

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



ESTUDIO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN ROCÍO DE LA CIUDAD DE SANTIAGO

NATALIA ANDREA FUENTES JORQUERA

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCIÓN CIENCIAS AMBIENTALES Y BIOMEDICINA**

DIRECTORA DE TESIS: PROFESORA DRA. MARÍA ANGÉLICA RUBIO CAMPOS

2012

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



ESTUDIO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN ROCÍO DE LA CIUDAD DE SANTIAGO

NATALIA ANDREA FUENTES JORQUERA

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCIÓN CIENCIAS AMBIENTALES Y BIOMEDICINA**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA ANGÉLICA RUBIO CAMPOS

2012

UNIVERSIDAD DE CHILE

**FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por la candidata

NATALIA ANDREA FUENTES JORQUERA

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Magister en Ciencias Biológicas** con **mención en Ciencias Ambientales y Biomedicina** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 21 de Noviembre de 2012.

Prof. Dra. María Angélica Rubio C.

Directora de Tesis

**Departamento de Cinética y Medioambiente, Facultad de Química y Biología,
Universidad de Santiago de Chile**

COMISION INFORMANTE DE TESIS

PROF. DR. SERGIO CABRERA S.

PROF. DR. RAÚL MORALES S.

PROF. DRA. MARTA ADONIS P.

Presidenta Comisión de Examen

DEDICATORIA

A mis tres amados sobrinos

Ignacio,

Maite

e

Isidora

Quienes llenan mi vida de Luz, Alegría y Felicidad

A mis amados Padres

Beatriz Soledad y Juan

A quienes debo todo lo que Soy

A Ti Cristián, Amor, por compartir y caminar juntos en la Vida

A Dios, simplemente.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile por permitir realizar esta tesis.

Al proyecto Fondecyt N° 1085007 y 1120366

A los profesores Eduardo Lissi y María Angélica Rubio por darme la oportunidad de trabajar y realizar mi tesis en el laboratorio de Cinética y Medioambiente de la Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile, USACH.

Agradezco a la Profesora Gabriela Castillo y a Eduardo Faúndez por recibirme en el Laboratorio de Calidad de Aguas del Departamento de Ingeniería Civil de la Universidad De Chile y enseñarme todo el trabajo que se ha realizado en cuanto a Bioensayos.

Agradezco a los Profesores Marta Adonis, Sergio Cabrera y Raúl Morales, por el apoyo constante durante todo el tiempo de realización de esta tesis.

INDICE

	Página.
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Importancia de los COVs.....	2
1.2. Efectos en la salud.....	2
1.3. Compuestos fenólicos: Características generales y estructura.....	3
1.3.1. Fuentes atmosféricas de Nitrofenoles.....	3
1.3.2. Toxicidad de compuestos fenólicos	6
1.3.3. La exposición aguda al fenol y sus quinonas.....	6
1.3.4. Importancia de compuestos nitrofenólicos.....	7
1.3.5. Toxicidad de compuestos fenólicos y nitrofenoles en Bioensayos.....	8
1.4. Salud y células.....	10
1.4.1. Absorción.....	11
1.4.2. Reacciones de Fase I.....	12
1.4.3. Reacciones de Fase II.....	14
1.4.4. Glucuronidación.....	14
1.4.5. Sulfatación.....	17
1.4.6. Integración del proceso de Biotransformación.....	18
1.5. 1.5. Rocío.....	19
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22

3.1.	Reactivos.....	22
3.2.	Soluciones.....	22
3.3.	Equipos.....	22
3.4.	Recolección de rocío.....	23
3.5.	Análisis Físico-químico.....	24
3.5.1.	Nitritos.....	24
3.5.2.	Nitratos.....	24
3.5.3.	Determinación de Alcalinidad Total.....	25
3.5.4.	Cloruros.....	25
3.5.5.	Sulfatos.....	25
3.5.6.	Amonio.....	26
3.5.7.	Determinación de Cationes.....	26
3.6.	Identificación y Cuantificación de fenoles en agua de rocío.....	28
3.7.	Curva de calibración. Determinación de la concentración de fenoles....	29.
3.8.	Estabilidad de compuestos fenólicos	32
3.9.	Bioensayos con <i>Daphnia magna</i>	33
3.9.1.	Preparación y mantención de cultivos.....	34
3.9.2.	Agua reconstituida.....	34
4.	RESULTADOS.....	37
4.1.	Caracterización físico química del rocío.....	37
4.2.	Identificación y cuantificación de fenoles mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución.....	38
4.3.	Estabilidad.....	41

4.3.1. Efecto del peróxido de hidrógeno a pH 3,0.....	42
4.3.2. Efecto del pH y del peróxido de hidrógeno.....	42
4.4. Resultados de Bioensayos.....	47
5. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	50
5.1. Identificación y cuantificación de fenoles en agua de rocío.....	52
5.2. Estabilidad de compuestos fenólicos en agua de rocío.....	56
5.3. Toxicidad de Nitrofenoles	57
6. CONCLUSIONES	60
7. BIBLIOGRAFÍA	62
8. ANEXOS.....	65
8.1. Cromatogramas, espectros y curvas de calibración de cada compuesto puro identificado en muestras de rocío.....	66
8.2. Constantes de Henry determinadas a 308 K, en [mol Kg ⁻¹ atm ⁻¹].....	67
8.3. Mapa de ubicación de la Facultad de Química y Biología de la USACH, en la comuna de Estación Central, Santiago, Chile.....	67
8.4. Presiones.....	68

INDICE DE ILUSTRACIONES

1. Reacciones de transformación de fenol en la fase gaseosa en presencia de $\bullet\text{OH}$, O_2 y $\bullet\text{NO}_2$, centrándose en la formación de 2-nitrofenol.....	3
2. Salida de un átomo de hidrogeno del fenol por el radical $\bullet\text{NO}_3$ el producto de este proceso es un radical fenoxi.....	3
3. Formación del 2-nitrofenol y 4-nitrofenol a partir de un radical fenoxi.....	4
4. Estructuras y abreviaturas de los fenoles contaminantes prioritarios.....	5
5. Principales vías de absorción y excreción de xenobióticos.....	11
6. Integración del proceso de biotransformación de xenobióticos.....	12
7. Localización del sistema citocromo P-450 en la membrana del retículo endoplasmático.....	13
8. Formación del ácido uridindifosfatoglucurónico (UDPGA).....	15
9. Inversión del enlace α a β en la formación del glucurónido.....	15
10. Principales tipos de glucurónidos donde se muestra el grupo nucleofílico.....	16.
11. Formación del fosfoadenosin-fosfosulfato (PAPS).....	17
12. Variación interespecie en la conversión metabólica del fenol.....	18
13. Muestreador manual de rocío.....	23

14. Curva calibración de calcio.....	27.
15. Cromatograma tipo de una solución multi-patrón.....	28
16. A: Cromatograma del patrón de fenol; B: Espectro de absorción de fenol; C: Curva de calibración de fenol.....	30
17. Diagrama del procedimiento experimental de Bioensayos.....	36
18. <i>Daphnia magna</i>	36
19. Cromatograma de una muestra de rocío concentrada, del día 24 de agosto de 2010.....	38
20. Concentración molar en función del tiempo.....	41
21. Área versus temperatura, de los compuestos fenólicos.....	42
22. Descomposición del fenol con H ₂ O ₂ a 10 μM.....	43.
23. Descomposición del 2-nitrofenol con H ₂ O ₂ a 10 μM.....	44
24. Descomposición del 4-nitrofenol con H ₂ O ₂ a 10 μM.....	45
25. Descomposición del 2,6-dinitrofenol con H ₂ O ₂ a 10 μM.....	46
26. Carta control de <i>Daphnia magna</i> a las 24 horas.....	47
27. Cl _{50- 48 h} de compuestos fenólicos.....	48

28. Unidades	Tóxicas	de	los	compuestos
fenólicos.....				48

INDICE DE CUADROS

1. Datos de toxicidad aguda, valores de concentración letal del 50%, en mgL^{-1} a las 24 y 48 horas, para algunos compuestos fenólicos sobre diferentes especies.....	9
2. Identificación de compuestos en la muestra multi-patrón, y sus tiempos de retención en minutos.....	29
3. Valores de pH, conductividad y volumen de las muestras de agua de rocío recolectadas.....	37
4. Valores de concentración (μEqL^{-1}) promedio de iones medidos en agua de rocío.....	38
5. Concentraciones en mgL^{-1} de compuestos fenólicos en las muestras de rocío.....	39
6. Concentraciones de fenoles (μgL^{-1}) en 22 de muestras de las aguas de rocío en el centro de Santiago de Chile, desde 10/05/2010 al 14/10/2010.....	40
7. Datos estadísticos de la carta control.....	47
8. $\text{Cl}_{50-48\text{h}}$ y concentración química de fenoles en muestras de rocío, en mgL^{-1}	49
9. Niveles de fenol, 2-nitrofenol y 4-nitrofenol en muestras de aire.....	53
10. Concentraciones en μgL^{-1} de nitrofenoles en niebla y agua de lluvia de algunas ciudades de Europa.....	54
11. Toxicidad frente a <i>D. magna</i> de compuestos fenólicos según literatura.....	57
12. Toxicidad de nitrofenoles en <i>D. magna</i> a pH 6.0, 7.8, y 9.0, respecto al logP, y pKa.....	58.

RESUMEN

Este trabajo se realizó en el campus de la Universidad de Santiago de Chile durante el otoño e invierno del año 2010. Sus objetivos fueron: Identificar compuestos fenólicos presentes en aguas de rocío en la Zona Centro de la ciudad de Santiago, Chile, -determinar los niveles de concentración de fenoles y nitrofenoles, -determinar su ecotoxicidad mediante bioensayos con *Daphnia magna* y -analizar la toxicidad de los componentes nitrofenólicos puros encontrados en las aguas de rocío.

Se recolectaron veintidós muestras de rocío (4 de agosto al 14 de octubre, 2010) que fueron concentradas aproximadamente cien veces, mediante el uso de cartuchos para extracción en fase sólida. Luego estas muestras fueron analizadas por cromatografía, HPLC.

Los resultados obtenidos evidencian la presencia de fenol y de sus derivados mono y dinitrados: 2-nitrofenol (2-NF), 3-nitrofenol (3-NF), 4-nitrofenol (4-NF), 2,3-dinitrofenol (2,3-DNF), 2,5-dinitrofenol (2,5-DNF) y 2,6-dinitrofenol (2,6-DNF). Las concentraciones de estos compuestos en las muestras de rocío, variaron entre 0,1 y 0,8 μM . Los fenoles que presentaron mayor concentración fueron: fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol y 2,6-dinitrofenol.

En el estudio de ecotoxicidad, se determinó la toxicidad aguda ($\text{CI}_{50-48\text{h}}$) de los nitrofenoles puros, de mayor concentración, mediante bioensayos con *Daphnia magna*, según la Norma Chilena Oficial N°2083, obteniéndose para fenol: 14 mgL^{-1} ; 2-nitrofenol: 56 mgL^{-1} ; 4-nitrofenol: 9 mgL^{-1} ; y 2,6-dinitrofenol: 11 mgL^{-1} . Las concentraciones obtenidas para los compuestos fenólicos en muestras de rocío fresco, resultaron no ser tóxicas en el ensayo de *Daphnia magna*.

ABSTRACT

This work was carried out on the campus of the University of Santiago of Chile during the autumn and winter of 2010. Its objectives were: -to identify phenolic compounds present in waters of dew in a district of the city of Santiago, Chile, -determine phenols concentration and nitro phenols, -to determine using the bioassays *Daphnia magna*, and to analyze the toxicity by *Daphnia magna* assay standards of phenolics, -to found previously in waters of dew.

Twenty-two samples of water's dew (August 4 to October 14, 2010) were concentrated approximately one hundred times, using of cartridges for extraction in solid phase. These samples then analyzed by HPLC.

The results obtained, demonstrate the presence of phenol, mono derivatives and di nitrated: 2-nitrophenol (2-NF), (3-NF) 3-nitrophenol, 4-nitrophenol (4-NF), 2,3-dinitrophenol (2,3-DNF), 2,5-dinitrophenol (2,5-DNF) and 2,6-dinitrophenol (2,6-DNF). The concentrations of these compounds in the dew samples, ranged between 0,1 and 0,8 μM . The higher phenols concentrations were for: phenol, 2-nitrophenol, 4-nitrophenol and 2,6-dinitrophenol.

