAS

1. Agromática, 2017, Relación C/N (carbono/nitrógeno) en el suelo, [En línea], <http://www.infoagro.com/agricultura_ecologica/agricultura_ecologica3.htm> [Consulta: 13-01-2018].
2. Albornoz M., 2016, Estrona, [En línea], <<https://prezi.com/neqfkwdfcsmm/estrona/>>, [Consulta: 26-11-2017].
3. Alexander M., 2000, Aging, Bioavailability, and Overestimation of Risk from Environmental Pollutants, *Environmental science & technology*, 34, 4259 – 4265.
4. Antlsperger G., Schmid G., 1996, *Toxicological Comparison of Cyclodextrins*. Springer Netherlands, 32, 149-155.
5. Cantarero R., 2014, Estudio de adsorción de 17 α -etinilestradiol y triclosán en suelos tratados con biosólido y determinación de la fracción biodisponible de los compuestos a través de plantas de trigo, Tesis de Magíster en Química. Santiago, Chile, Universidad de Chile Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
6. Contreras H., 2001, *Ciclodextrina, naturaleza, propiedades y aplicaciones*, Departamento de madera, celulosa y papel, Universidad de Guadalajara, México.
7. Corrotea Y., 2013, Determinación de la fracción biodisponible de triclosán en suelos tratados con biosólido a través de la extracción con ciclodextrina como método predictivo y plantas de trigo para su validación, Tesis de Magíster en Química. Santiago, Chile. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
8. Del Valle E.M. M., 2003, Cyclodextrins and their uses: a review, *Process Biochemistry*, 39, 1033 - 1046.
9. Dodziuk H., 2006, *Cyclodextrins and their complexes*, Capítulo I: Molecules with holes-cyclodextrins, 1 – 25.
10. Fernández L., Louvado A., Esteves V, Gomes N., Almeida A., Cunha Â., 2016, Biodegradation of 17 β -estradiol by bacteria isolated from deep seabed sediments in aerobic and anaerobic media, *Journal of Hazardous materials*, 1- 8.
11. Fine D., Breidenbach G., Price T., Hutchins S., 2003, Quantitation of estrogens in ground water at swine lagoon sapsles using solid-phase extraction,

- pentafluorobenzyl/trimethyl derivatization and gas chromatography-negative ion chemical ionization tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1017, 167 – 185.
12. Gao Y, Zhu L, 2004, Plant Uptake, accumulation and traslocation of phenanthrene and pyrene in soils, *Chemosphere*, 55, 1169-1178.
 13. García Sans A., 1987, tipos de abonos orgánicos, capítulo 2.1.1., *Fertilización orgánica*, [En línea], <<https://es.slideshare.net/OrlandoDis/abonos-organicos-48129479>>, [Consulta: 25-11-2017].
 14. Gianguzza A., Pelizzetti E., Samamartano S., 1938, *Chemistry of marine water and sedments*, Springer, Charper 13, 309- 312. [En línea], <[https://books.google.cl/books?id=DacPIDoNaNQC&pg=PA309&lpg=PA309&dq=Dodds+y+col.,+1938\)&source=bl&ots=Rmrk11Xpd&sig=Oz_ZXvsNVBpfrPIRJPszvKLPMFw&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwiqgfa51dvYAhWlhZAKHafDCY8Q6AEIMDAB#v=onepage&q=Dodds%20y%20col.%2C%201938\)&f=false](https://books.google.cl/books?id=DacPIDoNaNQC&pg=PA309&lpg=PA309&dq=Dodds+y+col.,+1938)&source=bl&ots=Rmrk11Xpd&sig=Oz_ZXvsNVBpfrPIRJPszvKLPMFw&hl=es419&sa=X&ved=0ahUKEwiqgfa51dvYAhWlhZAKHafDCY8Q6AEIMDAB#v=onepage&q=Dodds%20y%20col.%2C%201938)&f=false)> [Consulta: 13-01-2018].
 15. Goepfert N, Dror I., Berkowitz B., 2013, Detection, fate and transport of estrogen family hormones in soil, *Chemosphere*, 95, 36 – 345.
 16. Goepfert N., Dror I., Berkowitz., 2014, Detection, fate and tranport of estrogen family hormones in soil. *Chemosphere*, 95, 336-345.
 17. Gómez P., 2016, Determinar la presencia y biodisponibilidad de las hormonas estrogénicas estrona (E1), 17 β -estradiol (E2) y 17 α -etinil estradiol (EE2) en suelos restaurados con biosólidos, por medio de un bioensayo con plantas de trigo (*Triticum aestivum*) y una extracción de los compuestos con ciclodextrina. Tesis para título profesional de Químico ambiental, Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas y Facultad de Ciencias.
 18. Gould S., Scott R., 2005, 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CD): A toxicology review, *Food and Chemical Toxicology*, 43, 10, 1451–1459.
 19. Han B., Zhang M., Zhao D., Feng Y., 2015, Degradation of aqueous and soil-sorbedestradiol using a new class of stabilized manganese oxide nanoparticles, *Water Research*. 70, 288 – 299.
 20. Iglesias Martines L., 1995, El estiércol y las prácticas agrarias respetuosas con el medio ambiente, Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. España.