Acute toxicity ($\text{IC}_{50-48 \text{ h}}$) of standard phenols, using *Daphnia magna* bioassays was determined according to the Chilean official standard, the toxicity obtained for phenol were: 14 mgL^{-1} ; 2-nitrophenol: 56 mgL^{-1} ; 4-nitrophenol: 9 mgL^{-1} ; and 2,6-dinitrophenol: 11 mgL^{-1} . The phenols levels obtained by dew samples, resulted not toxic with the *Daphnia magna* assay.

1. INTRODUCCIÓN

La ciudad de Santiago de Chile es una de las más contaminadas del mundo (Raúl Morales, Editor, Editorial Universitaria 2006). El gran parque automotriz y la presencia de numerosas industrias alrededor de la ciudad contribuyen en forma importante a la emisión a la atmósfera de contaminantes primarios, entre ellos material particulado y gases. Esta situación asociada a una baja dispersión atmosférica agudiza la problemática, sobre todo en los períodos de invierno.

La ciudad de Santiago está ubicada en la depresión intermedia de la zona central de Chile, en la cuenca del río Maipo, al pie de la Cordillera de Los Andes. Está limitada al oriente por los faldeos de la Cordillera de Los Andes, con cerros que superan los 3200 m (cerro San Ramón). Por el oeste, la cordillera de la costa alcanza alturas de 1500 m, siendo interrumpida por el valle del río Maipo, que abre la cuenca hacia el sector sudoeste. Más al sur el macizo de Alhué (cerro Cantillana) supera los 2000 m de altura. El cordón de cerros de Chacabuco cierra la cuenca por el norte. Por el sur, el cordón de cerros de Angostura de Paine separa la cuenca de la depresión central que se desarrolla hacia el sur.

La ventilación de la cuenca se produce principalmente por un sistema de brisas que se genera localmente. El mecanismo principal que genera movimientos de aire en la cuenca es el calentamiento de la superficie. Durante el día, se desarrollan brisas que soplan por los valles hacia arriba, alcanzando su mayor intensidad durante la tarde. En la noche, el enfriamiento de la superficie, especialmente en cerros y laderas, produce una capa delgada de aire más denso que se desliza pendiente abajo, canalizándose por los valles hacia la cuenca. La brisa nocturna es en general más débil que el flujo diurno y presenta direcciones contrarias.

En los meses de invierno, el flujo de aire dentro de la cuenca es mucho más débil que en verano, debido a la menor disponibilidad de radiación.

Los compuestos orgánicos volátiles (COVs), representan un conjunto de compuestos que están presentes en la atmósfera en fase gaseosa, excluyendo a monóxido de carbono y dióxido de carbono. Estos compuestos son importantes en la química atmosférica desde una escala urbana a una global. La caracterización individual varía ampliamente e incluye a una enorme cantidad de compuestos.

Es bien sabido que Santiago está saturado por algunas sustancias y se han declarado normas que establecen los niveles permitidos (Gobierno de Chile, SINCA 2009). Sin embargo, existen otras sustancias que carecen de normativa, pero no por ello son menos peligrosas para la vida de los seres humanos y otros seres vivos. Entre estos se encuentran los COVs.

Los compuestos orgánicos volátiles, son emitidos principalmente a través de la combustión parcial de combustibles y a través de la evaporación de disolventes orgánicos.

1.1. Importancia de los COVs

Los COVs son precursores del ozono troposférico. En presencia de óxidos de nitrógeno y radiación, se producen una serie de reacciones químicas que conducen a la formación de ozono a nivel del suelo. A esta contaminación se le conoce como Smog Fotoquímico.

1.2. Efectos en la salud

Existen dos COVs altamente tóxicos. Estos son el benceno y 1,3-butadieno y son de preocupación particular puesto que son sustancias carcinogénicas conocidas. Otros COVs son importantes debido al papel que ellos juegan en la formación fotoquímica de ozono en la atmósfera.

El benceno es un potencial productor de leucemia y aunque la Organización Mundial de la Salud, OMS, no proponen normas de emisión, recomiendan que las concentraciones no sean mayores que una parte por millón (ppm).

Asimismo, los COVs son precursores del material particulado fino (MP 2,5), que debido a su tamaño, penetran hasta los alvéolos pulmonares, lugar del intercambio de gases en los mamíferos (Gobierno de Chile, SINCA 2009). El fenol y sus derivados pertenecen a esta categoría de material orgánico.

1.3. Compuestos Fenólicos: Características generales y estructuras

1.3.1. Fuentes Atmosféricas de Nitrofenoles

Las fuentes atmosféricas de compuestos fenólicos, y sus derivados nitrados, los nitrofenoles, incluyen emisiones primarias directas, que resultan de los procesos de combustión, e hidrólisis de pesticidas (ejemplo "parathion") y de la formación secundaria en la atmósfera. La formación secundaria vía nitración del fenol, involucra la reacción entre fenol y $\bullet\text{OH} + \bullet\text{NO}_2$ durante el día (figuras 1 y 2), y/o con $\bullet\text{NO}_3 + \bullet\text{NO}_2$, durante la noche (figura 3). Según algunos autores, durante la noche se formaría principalmente en mayor cantidad 2-nitrofenol (Harrison y col, 2005).

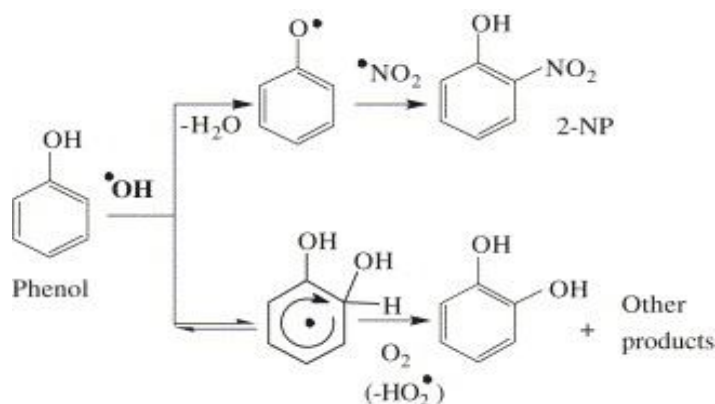


Figura 1: Reacciones de transformación de fenol en la fase gaseosa en presencia de $\bullet\text{OH}$, O_2 y $\bullet\text{NO}_2$, centrándose en la formación de 2-nitrofenol.

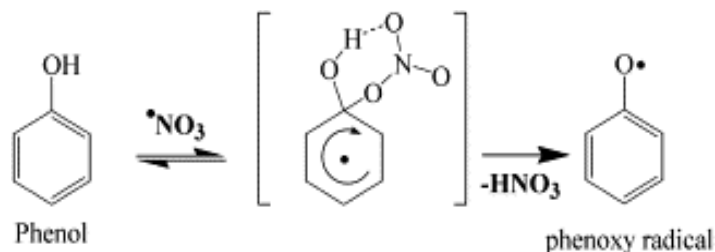


Figura 2: Salida de un átomo de hidrogeno del fenol por el radical $\bullet\text{NO}_3$. El producto de este proceso es un radical fenoxi.

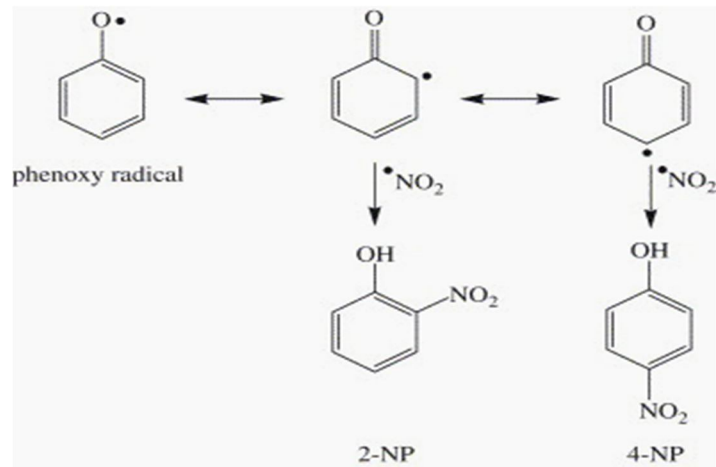


Figura 3: Formación del 2-nitrofenol y 4-nitrofenol a partir de un radical fenoxi.

La estructura y abreviaturas de los once fenoles contaminantes prioritarios según la EPA (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos) se presentan en la Figura 4, a continuación.

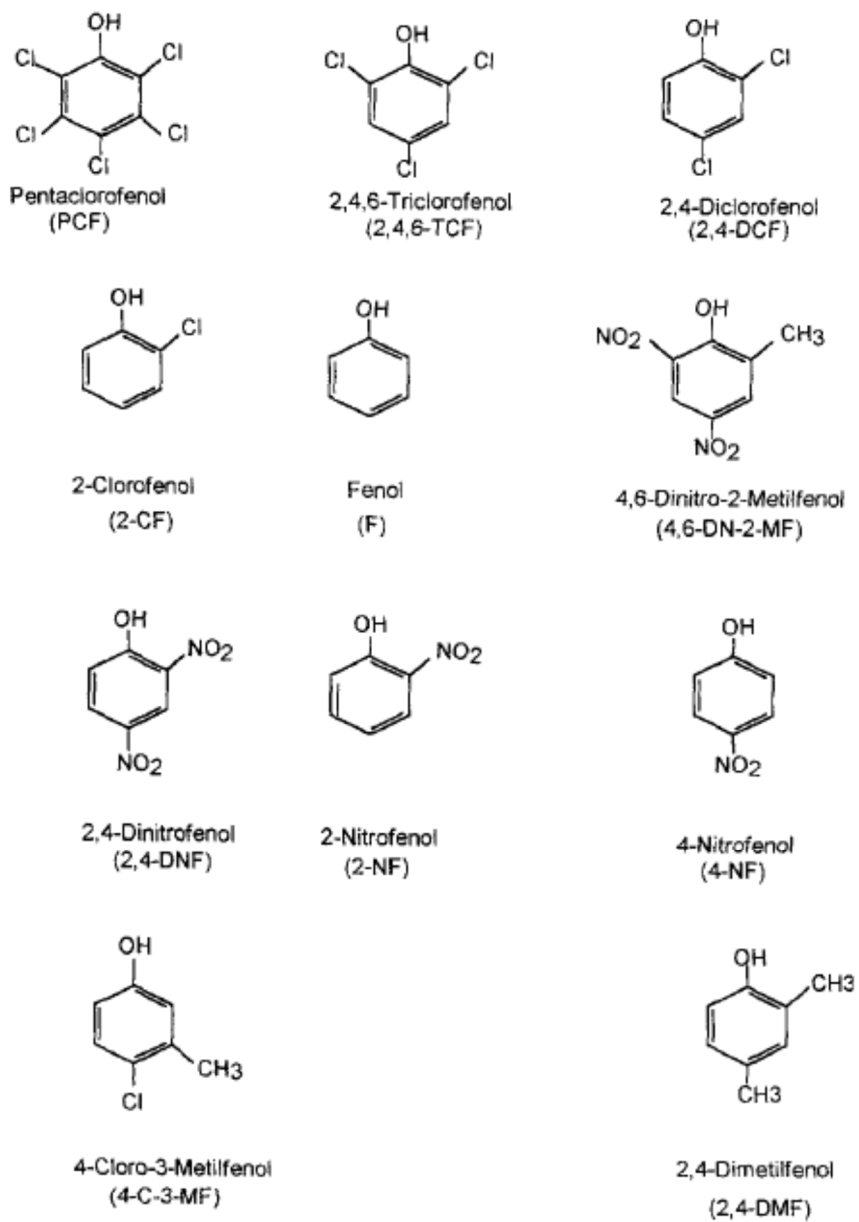


Figura 4: Estructuras y abreviaturas de los principales fenoles contaminantes.

1.3.2. Toxicidad de compuestos fenólicos

La toxicidad del fenol y sus derivados es conocida debido a su utilización como desinfectante desde hace muchos años. Se puede evidenciar la presencia de fenol en agua por su olor y sabor. Se han determinado fenoles en agua en el intervalo de concentración de 0,01 a 0,1 mgL⁻¹ (Harrison y col, 2005).

Por otro lado, la EPA, considera que son once los principales fenoles contaminantes (ver figura 4).

La degradación del fenol en el aire es un proceso rápido, generalmente en uno ó dos días, mientras que en el agua el fenol puede permanecer durante una semana o más.

1.3.3. La exposición aguda al fenol y sus quinonas

La exposición aguda a fenol, causa irritación de la piel, daños al riñón, molestias gastrointestinales, y dolores de cabeza (ATSDR USA, 2008). En los sistemas naturales, este compuesto también genera molestias, con sabor perceptible y olores en el agua, en concentraciones tan bajas como 1,8 mgL⁻¹. La mayoría de los países especifican dentro de sus normativas, la concentración máxima permisible de fenol, en los efluentes, la que debe ser inferior a 1mgL⁻¹. El nivel máximo permitido en Chile, para la descarga de residuos líquidos a aguas marinas y continentales se encuentra entre 0,5 y 1,0 mgL⁻¹ (D.S N°90 del Ministerio Secretaría General de la Presidencia).

En los trabajadores la exposición se da por inhalación y/o contacto con la piel. La exposición prolongada al fenol en el trabajo ha sido asociada con enfermedad cardiovascular. En la población general, la exposición a fenol se daría por ingestión. La ingestión de productos líquidos que contienen fenol concentrado puede producir daño intestinal grave y aun causar la muerte. El contacto con la piel, la aplicación de fenol concentrado puede producir daño grave.

En animales de laboratorio, la inhalación es por una exposición breve a niveles altos de fenol lo que produce irritación de las vías respiratorias y temblores musculares.

La exposición prolongada a niveles altos de fenol produce daño del corazón, los riñones, el hígado y los pulmones.

Por ingestión de fenol, beber agua con niveles de fenol extremadamente altos, produce temblores musculares, dificultad para caminar y la muerte.

Contacto con la piel, una aplicación breve de fenol sobre la piel produce ampollas y quemaduras pero no hay ninguna evidencia que indique que la exposición al fenol produce cáncer en seres humanos.

La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) y la EPA han determinado que el fenol no es clasificable en cuanto a carcinogenicidad en seres humanos (ATSDR USA, 2008).

1.3.4. Importancia de Compuestos Nitrofenólicos

Los Nitrofenoles son sustancias químicas que no se producen naturalmente en el medioambiente. Ellos son como se ha mencionado, componentes comunes de los efluentes industriales y se han detectado en residuos de las zonas urbanas y agrícolas. Los nitrofenoles son intermediarios en la síntesis de pesticidas y colorantes, y se encuentran en el agua de lluvia como resultado de la transformación de alquilbencenos en la tropósfera. Ellos pueden ingresar al ambiente a través de los vertidos industriales, derrames o posiblemente como producto de la descomposición de ciertos plaguicidas que contienen restos de nitrofenoles. Se sabe que los nitrofenoles desajustan la fosforilación oxidativa la cual es dependiente de ATPsintasa (Albert, y col., 4ª Edición 2004) y, es por esta razón que son considerados como contaminantes prioritarios. Para que puedan degradarse estos compuestos, en las profundidades del suelo y en las aguas subterráneas, se requiere de un largo tiempo. La degradación y la mineralización de los nitrofenoles, es posible llevarla a cabo mediante procesos de oxidación, tales como la fotólisis con peróxido de hidrógeno, y también por procesos de degradación biológica, tales como los ocurridos en los peroxisomas a cargo de la enzima catalasa (Beysens y col, 2006).

El 2-nitrofenol y el 4-nitrofenol, son muy similares entre sí. Durante la formación de uno de ellos casi siempre se produce cierta cantidad del otro, por lo que generalmente se les considera en conjunto cuando se discuten sus propiedades y sus efectos perjudiciales (Acker y col, 2008).

El 2-nitrofenol se usa principalmente para manufacturar tinturas, pigmentos, productos de caucho y sustancias para fungicidas. El 4-nitrofenol es usado principalmente

en la manufactura de medicamentos, fungicidas, tinturas, y para oscurecer el color del cuero (Acker y col, 2008).

Cabe destacar que la mayor parte de los nitrofenoles ingresan al medioambiente durante su proceso de manufactura (primarios), sin embargo, también se pueden formar en el aire como resultado de la degradación de muchos otros productos químicos (formación fotoquímica o secundaria).

Gran parte de estos compuestos nitrofenólicos, se depositan en el agua y el suelo; muy poco queda suspendido en el aire. Su degradación ocurre fácilmente en aguas superficiales, no así cuando se depositan en la profundidad del suelo y en las aguas subterráneas, su degradación, demora un largo tiempo.

La exposición de la comunidad a estos compuestos en niveles muy bajos, se da en el aire, el agua y el suelo. Respirando aire contaminado durante su aplicación, o tomando agua contaminada cerca de áreas agrícolas donde se han aplicado ciertos fungicidas; y respirando aire contaminado o tomando agua contaminada cerca de lugares en dónde se han depositado residuos peligrosos y de vertederos (Acker y col, 2008).

1.3.5. Toxicidad de Compuestos Fenólicos y Nitrofenólicos en Bioensayos

Los compuestos fenólicos y sus derivados como nitrofenoles (especialmente: 2-nitrofenol y 4-nitrofenol) han sido clasificados como contaminantes prioritarios por la EPA, es por ello que de acuerdo a la literatura consultada, se ha elaborado una tabla con los principales bioensayos realizados sobre las distintas las especies.

Tabla N°1: Datos de toxicidad aguda, valores de concentración letal del 50%, en mgL⁻¹ a las 24 y 48 horas, para algunos compuestos fenólicos sobre diferentes especies.

Compuesto Fenólico	Valor de LC ₅₀ a las 24 h (mg/L)	Valor de LC ₅₀ a las 48 h (mg/L)	Especie	Referencia
p-Nitrofenol	4,94	-	<i>Daphnia magna</i>	Sponza y cols. 2010
p-Nitrofenol	0,56	-	<i>Photobacterium Phosphoreum</i>	Sponza y cols. 2010
o-Fenilfenol	2,8	-	<i>Daphnia magna</i>	Davoren y cols. 2004
o-Fenilfenol		2,8	<i>Daphnia magna</i>	Davoren y cols. 2004
Fenol	9, 129	-	<i>Daphnia magna</i>	Guilhermino y cols. 2000
Fenol		10	<i>Daphnia magna</i>	Kahru y cols. 2000
Fenol		8,3	<i>Thamnocephalus</i>	Kahru y cols. 2000
2,5-dinitrofenol	3,36	-	<i>Fathead</i>	Summary report cannadian, 1981
2,4-dinitrofenol	4,1	-	<i>Daphnia magna</i>	Summary report cannadian, 1981
3-nitrofenol	27	-	<i>Daphnia magna</i>	Summary report cannadian, 1981
2-nitrofenol	63	-	<i>Daphnia magna</i>	Summary report cannadian, 1981
p-cresol	14	-	<i>Daphnia magna</i>	Guilhermino y cols. 2000

1.4. SALUD Y CÉLULAS

El ser humano se encuentra constantemente expuesto en su medio a una gran variedad de agentes xenobióticos, los cuales pueden ser de origen natural o antropogénico. En general los compuestos lipofílicos son más fácilmente absorbidos a través de la piel, pulmones o del tracto gastrointestinal. La constante exposición a este tipo de sustancias podría resultar en su acumulación dentro del organismo, al menos que se presente un sistema eficaz de eliminación. Con excepción de la exhalación, para que un agente xenobiótico pueda ser eliminado del organismo, requiere que sea soluble en fase acuosa, lo anterior funciona para compuestos no volátiles y en consecuencia serán excretados por la orina y las heces, que son las rutas predominantes de eliminación. Sin embargo, los compuestos lipofílicos que se encuentran en los fluidos de excreción tienden a difundir a través de la membrana plasmática y en consecuencia son reabsorbidos, lo que produciría una acumulación de los agentes xenobióticos lipofílicos en el organismo.

Uno de los mecanismos que posee el organismo humano para hacer frente a estas peligrosas toxinas, como el fenol, es la Catalasa, la cual, es una enzima antioxidante que, como la superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa, se sintetiza en las células y se acumula en los peroxisomas. Una de sus funciones principales es ayudar a que el cuerpo convierta el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, además utiliza peróxido de hidrógeno para descomponer las toxinas potencialmente dañinas para el organismo, como: alcohol, fenol y formaldehído.

La catalasa trabaja estrechamente con la superóxido dismutasa para prevenir los daños de los radicales libres en los peroxisomas. La SOD convierte el radical superóxido en peróxido de hidrógeno, que posteriormente la catalasa lo transforma en agua y oxígeno molecular. Las catalasas son algunas de las enzimas más eficientes que se encuentran en los peroxisomas de todas las células; cada molécula de catalasa puede convertir a millones de moléculas de peróxido de hidrógeno por segundo.

La membrana celular gracias a su estructura tiene selectividad en la absorción tanto de las sustancias endógenas como xenobióticas. Esta selectividad se expresa como la función de diversas formas de absorción específicas para los compuestos hidrosolubles que ingresan a las células con un gasto energético conocido por el nombre de transporte activo, pero por otra parte la mayoría de las células tiene características de

impermeabilidad a una gran mayoría de las sustancias hidrosolubles no deseables, no pueden evitar la absorción de la mayor parte de las sustancias liposolubles. En la figura 5 se esquematizan las principales vías de absorción y eliminación tanto de compuestos endógenos como exógenos.

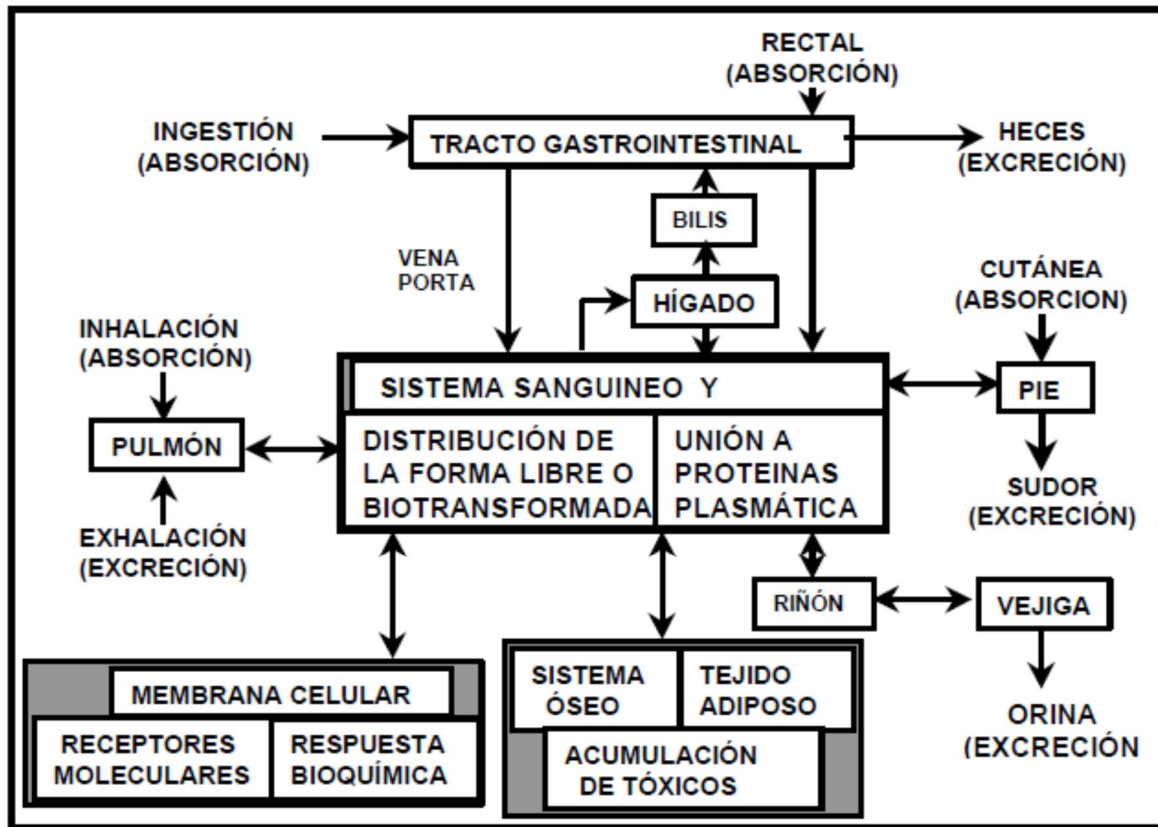


Figura 5: Principales vías de absorción y excreción de xenobióticos (Valle y col, 200)

1.4.1. Absorción

Los organismos superiores han desarrollado un número importante de sistemas metabólicos que convierten los agentes xenobióticos liposolubles en metabolitos hidrosolubles capaces de ser excretados por las vías de eliminación. A esta actividad bioquímica se le ha denominado proceso de Biotransformación, el cual se ha subdividido a su vez en dos grandes etapas de actividad enzimática: Reacciones de Fase I y Reacciones de Fase II, como se observa en la figura 6 a continuación.