21. Johnson A.C, Williams R.J, Matthiessen P., 2005, The potential steroid hormone contribution of farm animals to freshwaters, the United Kingdom as a case study. *Science of the environment*, 362, 166-178.
22. Jürgens M., Holthaus K., Johnson A., Smith J., Hetheridge M., Williams R., 2001, the potential for estradiol and ethinylestradiol degradation in english rivers, *ENvironmental toxicology and chemistry*, 21, 480 – 488.
23. Karnjanapiboonwng A., Chase D., Cañas J., Jackson A., Maul J., Morse A., Anderson T., 2011, Uptake of 17 β -ethinylestradiol and triclosan in pinto vean, *Phaseolus Vulgaris*, *Ecotoxicology and environmental safety*, 74, 1336 – 1342.
24. Kuster M., López de Alda M., Barceló D., 2004, Analysis and distribution of estrogens and progens in sewage sludge, soils and sediments. *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 790-798.
25. Lafrance P., Caron E., 2013, Impact of recent manure applications on natural estrogens concentrations in streams near agricultural fields, *Environmental Research*, 126, 208 - 210.
26. Li Ma, Scott R. Yates, 2017, Degradation and metabolite formation of estrogen conjugates in an agricultural soil, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 145, 634–640.
27. López M., Errasti T., Santiago E., 2011, Estrógenos y desarrollo del cerebro femenino en la adolescencia: anticoncepción de emergencia, Universidad de Navarra, [En línea], <<http://www.redalyc.org/pdf/875/87519895004.pdf>> [Consulta: 26-11-2017].
28. María del Pilar Romera Pérez. Agricultura ecológica. Capítulo I. La Agricultura Ecológica Como Solución A Los Problemas Planteados Por La Agricultura Convencional. 1.3.1.- Fertilización Orgánica. [En línea]. <http://www.infoagro.com/agricultura_ecologica/agricultura_ecologica3.htm>. [Consulta: 20-11-2017].
29. Marin, N, Burtan, I et al., 2016, Influence Of Nitrogen And Phosphorus Fertilization On Soil Organic Mattercontent, *Agrolife scientific journal*, Univ agricultural sciences & veterinary medicine bucharest, 5, 131-137.
30. Mashtare M., Green D., Lee L., 2013, Biotransformation of 17a- and 17b-estradiol in aerobic soils, *Chemosphere*, 90, 647 – 652.