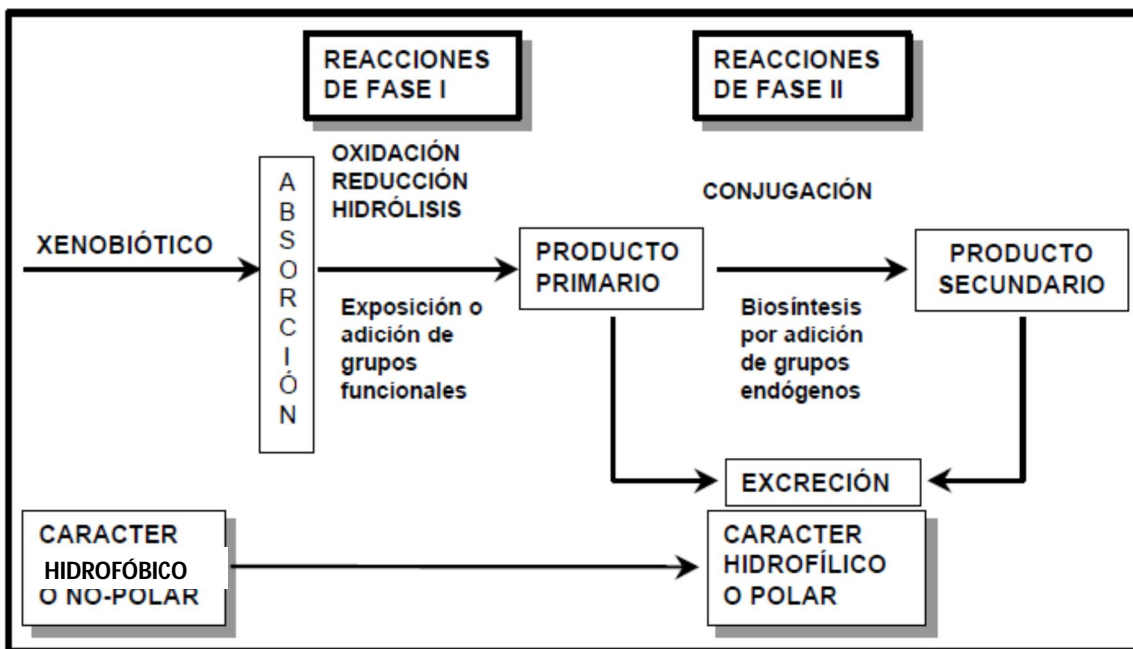


Figura 6: Proceso de biotransformación de xenobióticos (Valle y col, 2000)

La función principal del proceso de biotransformación es precisamente la transformación de los agentes xenobióticos en compuestos polares para facilitar su remoción a través del riñón, principalmente. Sin embargo, cuando se modifica la estructura química del agente xenobiótico, se puede presentar en algunos casos, que se modifique la actividad tóxica y en ocasiones se produce un aumento de la toxicidad, lo que se conoce como bioactivación, como es el caso de las sustancias denominadas procarcinogénicas, las cuales requieren del proceso de biotransformación para manifestar el efecto carcinogénico.

1.4.2. Reacciones de Fase I

La función de este tipo de reacciones, es modificar la estructura química de la molécula, por introducción de grupos funcionales como son hidroxilo, amino, carboxilo entre otros. También, se puede obtener una mayor polaridad del agente xenobiótico por exposición de grupos funcionales como es el proceso de hidrólisis. Posiblemente la oxidación es la reacción más importante de las reacciones de fase I, en general estas reacciones están mediadas por el sistema de oxidación microsomal el cual es realizado por sistemas microsomales ubicados en el Retículo Endoplasmático Liso (REL) de la célula, está constituido por: -citocromo P450, -citocromo P450 reductasa, (sistema

oxidasa de función mixta), el cual requiere del cofactor nicotin-adenin-dinucleotido-reducido (NADPH) como donador inicial de electrones y oxígeno molecular (O_2) como oxidante, este sistema se encuentra en abundancia en hígado y tracto gastrointestinal y para que pueda ser oxidado en el REL tiene que ser liposoluble. Se observa en la figura 7 a continuación.

El enzima permanece anclado a la membrana a través de una hélice hidrofóbica cercana al extremo N-terminal, por lo que la mayor parte de la proteína se sitúa en la cara citosólica de la membrana. Esta hélice transmembrana está seguida, por regla general, por una serie de aminoácidos básicos cuyos residuos interaccionan con las cargas negativas de los lípidos de la membrana (Chapple, C. 1998). Se observa en la figura 7 a continuación.

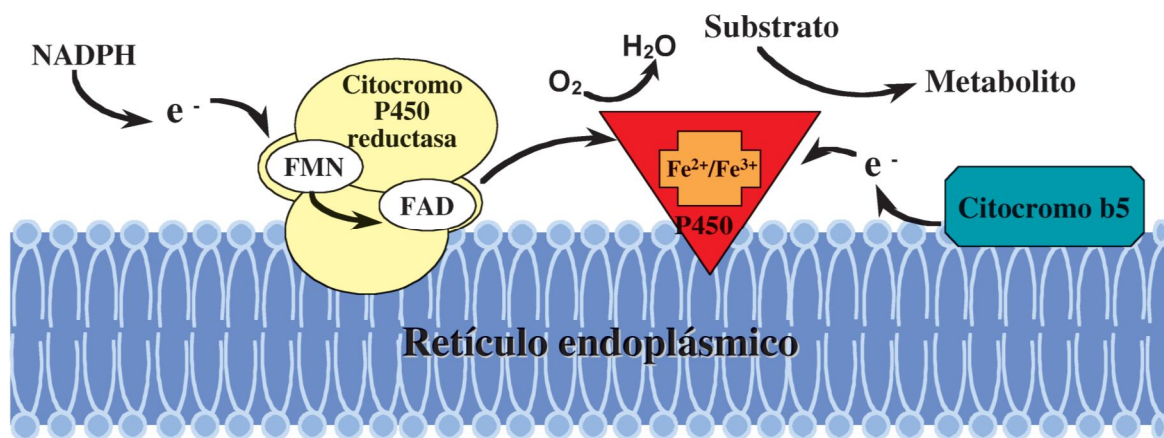


Figura 7: Localización del sistema citocromo P-450 en la membrana del retículo endoplasmático

Reacciones de Fase I:

- Hidroxilación aromática
- Hidroxilación heterocíclica
- N-dealquilación

- N-hidroxilación
- Desulfuración
- Reacciones de oxidación no microsomal
- Reducción
- Hidrólisis

1.4.3. Reacciones de Fase II

Este tipo de reacciones metabólicas son de biosíntesis por lo cual requieren de una variación de energía libre de Gibbs (ΔG°) negativa, por lo tanto, son reacciones enzimáticas que aparte de requerir de ciertos cofactores, necesitan de substratos de ΔG° negativo como es el ATP.

Las reacciones de Fase II también se denominan como reacciones de conjugación, involucran la adición a los compuestos xenobióticos de moléculas endógenas, las cuales generalmente son polares y de alta disponibilidad por parte de la célula. Estos grupos endógenos son adicionados a grupos funcionales presentes ya en los compuestos xenobióticos, o que fueron introducidos o expuestos en la fase I del proceso de biotransformación. El propósito final es de obtener moléculas polares y con bajo coeficiente de partición lípido/agua, para que se facilite su excreción al disminuir substancialmente su carácter lipofílico.

1.4.4. Glucuronidación

La principal reacción de conjugación que se presenta en la mayoría de las células, es la incorporación de ácido glucurónico a través del ácido uridíndifosfatoglucurónico (UDPGA). La obtención del anterior complejo donador proviene de precursores disponibles del metabolismo normal; o sea, que el UDPGA es formado en la fracción soluble de las células hepáticas a partir de la glucosa-1-fosfato, como se observa en la figura 8.

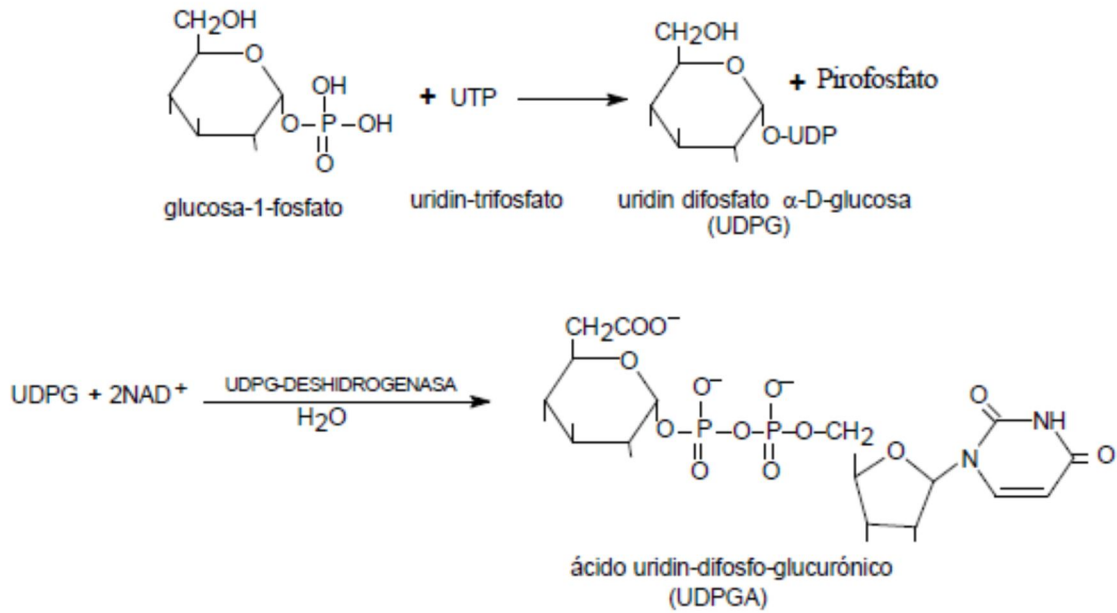


Figura 8: Formación del ácido uridindifosfatoglucurónico (UDPGA) (Valle y col, 2000)

La conjugación del UDPGA con los xenobióticos involucra un ataque nucleofílico de estos compuestos a través de los átomos de oxígeno, nitrógeno o azufre al carbono C-1 del ácido glucurónico, y se observa una inversión de dicho enlace ya que pasa de forma α a β , como se puede observar en la figura 9 donde se ilustra el ataque nucleofílico del fenol sobre el ácido uridindifosfatoglucurónico.

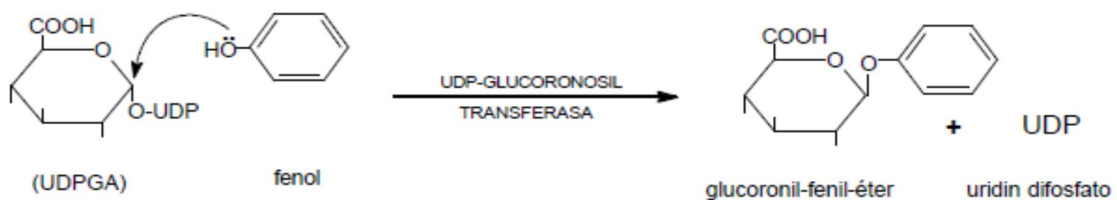


Figura 9: Inversión del enlace α a β en la formación del glucurónido (Valle y col, 2000)

La enzima responsable de la catálisis del proceso de conjugación con UDPGA, es la UDP-glucuronosil-transferasa, la cual se encuentra en la fracción microsomal de varios

tejidos como hígado, riñón, piel, intestino y cerebro, siendo cuantitativamente de mayor importancia en el hígado. En sí, la glucuronidación es el principal proceso de conjugación de las reacciones de fase II, tanto para compuestos endógenos como exógenos, y el resultado es la obtención de conjugados polares solubles en fase acuosa, que puedan ser eliminados del organismo a través de la orina o bilis. Debido a la amplitud de substratos que pueden ser aceptados y la suficiente disponibilidad del donador (UDPGA), hace que la conjugación con ácido glucurónico tanto cualitativa como cuantitativamente sea la más importante reacción de conjugación; así, en la figura 10 se muestran los principales tipos de glucurónidos que se pueden formar a partir de diferentes grupos funcionales de los agentes xenobióticos (Valle y col, 2000).

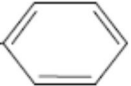
GRUPO FUNCIONAL (G)		TIPO DE GLUCURONIDO
ALCOHOL: alifático alíciclico bencílico fenólico	$G-\ddot{O}H$	éteres glucurónidos
ACIDO: alifático aromático α - β -insaturado	$G-C \begin{matrix} \nearrow O \\ \searrow \ddot{O}H \end{matrix}$	ésteres glucurónidos
ARILAMINAS: alifático	$G-\ddot{N}H$ 	N-glucurónidos
N-HIDROXIL: alifático aromático	$(G)_2-N-\ddot{O}H$	O-glucurónidos
TIOLES: alifático aromático	$G-\ddot{S}H$	S-glucurónidos

Figura 10: Principales tipos de glucurónidos donde se muestra el grupo nucleofílico (Valle y col, 2000).

1.4.5. Sulfatación

En lo mamíferos, una importante conjugación para varios tipos de grupos hidroxilo es la formación de ésteres de sulfato. Esta misma reacción también se puede presentar con grupos amino; así, los substratos de esta conjugación pueden ser: alcoholes alifáticos, aminas aromáticas, fenoles y compuestos endógenos tales como esteroides y carbohidratos. En este proceso de conjugación el donador del compuesto endógeno (sulfato) es el 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfato (PAPS), el cual a su vez requiere ATP para su formación, como se observa en la figura 11. El sulfato inorgánico precursor del PAPS se puede presentar cuando existan concentraciones significativas para realizar el proceso de conjugación (Valle y col, 2000).

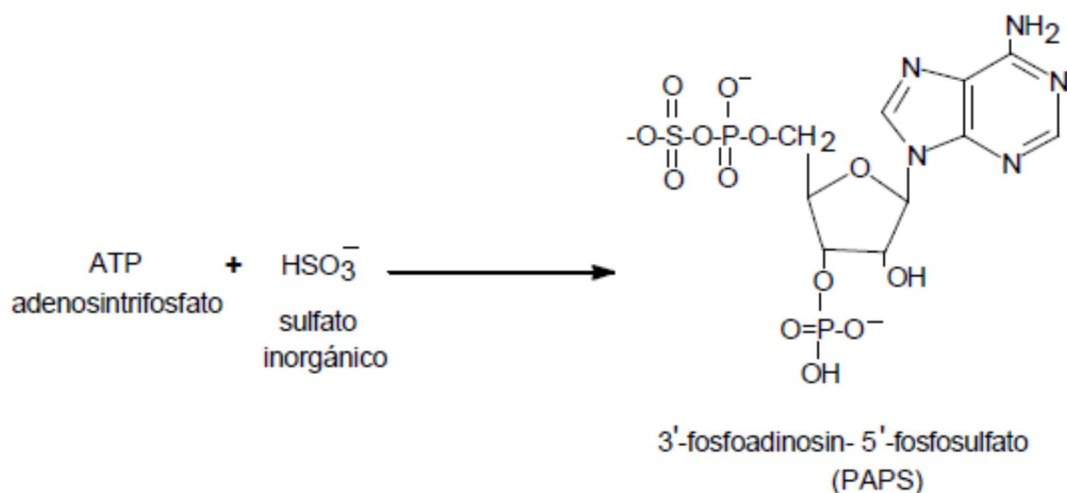


Figura 11: Formación del fosfoadenosin-fosfosulfato (PAPS)

El proceso de sulfatación es un efectivo proceso de detoxificación, ya que los conjugados formados, son sulfatos orgánicos ionizados que son relativamente fáciles de excretar, principalmente a través del riñón. Sin embargo, debido a que el sulfato inorgánico requerido para la síntesis del PAPS parece provenir de la cisteína, este aminoácido es un factor limitante de dicho proceso de conjugación; así, tenemos que la sulfatación de fenoles o aril-alcoholes tiene una baja capacidad y por consiguiente la mayor alternativa para este tipo de compuestos es la glucuronidación.

1.4.6. Integración del proceso de Biotransformación

Se sabe que el proceso de biotransformación consiste en la eliminación de sustancias extrañas que llegan a penetrar el organismo, por lo cual es un proceso detoxificante al evitar su acumulación, también se pueden presentar fenómenos de bioactivación, siendo, estos últimos más bien casos excepcionales.

El proceso de biotransformación es muy complejo, donde tiene gran relevancia el factor genético; así, tenemos que sobre un mismo agente xenobiótico hay diferencia tanto cualitativa como cuantitativa de los metabolitos formados por diferentes especies. A continuación se muestra el proceso de biotransformación del fenol en la figura 12.

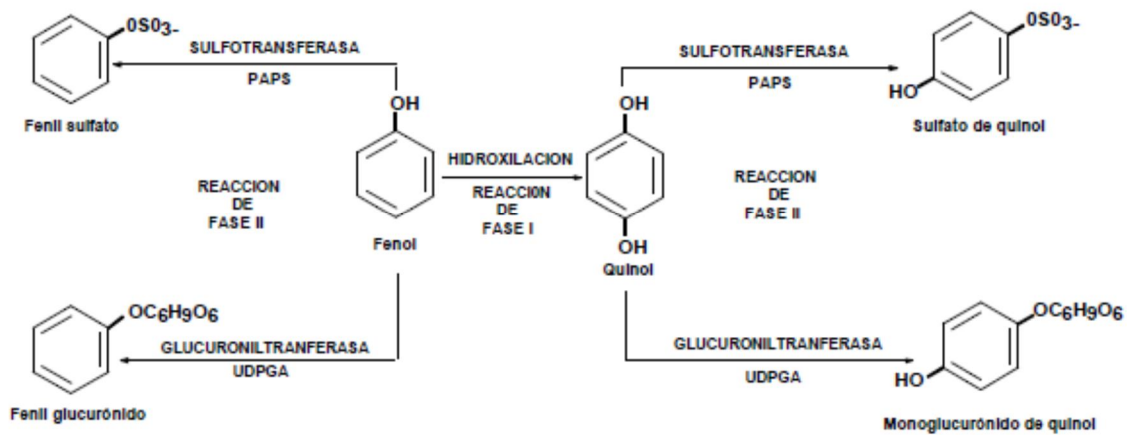


Figura 12: Variación interespecie en la conversión metabólica del fenol (Valle y col, 2000)

Este proceso de Biotransformación ocurre en la membrana del REL.

1.5. ROCÍO

El rocío es el resultado de la condensación de las moléculas de agua sobre una superficie fría. La cantidad condensada depende de la humedad relativa y de la variación de temperatura (Beysens y col, 1995). El rocío es muy abundante en atmósferas sin nubes y sin vientos. Generalmente es posible recolectar alrededor de **800 mL/m²**, los que pueden ser utilizados por plantas, animales pequeños, especialmente en zonas secas contribuyendo a la supervivencia de esas especies.

La formación del rocío cambia las propiedades de la superficie y así puede contribuir a su eficiencia en la captura de contaminantes. El rocío se produce sobre la superficie y contribuye a la remoción de contaminantes secos en la atmósfera, los cuales pueden ser gaseosos, o también pueden estar asociados al material particulado.

Su composición estará determinada por las características de la atmósfera durante la formación y por la captura de contaminantes durante su permanencia en la superficie capturante.

Los estudios realizados en distintas ciudades muestran diferencias notables en su composición química, que se explican por las diferencias en las atmósferas en contacto con las superficies mojadas. En la ciudad de Gokurakuj (Japón), el rocío es de tipo ácido con altos contenidos de iones sulfatos y nitratos, en cambio en la ciudad de Sakai, se encontró rocío con altas concentraciones de nitrito (Takenaka y col, 2003). Por otra parte, en la zona de Bordeaux (Francia), el rocío está débilmente mineralizado (Acker y col, 2008).

En la ciudad de Santiago, el rocío es de tipo básico, con altas concentraciones de iones y particularmente con altos contenidos de nitrito (Rubio y col, 2001) y se produce entre abril y octubre. Se ha propuesto que podrían ser una fuente y a la vez sumidero de contaminantes. Esto quiere decir que, antes que ocurra la condensación de agua, sobre la superficie se ha depositado material particulado con probabilidad de contener contaminantes fenólicos. Asimismo, el rocío remueve material particulado de tamaño depositable que también podría contener fenoles. Una vez depositado podrían ocurrir reacciones químicas, descomposición o formación de éstos, descomposición microbiana y/o descomposición catalizada por trazas de metales. Finalmente, cuando aumenta la

temperatura y hay radiación solar, estos compuestos podrían fotolizar y entregar contaminantes a las superficies o bien ser evaporados y comenzar un nuevo ciclo. De tal modo que, la determinación de estos compuestos en agua de rocío, y en fase gas podría ser útil para un estudio de fuentes de generación de los mismos, ya que algunos de ellos presentan valores altos de constantes de Henry, por ejemplo el 2-nitrofenol, tiene un valor de $\sim 60 \text{ M atm}^{-1}$.

Debido a lo expuesto anteriormente, es de interés investigar sobre la presencia de compuestos fenólicos en el rocío de Santiago (Zona Centro) y evaluar su posible efecto tóxico, con el fin de esclarecer su papel en la contaminación atmosférica.

Determinación de la precisión del bioensayo de *Daphnia magna* a partir de diez ensayos consecutivos, usando como tóxico de referencia dicromato de potasio. Mediante la CI50 de cada uno de estos diez ensayos se estimaron la reproducibilidad de la carta control y el coeficiente de variación. Luego se procedió a investigar la toxicidad de los compuestos fenólicos seleccionados, y de la muestra de rocío.

El ensayo realizado en *Daphnias*, para evaluar la toxicidad aguda de las muestras de rocío, se hizo según la Norma Chilena Oficial 2083 del Instituto Nacional de Normalización, INN.

2. OBJETIVOS

- Identificar compuestos fenólicos presentes en aguas de rocío de una comuna de la ciudad de Santiago, Chile.
- Determinar la concentración de fenoles y nitrofenoles detectados en muestras de aguas de rocío de la ciudad de Santiago.
- Determinar la ecotoxicidad mediante bioensayos con *Daphnia magna* en las muestras de rocío y probar la toxicidad de los componentes nitrofenólicos puros encontrados en las aguas de rocío, en mayor concentración.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

- Fenol, (C₆H₆O), Sigma- Aldrich
- 2-nitrofenol, (C₆H₅NO₃), Sigma- Aldrich
- 3- nitrofenol (C₆H₅NO₃), Sigma- Aldrich
- 4-nitrofenol, (C₆H₅NO₃), Sigma- Aldrich
- 2,3-dinitrofenol, (C₆H₄N₂O₅), Sigma- Aldrich
- 2,5-dinitrofenol, (C₆H₄N₂O₅), Sigma- Aldrich
- 2,6-dinitrofenol, (C₆H₄N₂O₅), Sigma- Aldrich
- Cartuchos pre-concentradores Licrolut EN 200 mg (Merck).

3.2. Soluciones

- Solución Agua reconstituida de dureza media (180 mgL⁻¹ CaCO₃), para mantención de organismos y para bioensayo de toxicidad aguda
- Solución patrón de dicromato de potasio, para carta control, bioensayo *Daphnia*.
- Soluciones patrones de nitrofenoles para bioensayo con *Daphnia magna*:

3.3. Equipos

- Cromatógrafo de líquidos (HPLC). Marca Waters, bomba Waters 600 y detector Waters 2996 (Photodiode Array Detector).
- Espectrofotómetro de absorción UV-VIS marca Shimadzu modelo UV-160 Ati Unicam UV-4.
- pH meter, Hanna pH 213 microprocessor pH meter
- Conductivímetro, Orion model 150 A

3.4. Recolección de rocío

Las muestras de rocío fueron recolectadas sobre un film de teflón soportado sobre material aislante de espuma plástica, sus dimensiones son de 1 m² x 0,4mm, plegado en la mitad con un ángulo de 90° (figura 13), acondicionado con un frasco y embudo de polietileno.



Figura 13: Muestreador manual de rocío

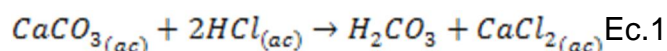
El frasco de polietileno y el film de teflón de los muestreadores se sometieron a una limpieza analítica, la que incluye lavado con solución acida y agua calidad Milli-Q, para desechar contaminantes, antes de ser usados para la recolección de rocío.