31. Mashtare M., Green D., Lee L., 2013, Biotransformation of 17 α - and 17 β -estradiol in aerobic soils, *Chemosphere*, 90, 647– 652.
32. Ministerio de Agricultura, Decreto N°2, norma técnica de la ley 20.089, Sistema nacional de certificación de productos orgánicos agrícolas, Santiago de Chile, 2016.
33. Moreno E., Nuñez A., 2012, Disruptores endocrinos, un posible riesgo tóxico en productos de consumo habitual, Universidad de Huelva, Ciencias Ambientales, [En línea], <http://rabida.uhu.es/dspace/bitstream/handle/10272/6143/Disruptores_endocrinos.pdf?sequence=2> [Consulta: 25-11-2017].
34. Mura P., 2014, Analytical techniques for characterization of cyclodextrin complexes in aqueous solution: A review, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 101, 238 – 250.
35. N. Pi, J.Z. Ng, B.C. Kelly, 2017, Bioaccumulation of pharmaceutically active compounds and endocrine disrupting chemicals in aquatic macrophytes: Results of hydroponic experiments with *Echinodorus horemanii* and *Eichhornia crassipes*, *Science of the Total Environment*, 601 – 602, 812 – 820.
36. Norma chilena oficial, NCh 1515 Of 79, Mecánica de suelos – Determinación de la humedad, Santiago de Chile, 1978.
37. Patrón D., 2013, Orgánicamente funcional: Estrona, hormona femenina, [En línea], <<http://organicamentefuncional.blogspot.cl/2013/04/estrona-hormona-femenina.html>> [Consulta: 26-11-2017].
38. Pillon A., Servant N., Vignon F., Balaguer P., Nicolas J., 2005, In vivo bioluminescence imaging to evaluate estrogenic activities of endocrine disrupters, *Analytical Biochemistry*, 340, 295-302.
39. Prado L., 2017, Estradiol. Hormonas esteroides, [En línea], <<http://hormonas-esteroideas.blogspot.cl/p/estradiol.html>> [Consulta: 26-11-17].
40. Prater J., Horton R., Thompson M., 2015, Reduction of estrone to 17 β -estradiol in the presence of swine manure colloids, *Chemosphere*, 119, 642 - 645.
41. Prater J., Horton R., Thompson M., 2015, Reduction of estrone to 17 b-estradiol in the presence of swine manure colloids. *Chemosphere*, 119, 642-645.
42. Prater J., Horton R., Thompson M., 2015, Reduction of estrone to 17 β -estradiol in the presence of swine manure colloids, *Chemosphere*, 119, 642 - 645.

43. Qingcai Chen, Jianghong Shi, Wei Wu, Xiaowei Liu, Hui Zhang, 2012, A new pretreatment and improved method for determination of selected estrogens in high matrix solid sewage samples by liquid chromatography mass spectrometry, *Microchemical Journal*, 104, 49 – 55.
44. Repetto M., Sanz P., 1993, *Glosario de terminus toxicológicos IUPAC*, version Española ampliada, pág 33.
45. Rivas A., Granada., Jiménez., Olaf. Y Olean N., 2004, Exposición humana a disruptores endocrinos. *Ecosistemas*, 13, 7- 12.
46. Rodríguez B., 2009, Movilidad, biodisponibilidad y degradación inducida de isómeros de Hexaclorociclohexano (HCH) en suelos contaminados. Universidad de Santiago de Compostela, *Introducción, Biodisponibilidad*, 24 – 25.
47. Romano Mozo D., 2012, *Disruptores endocrinos, nuevas respuestas para nuevos retos*, Instituto Sindical de trabajo ambiente y salud (ISTAS). Capítulo I, 3 - 23. [En línea]. http://www.cancerceroeneltrabajo.ccoo.es/comunes/recursos/99924/pub86203_Disruptores_endocrinos._Nuevas_respuestas_para_nuevos_retos.pdf [Consulta: 25-11-2017].
48. Schulten, H. R. and Schnitzer, M. 1998, The chemistry of soil organic nitrogen: (review), *Biology Fertility of Soils*, Springer-Verlag, 26, 1–15.
49. Servicio agrícola y ganadero (SAG). Ministerio de agricultura. Gobierno de Chile, Santiago, Chile. *Guía de evaluación ambiental, Aplicación de residuos sólidos al suelo. G-PR-GA-004 versión 3. 2008.*
50. Servicio agrícola y ganadero (SAG). Ministerio de agricultura. Gobierno de Chile, Santiago, Chile. *Agricultura orgánica nacional, bases técnicas y situación actual. 2013.*
51. Shargil D., Gerstl Z., Fine P., Nitsan I., Kurtzman D., 2015, Impact of biosolids and wastewater effluent application to agricultural land on steroidal hormone content in lettuce plants, *Science of the Total Environment*, 505, 357 - 366.
52. Sophie D., Lucas, David L., Jones, 2006, Biodegradation of estrone and 17 β -estradiol in grassland soils amended with animal wastes. *Soil Biology & Biochemistry*, 38, 2803 – 2815.