Una vez recolectada el agua de rocío, se le mide pH y conductividad, luego se filtra y una parte (50mL) se almacena para análisis físico-químico y otra fracción se somete al

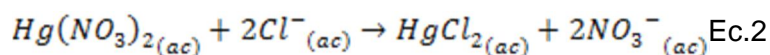
3.5.3. Determinación de alcalinidad total: Se realizó mediante una titulación con un ácido fuerte.

Este método es útil en agua potable, superficial e industrial. Es apropiada para todo intervalo de concentración de alcalinidad.

Se valora con ácido clorhídrico, una alícuota exactamente medida a la que se le agregó indicador anaranjado de metilo. Pasando el punto de equivalencia (pH 6,4) la solución se tornará de color anaranjado. En este punto, el carbonato presente en la muestra estará como ácido carbónico.



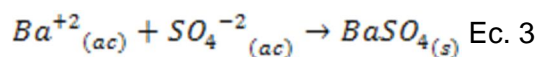
3.5.4. Determinación de cloruros: La determinación de cloruros se realiza a través de una valoración con $Hg(NO_3)_2$, utilizándose difenilcarbazona como indicador.



El cloruro total de la muestra se somete a tratamiento con $Hg(NO_3)_2$ para formar un complejo de color púrpura que indica el punto final. Es necesario agregar ácido nítrico a la muestra para ajustar el pH a 2,0.

3.5.5. Sulfatos: Se empleó la determinación por turbidimetría.

La concentración de sulfato en una muestra de agua se basa en la formación de un precipitado fino de sulfato de bario, el cual puede ser determinado espectrofotométricamente.



Este método es apropiado para un amplio intervalo concentración. Sin embargo para obtener lecturas confiables la concentración en la muestra no debe ser mayor a 40 mgL^{-1} de SO_4^{-2} . Teniendo un límite de detección aproximadamente a 1 mgL^{-1} . (Agam y col, 2006).

Para la determinación se agrega en un tubo Ependorf, 1 mL de muestra, más 0,05 mL de reactivo condicionante y una punta de espátula de cloruro de bario en cristales. Se debe agitar durante 1 minuto, luego dejar en reposo durante 4 minutos y agitar

posteriormente 15 segundos para medir su absorbancia a 500 nm (verde azulado), en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160.

3.5.6. Amonio: Se empleó el método del azul de indofenol.

El método es aplicable en la determinación de amonio en un intervalo de 0,04 a 2 mg de NH_4 por mL.

Reactivo A: Se disuelven 13,5 g de fenol ($\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_4$) y 150 mg de nitroprusiato de sodio ($\text{N}_2\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}_x \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en un matraz aforado de 1L con agua Milli-Q.

Reactivo B: Se disuelven 1,8 g de NaOH en una pequeña cantidad de agua en un matraz volumétrico de 100 mL. Agregar 4 mL de solución de hipoclorito de sodio 1M y diluir en agua.

Procedimiento: transferir 5mL de muestra y 5 mL de agua en tubos de 30 mL. Agregar 250 μL de reactivo A y mezclar. Llevar los tubos a baño de agua a 50°C por dos horas. Enfriar la solución a temperatura ambiente y medir la absorbancia a 630 nm (anaranjado-rojizo).

3.5.7. Determinación de cationes: calcio, potasio, magnesio y sodio por Espectroscopia de Absorción Atómica.

Determinación de cationes: Cationes mayoritarios

La determinación de cationes mayoritarios, como sodio, potasio, magnesio y calcio se determina por absorción atómica. Con este propósito, se preparan curvas de calibración múltiple en un intervalo de concentración de 0 a 50 ppm, utilizando como solvente una solución de HNO_3 (Suprapur) al 2%.

La Figura 14 muestra la curva de calibración obtenida para el calcio

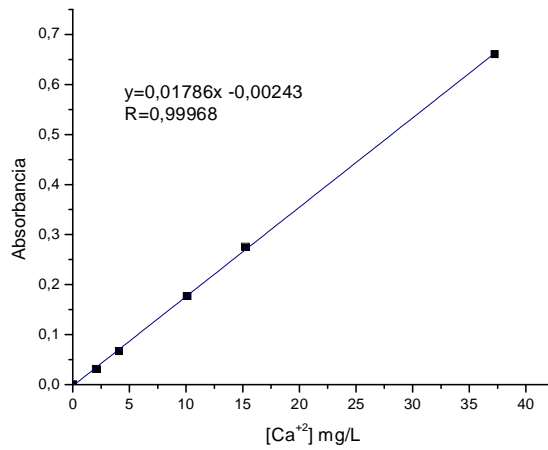


Figura 14: Curva calibración de calcio

Interpolando, se calcula la concentración de calcio para cada una de las muestras.

El mismo procedimiento se realiza para sodio, magnesio y potasio. Las curvas de calibración se muestran en anexos.

3.6. Identificación y Cuantificación de fenoles en agua de rocío

La mezcla 10 veces concentrada se somete a análisis cromatográfico mediante HPLC. Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC), con detector **PDA**, Waters 2996. Se identificaron las señales por comparación con patrones, una vez identificados se cuantificaron los compuestos por una curva de calibración.

- Fase móvil, la que consiste en una mezcla de soluciones buffer, Fase móvil A:B (55:45)

- A: solución 0,005 M de KH_2PO_4 pH=4,5 y acetonitrilo en las proporciones (90:10 v/v)

- B: solución 0,005 M de KH_2PO_4 pH=4,5 y acetonitrilo en las proporciones (25:75 v/v).

Fase estacionaria

-Columna C-18 Symetry RPC de 18 Carbonos (18 - 4,6 x 250 mm).

En la figura 15 se muestra la mezcla multipatrón confeccionada, para la identificación de compuestos fenólicos.

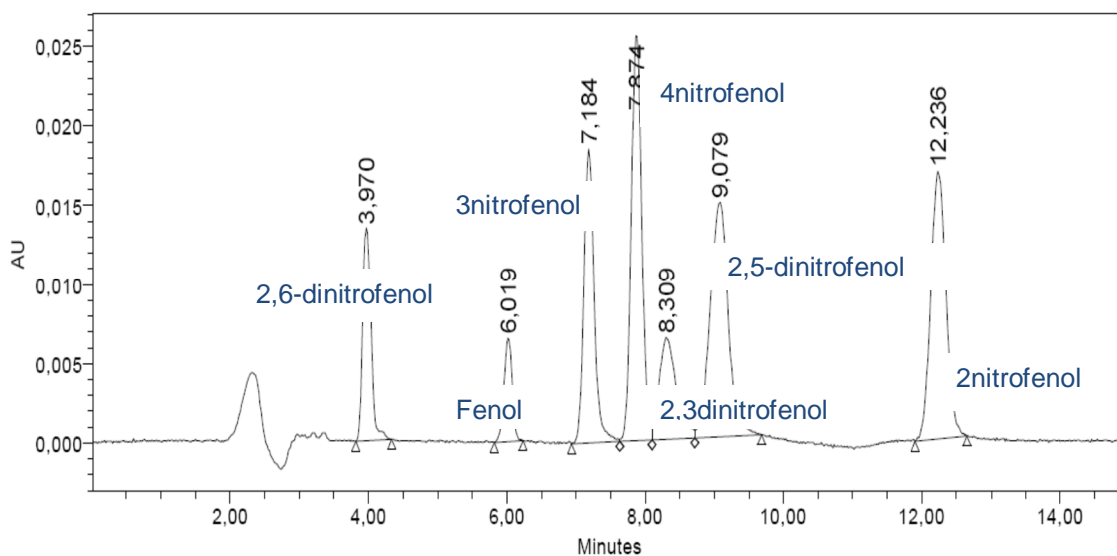


Figura 15: Cromatograma tipo de una solución multi-patrón.

Tabla 2: Identificación de compuestos en la muestra multi-patrón, y sus tiempos de retención en minutos.

N°	TR [min]	Compuesto
1	3,97	2,6-dinitrofenol (2,6-DNF)
2	6,019	Fenol (F)
3	7,184	3-nitrofenol (3-NF)
4	7,874	4-nitrofenol (4-NF)
5	8,309	2,3-dinitrofenol(2,3-DNF)
6	9,079	2,5-dinitrofenol (2,5-DNF)
7	12,236	2-nitrofenol (2-NF)

3.7. Curva de calibración. Determinación de la concentración de fenoles

A partir de las soluciones patrón de cada compuesto fenólico puro de concentración 1×10^{-3} M, se prepararon cuatro soluciones patrón múltiple (mezcla de todos los fenoles) de concentraciones: $0,5 \times 10^{-5}$ M, $1,0 \times 10^{-5}$ M, $0,5 \times 10^{-4}$ M y $1,0 \times 10^{-4}$ M, para confeccionar la curva de calibración de cada fenol. Los cromatogramas de los patrones de calibración, permiten la identificación comparando tiempos de retención y espectro de absorción en la fase móvil usada.

En las figuras 16, A: cromatograma, B: espectro del fenol, compuesto puro, y su curva de calibración, se aprecia en la figura 17. En el Anexo N°8 se muestran los cromatogramas, espectros de absorción, curvas de calibración y límites de detección para los otros compuestos estudiados.

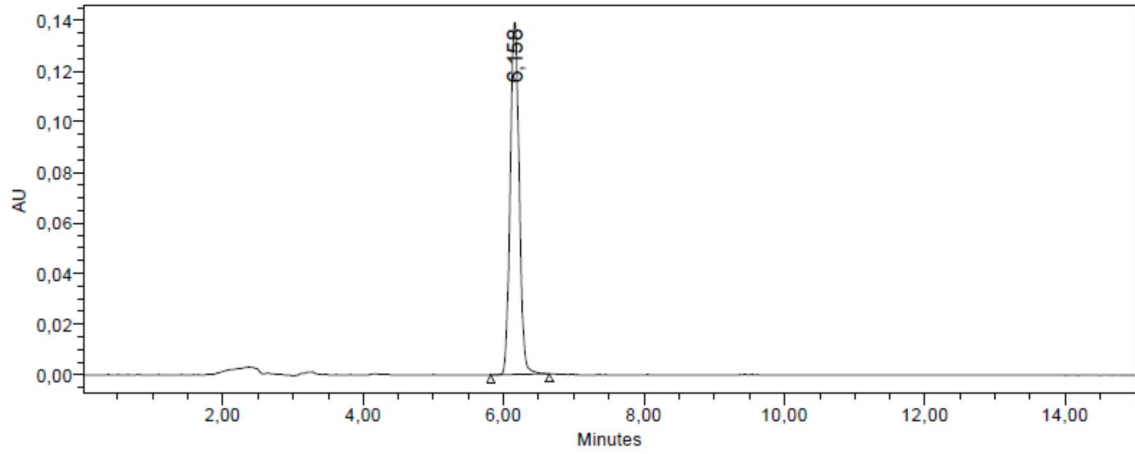


Figura 16, A: Cromatograma del patrón de fenol.

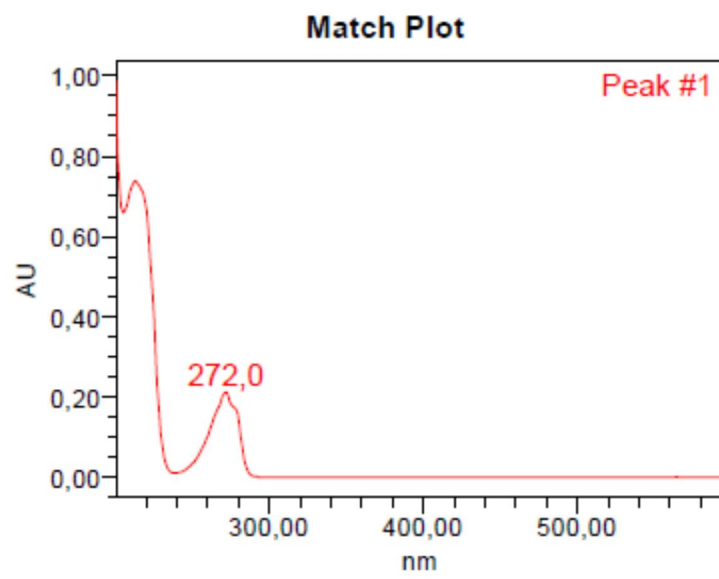


Figura 16, B: Espectro de absorción de fenol.

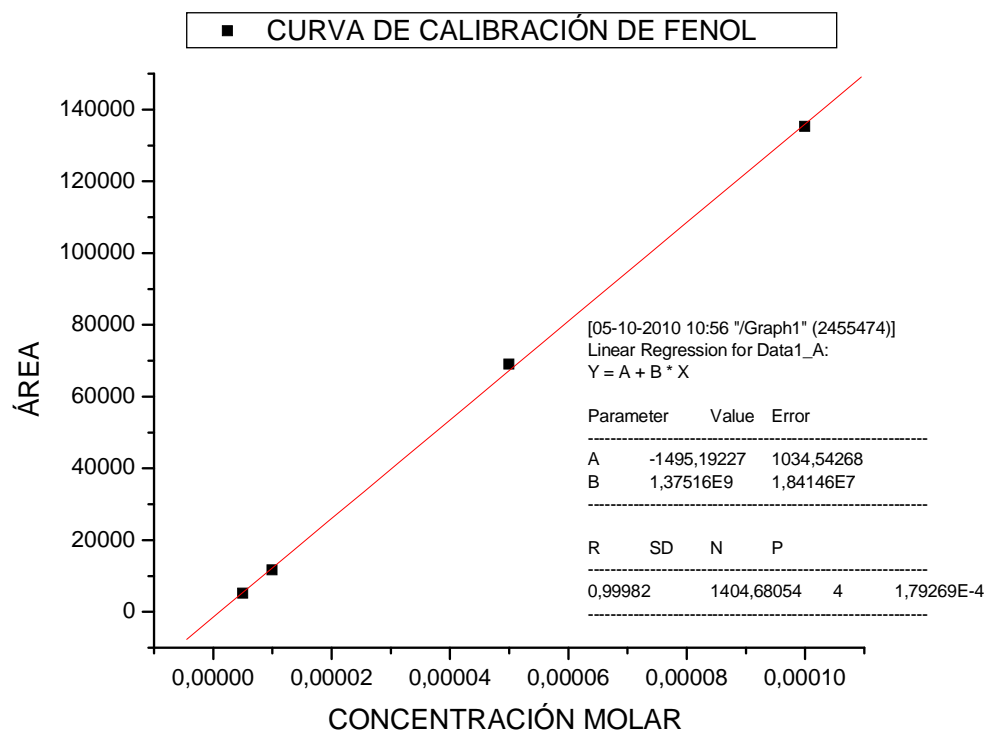


Figura 17: Curva de calibración de fenol, a partir de patrones múltiples.

3.8. Estabilidad de Compuestos Fenólicos

El estudio de estabilidad se dividió en tres grupos de ensayos:

Primer ensayo: efecto de la temperatura ambiente

Se preparó una muestra por duplicado con 5 mL de rocío más 1 mL de los siguientes compuestos: fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol y 2,6-dinitrofenol. Se midieron las muestras por HPLC, a los 0, 120, 300, 420 minutos posteriores a la preparación de la mezcla. Posteriormente, se calcularon las concentraciones de los nitrofenoles en base a las curvas anteriormente obtenidas con los patrones diluidos.

Segundo ensayo: Efecto del peróxido de hidrógeno a pH 3

La muestra se preparó con 4 mL de rocío más 400 μ L de mezcla de nitrofenoles, más 25 μ L de H_2O_2 10 μ M. Se midió en HPLC a los 0, 60, 90, 120, 180, 285 y 435 minutos.

Tercer ensayo: Efecto del pH y el peróxido de hidrógeno

Se preparó una segunda muestra consistente en 1 mL de rocío envejecido (muestra de rocío compuesta del año 2010) más 1 ml de cada uno de los fenoles en estudio, fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol y 2,6-dinitrofenol, se llevó a pH 6,5, y, luego se fueron midiendo por HPLC, alícuotas cada 15 minutos: La muestra, estaba dentro de un baño termorregulado a 25°C, por 7 horas.

3.9. Estimación de Biotoxicidad Aguda mediante ensayos con *Daphnia magna*

Se realizó el estudio del grado de toxicidad de nitrofenoles, por medio de bioensayos de ecotoxicidad, con *Daphnia magna*, según la Norma Chilena Oficial N° 2083 del Instituto Nacional de Normalización (INN). Esta norma describe el método para la determinación de la toxicidad aguda, empleando *Daphnia magna* y/o *Daphnia pulex* en:

- sustancias químicas solubles bajo las condiciones de la prueba;
- efluentes industriales, tratados o no tratados, después de decantación o filtración si es necesario;
- efluentes de aguas servidas, tratadas o no tratadas, después de decantación o filtración si es necesario;
- aguas superficiales continentales o subterráneas.

Para los ensayos realizados se utilizaron cultivos de *Daphnia magna* (cladóceras) de tercera generación.

El estudio contempló, efectuar todas las pruebas preliminares para determinar el intervalo de concentración de la muestra, en que se debe efectuar el bioensayo definitivo. Después de 24 h y 48 h de incubación, se registra el intervalo de concentración en que se obtiene el 0% y el 100% de inmovilización, así como también se realizan los controles (negativos y/o positivos) y las diluciones necesarias, previo a los ensayos definitivos, los que permitirán determinar la CI_{50} * a las 24 y 48 horas.

(*) CI_{50-24h} : estimación de la concentración de muestra que inmoviliza el 50% de los organismos en 24 h, expresada en porcentaje de muestra o en mgL^{-1} .

CI_{50-48h} : estimación de la concentración de muestra que inmoviliza el 50% de los organismos en 48 h, expresada en porcentaje de muestra o en mgL^{-1} .

Se verificó la sensibilidad de *Daphnia magna* a los nitrofenoles, para evaluar la respuesta de los organismos a los compuestos tóxicos. Para verificar la sensibilidad de los organismos se debe determinar al menos mensualmente la CI_{50-24h} usando como control positivo, diferentes concentraciones de dicromato de potasio en agua reconstituida. Valor que debe ser incluido en la carta de control.

La CI_{50-24h} de los organismos frente al dicromato debe estar dentro del intervalo de las medias aritméticas establecidas en la carta de control para cada especie el cual debe estar entre $0,6 \text{ mgL}^{-1}$ y $1,7 \text{ mgL}^{-1}$ para *D. magna* (según NCh 2083).

Se interpretaron y validaron los resultados, previo a determinar su precisión y reproducibilidad.

Se determinó la carta control y el coeficiente de variación, el que debe ser $\leq 30\%$, estos datos son fundamentales para informar los resultados finales de toxicidad, ya que, a través de la carta de control se especifica la sensibilidad de los organismos y la precisión de los resultados la obtenemos con el coeficiente de variación.

3.9.1. Preparación y mantención del cultivo de *Daphnia magna*

Los cultivos de *D. magna* pueden mantenerse en recipientes de uno, dos o tres litros o cualquier otro sistema que resulte funcional. Con el fin de mantener condiciones óptimas para el crecimiento de los individuos, se recomienda una densidad poblacional no mayor de doce individuos por litro (en general se usan diez individuos por litro).

Los organismos se mantienen en agua reconstituida con una dureza entre 160 y 180 $\text{mg CaCO}_3\text{L}^{-1}$. El agua se prepara en el laboratorio y puede suplementarse con una solución de vitaminas y selenio cuando se detecten problemas en la reproducción, o se presente una alta mortalidad entre los 14 y 21 días por malformación de las antenas.

Los cultivos se mantienen a una temperatura de $21 \pm 2^\circ\text{C}$, un fotoperiodo aproximado de 16 h luz / 8 h oscuridad y una intensidad lumínica de alrededor de 800 luxh^{-1} . (Castillo Gabriela, Editora; 2004)

3.9.2. Agua reconstituida

Como agua de dilución y agua de cultivo se utiliza agua reconstituida que consiste en agua para análisis clase 4 según NCh426/2, a la cual se le agregan sales inorgánicas de grado analítico (p.a) en las cantidades que se indican a continuación:

Sales para 1 Litro de agua reconstituida (medio de cultivo para *Daphnias*)

- 1) $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 11,76 g
- 2) $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ 4,93 g
- 3) NaHCO_3 2,59 g
- 4) KCl 0,23 g

Se obtiene una calidad final del agua de pH 7,8 – 8,0 y una dureza de $250 \text{CaCO}_3 \text{mgL}^{-1}$.

El agua preparada debe tener una conductividad máxima de $10 \mu\text{S/cm}$ y debe airearse hasta que el oxígeno disuelto alcance 100% saturación (a 20°C) y el pH se estabilice.

Se debe suministrar alimento a las *Daphnias* consistente en una solución de proteínas, de 2mLL^{-1} cada 48 horas de solución de cultivo; y de una preparación de algas de la especie denominada *Selenastrum capricornutum* de la que se agregan 3mLL^{-1} cada 48 horas de solución de cultivo. Este alimento se proporciona tres veces a la semana, y al cabo de doce días aproximadamente, se obtiene la primera generación de *Daphnias*, la que no se usa, sino la de tercera generación, éstos son los organismos que se utilizarán para el bioensayo.

Para mantener el cultivo de *Daphnias*, se debe filtrar un tercio del agua de cultivo y reponer dos tercios con agua fresca tres veces a la semana, y posteriormente suministrar el alimento especificado en el párrafo anterior (Castillo Gabriela, Editora; 2004).

El procedimiento de la prueba de toxicidad con *Daphnia magna*, se aprecia en el siguiente diagrama de flujo:

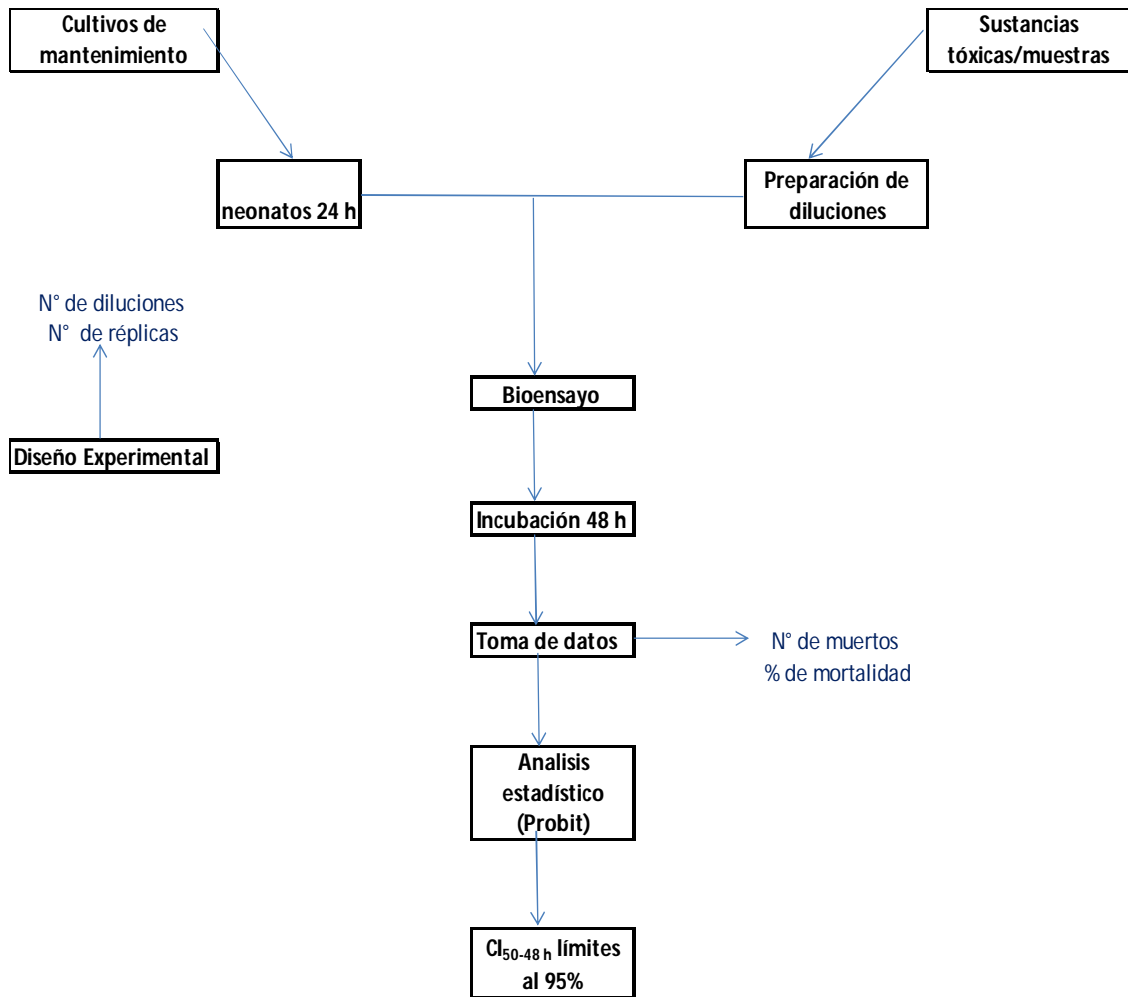


Figura 18: Diagrama del procedimiento experimental de Bioensayos



Figura 19: *Daphnia magna*

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización fisicoquímica del rocío

La caracterización fisicoquímica se muestra en la Tabla 3, donde se observan los valores de: pH, conductividad en μS , y volumen en mL. El pH promedio fue de 7,3. Altos valores de conductividad están señalando la presencia de iones en solución. La Tabla 3 muestra, el contenido de algunos metales en las muestras de agua de rocío tales como: calcio, sodio, potasio, magnesio, amonio; y de aniones: sulfato, nitrato, nitrito, y cloruro, los que se muestran en la Tabla 4.