53. Stricker R., Eberhart R., Chevailler M.C, Frank A. Quinn, Bischof P., Stricker R., 2011, Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbott ARCHITECT® analyzer, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, DOI: <https://doi.org/10.1515/CCLM.2006.160>
54. Stumpe, B., & Marschner, B., 2010, Waste effects on the behavior of 17beta-estradiol, estrone, and 17alpha-ethinylestradiol in agricultural soils in long- and short-term setups. *Journal of environmental quality*, 39, 907–16.
55. Ternes T.A, Kreckel P., Mueller J., 1999, Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge, *The Science of the Total Environment*, 225, 91 – 99.
56. Thakur M.K., 2009, Role of steroid hormone coregulators in health and disease, *Hormone research in pediatrics*, 71, 194- 200.
57. Villaroel R., 2012, Propiedades químicas de un suelo del secano central de Chile bajo un sistema de agroforestería asociado a cosecha de agua a 12 años de su establecimiento, *Memoria para Título Profesional de Ingeniería Agrónoma*, Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de ciencias Agronómicas, 8 - 11.
58. Wu Ch., Spongberg A., Witter J., Maruthi B., 2012, Transfer of wastewater associated pharmaceuticals and personal care products to crop plants from biosolids treated soil, *Ecotoxicology and environmental safety*, 85, 104 – 109.
59. Wu X., Ernst F., Conkle J. L., Gan J., 2013, Comparative uptake and translocation of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by common vegetables, *Environment International*, 60, 15–22.
60. Xiaoyan Ma, Chao Zhang, Jing Deng, Yali Song, Qingsong Li, Yaping Guo, and Cong Li, 2015, Simultaneous Degradation of Estrone, 17β-Estradiol and 17α-Ethinyl Estradiol in an Aqueous UV/H₂O₂ System, *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12, 12016 - 12029.
61. Zhang H., Shi J., Liu X., Zhan X., Chen Q., 2014, Occurrence and removal of free estrogens, conjugated estrogens, and bisphenol A in manure treatment facilities in East China, *Water Research*, 58, 248-257.

VIII. ANEXOS

- Gráficos de los parámetros analíticos instrumentales

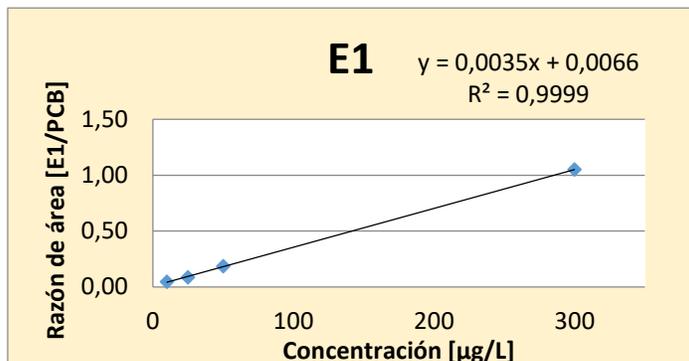


Figura 37. Gráfico de razón de área E1/PCB vs Concentración.

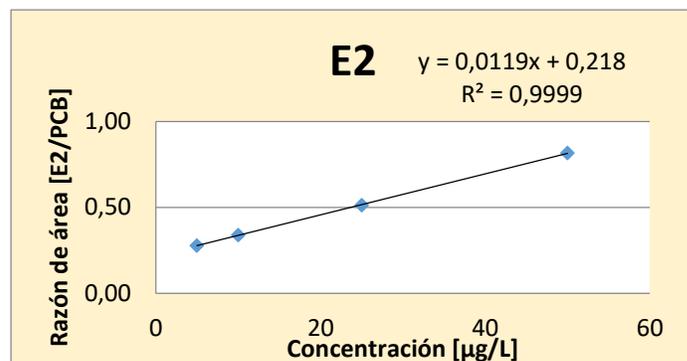


Figura 38. Gráfico de razón de área E2/PCB vs Concentración.

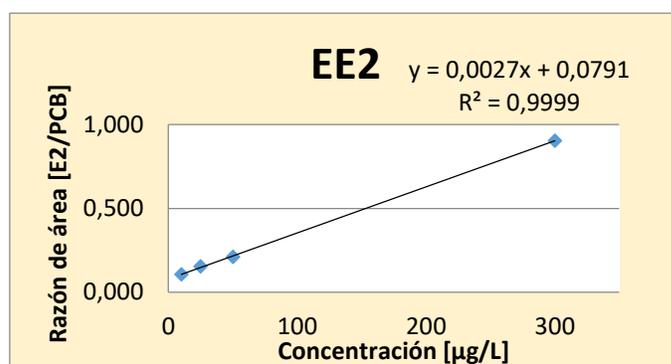


Figura 39. Gráfico de razón de área EE2/PCB vs Concentración.

- Gráficos de los parámetros analíticos metodología 1.

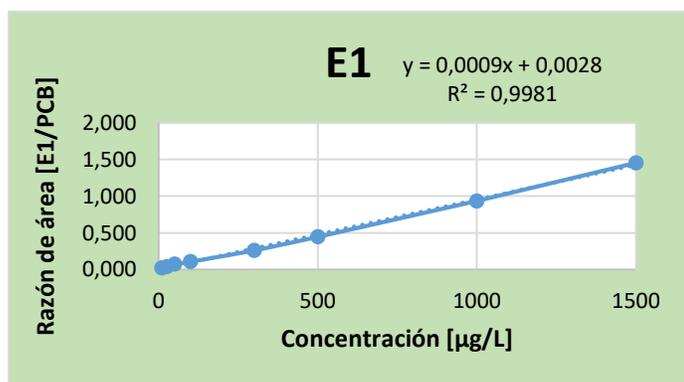


Figura 40. Gráfico de razón de área E1/PCB vs Concentración.

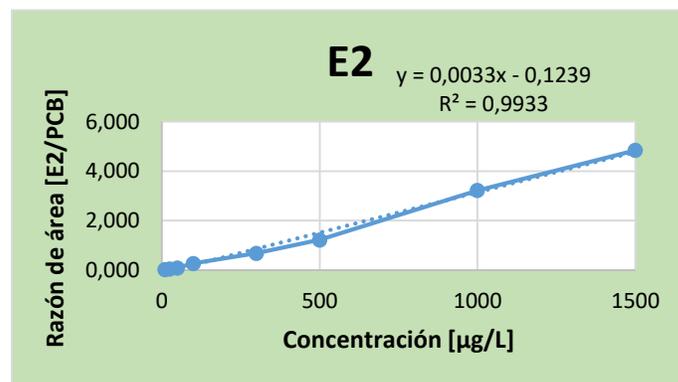


Figura 41. Gráfico de razón de área E2/PCB vs Concentración.

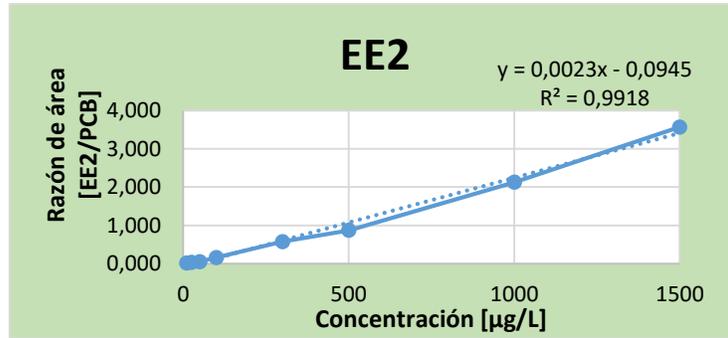


Figura 42. Gráfico de razón de área EE2/PCB vs Concentración.

- Gráficos de los parámetros analíticos metodología 2.

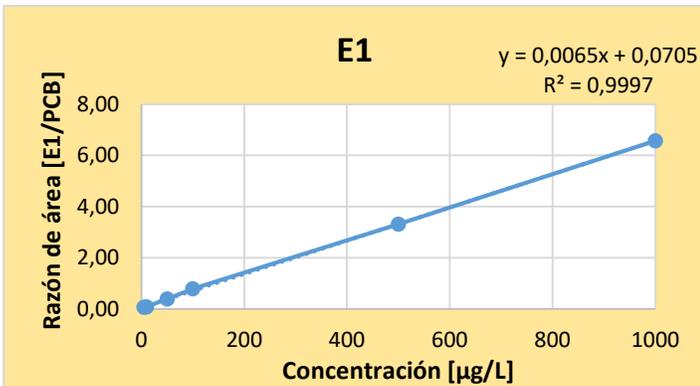


Figura 43. Gráfico de razón de área E1/PCB vs Concentración.

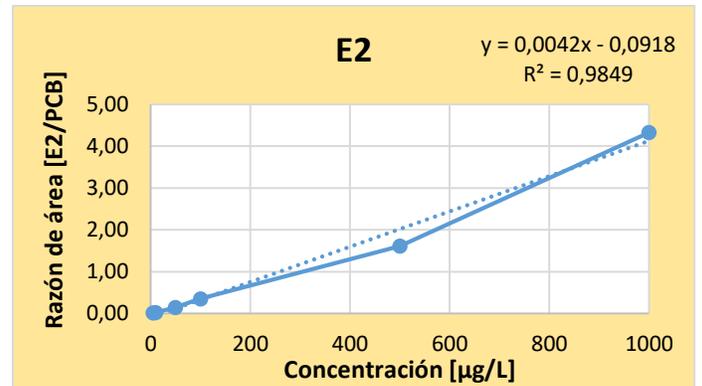


Figura 44. Gráfico de razón de área E2/PCB vs Concentración.

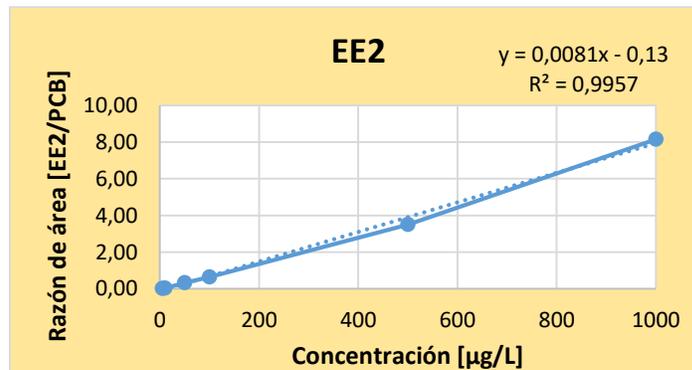


Figura 45. Gráfico de razón de área EE2/PCB vs Concentración.

Tabla 23. Concentración de E1, E2 y EE2 en raíces de trigo cultivadas en suelo Codigua, Melipilla y Pomaire.

Hormona	Codigua [mg·kg ⁻¹]	Melipilla [mg·kg ⁻¹]	Pomaire [mg·kg ⁻¹]
<i>E1</i>	0,39 ± 0,06	0,19 ± 0,01	0,29 ± 0,05
<i>E2</i>	0,13 ± 0,01	0,24 ± 0,05	0,12 ± 0,02
<i>EE2</i>	0,17 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,02

Tabla 24. Concentración de hormonas extraídas con HPCD en los tres suelos.

Hormona	Codigua [mg·kg ⁻¹]	Melipilla [mg·kg ⁻¹]	Pomaire [mg·kg ⁻¹]
<i>E1</i>	0,60 ± 0,04	0,21 ± 0,01	0,30 ± 0,02
<i>E2</i>	0,15 ± 0,04	0,30 ± 0,08	0,19 ± 0,02
<i>EE2</i>	0,19 ± 0,05	0,22 ± 0,03	0,21 ± 0,04

Tabla 25. ANOVA multifactor (test de intervalo múltiple) para plantas de trigo cultivadas en tres sistemas de suelos.

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-ratio	P-Value
Parte planta (hojas-raíces)	18,4264	1	18,4264	120,29	0,0000
Localidad (Codigua-Melipilla-Pomaire)	2,60527	2	1,30263	8,50	0,0008
Sistema de suelo (S-S+E-S+Eenr.)	0,143536	2	0,0717681	0,47	0,6292