Tabla 3: Valores de pH, conductividad y volumen de las muestras de agua de rocío recolectadas.

MUESTRA	VOLUMEN, mL	pH	CONDUCTIVIDAD, μS
1	20	7,54	96,8
2	100	7,52	108,2
3	66	7,15	66,0
4	55	6,96	66,3
5	100	7,27	126,5
6	100	6,79	248,0
7	100	7,07	128,8
8	130	7,69	132,6
9	128	7,07	206,0
10	67	7,53	143,9
11	41	7,71	209,0
12	97	7,75	95,3
13	207	7,65	133,7
14	73	6,95	326,0
15	266	7,3	117,1
16	82	7,54	631,0
17	96	7,42	102,4
18	88	7,56	224,0
19	56	7,15	568,0
20	195	7,12	232,0
21	90	6,79	316,0
22	53	7,63	221,0
Promedio	100	7,33	204
Máx	266	7,75	631
Mín	20	6,79	66

Los resultados del análisis iónico en las muestras de agua de rocío se muestran en la Tabla 4, presentada a continuación.

Tabla 4: Valores de concentración (μEqL^{-1}) promedio de iones medidos en agua de rocío.

Muestra	Nitrito	Nitrato	Sulfato	Cloruro	Calcio	Sodio	Potasio	Magnesio	Amonio
Rocío	103	619	385	381	809	256	52	59	179

La presencia de los iones calcio, nitrato y sulfato son mayoritarios.

La relación cargas positivas a negativas es cercana a 1.

$$\sum A^- = \sum C^+$$

$$1488 [\mu\text{EqL}^{-1}] = 1355 [\mu\text{EqL}^{-1}]$$

4.2. Identificación y Cuantificación de Fenoles mediante Cromatografía líquida de alta resolución

La Figura 20, muestra un cromatograma típico obtenido en las muestras estudiadas. Se observa que las señales de cada compuesto fenólico están separadas y resueltas, excepto entre el 2,6-dinitrofenol (tiempo de retención: 4,587 minutos) y 2,4-dinitrofenol, las que podrían estar solapadas.

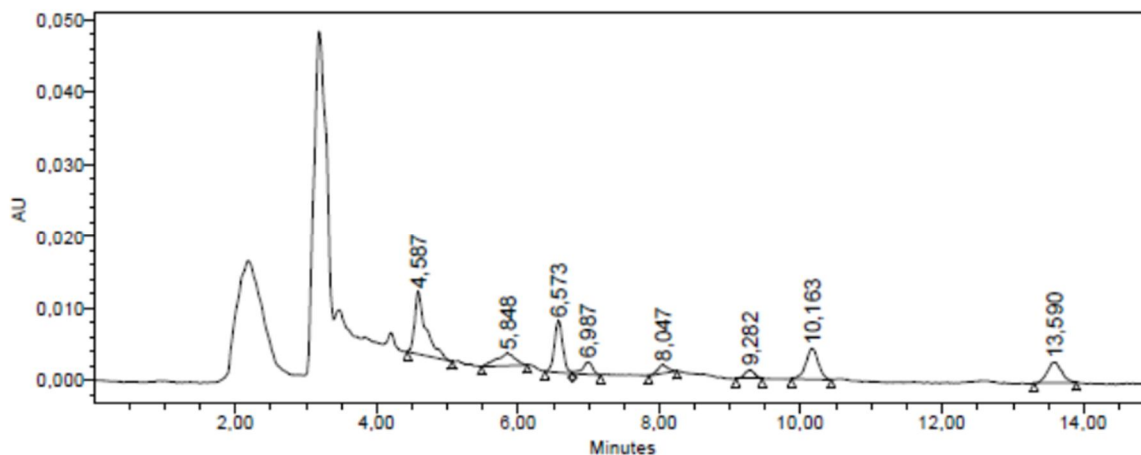


Figura 20: Cromatograma de una muestra de rocío concentrada, del día 24 de agosto de 2010.

Los resultados obtenidos en la identificación y cuantificación de fenoles realizados por cromatografía HPLC, se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5: Concentraciones en mgL^{-1} de compuestos fenólicos en las muestras de rocío.

Muestra	Fenol	2-nitrofenol	3-nitrofenol	4-nitrofenol	2,5-dinitrofenol	2,6-dinitrofenol	2,3-dinitrofenol
1	0,078	0,060	0,016	0,015	n.d	n.d	0,103
2	0,059	0,014	0,004	0,042	0,024	n.d	n.d
3	n.d	0,011	0,003	0,017	n.d	n.d	n.d
4	0,009	0,010	0,003	n.d	n.d	n.d	n.d
5	0,019	0,005	0,001	0,012	n.d	n.d	n.d
6	0,034	n.d	n.d	0,156	0,031	n.d	n.d
7	0,059	0,010	0,003	0,018	n.d	n.d	0,019
8	0,107	0,012	0,003	n.d	n.d	n.d	0,031
9	0,026	n.d	n.d	0,015	0,013	n.d	n.d
10	0,053	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
11	0,198	n.d	n.d	n.d	0,155	n.d	0,043
12	0,280	n.d	n.d	n.d	0,022	n.d	n.d
13	0,049	0,005	0,001	0,011	n.d	n.d	n.d
14	0,055	0,011	0,003	0,020	n.d	0,037	n.d
15	0,008	n.d	n.d	n.d	n.d	0,006	n.d
16	0,054	n.d	n.d	0,012	n.d	0,075	n.d
17	0,063	0,012	0,003	0,012	n.d	0,050	n.d
18	0,039	0,008	0,002	0,012	n.d	0,089	n.d
19	0,168	0,022	0,006	0,095	0,044	0,976	n.d
20	0,038	0,006	0,002	0,014	0,009	0,078	0,012
21	0,035	0,010	0,003	0,010	n.d	0,096	n.d
22	0,093	0,016	0,004	0,026	n.d	0,201	n.d
Promedio	0,072	0,014	0,004	0,030	0,043	0,179	0,042
máximo	0,280	0,060	0,016	0,156	0,155	0,976	0,103
mínimo	0,008	0,005	0,001	0,010	0,009	0,006	0,012

(*) n.d: no disponible

De los datos anteriores se puede apreciar que las concentraciones son muy bajas, del orden de ppb. El promedio señala que 2,6-dinitrofenol, está presente en mayor concentración. Sin embargo, un análisis más preciso se muestra en la Tabla 6, en donde la concentración se calcula en base a concentración promedio en las muestras con concentraciones medibles.

Tabla 6: Concentraciones de fenoles (μgL^{-1}) en 22 de muestras de las aguas de rocío en el centro de Santiago de Chile, desde 10/05/2010 al 14/10/2010.

Compuesto	Promedio	Máximo	Mínimo	F*	Promedio**	Depositado***
Phenol	48	281	nd	0.88	56	0,6
2-NP	25	237	nd	0.31	74	0.32
3-NP	8	147	nd	0.19	42	0.10
4-NP	71	629	nd	0.59	123	0.91
2,3-DNP	85	2430	nd	0.22	400	1.1
2,6 + 2,4-DNP	54	1050	nd	0.28	199	0.67
2,5-DNP	16	219	nd	0.25	67	0.20
Volume (mL)	98	213	20			
pH	7,29	7,71	6,79			

F *: Fracción de las muestras con concentraciones por encima del límite de detección

Promedio **: la concentración promedio en las muestras con concentraciones medibles.

Depósito***: cantidad total de emisiones de ese contaminante al año depositados (mgm^{-2})

4.3. Estudio de Estabilidad

La Figura 21 muestra la cinética de descomposición de estándares de: fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol y 2,6-dinitrofenol a 25 °C. Se observa que hasta los 240 minutos no hubo descomposición.

En general, a los tiempos de retención estudiados, los resultados parciales mostraron alta estabilidad.

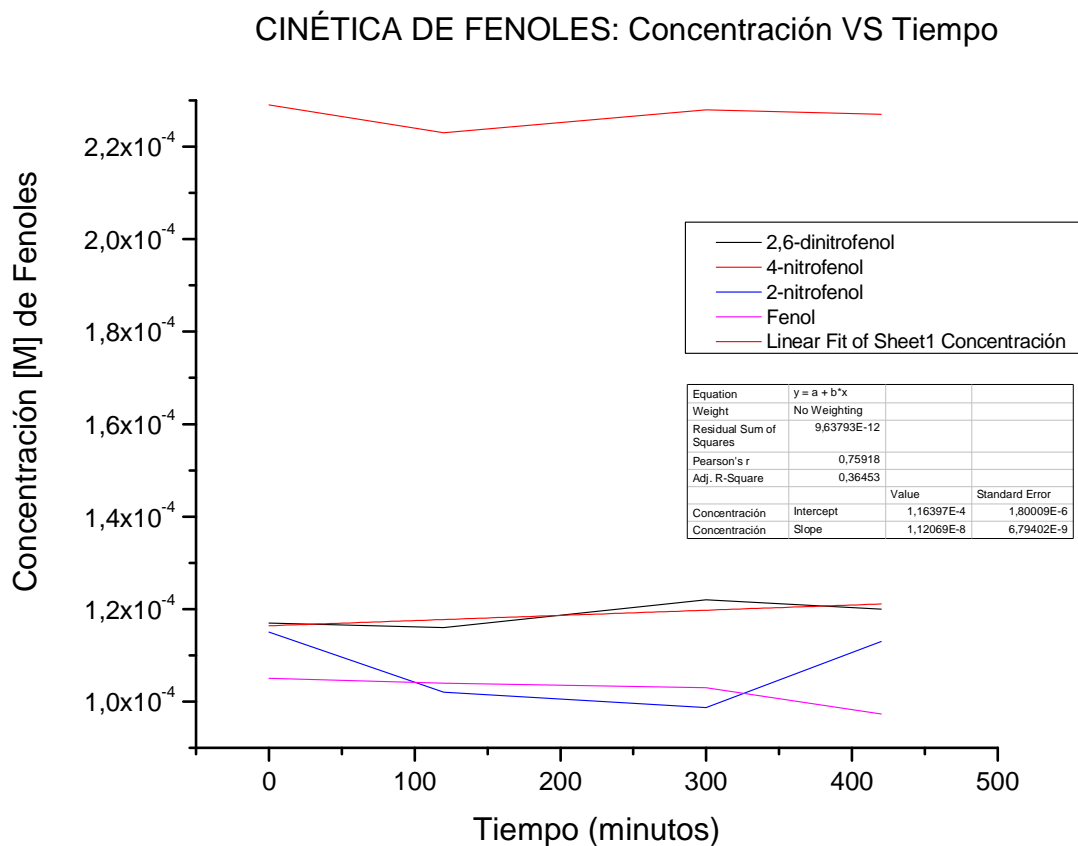


Figura 21: Concentración molar en función del tiempo.

4.3.1. Efecto del peróxido de hidrógeno a pH 3

La Figura 22 muestra la variación del área cromatográfica de estándares de fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol y 2,6-dinitrofenol a 25°C. Se observa una pequeña variación en el área. Los resultados muestran estabilidad a este pH.

Fenol			2-nitrofenol		
Tiempo, min	Absorbancia, nm	área (%)	Tiempo, min	Absorbancia, nm	área (%)
0	272	20,00	0	276	6,21
60	272	20,63	60	275,6	6,13
90	272	19,80	90	274,4	6,04
120	272	19,99	120	275,6	6,28
180	272	19,62	180	276,7	5,96
285	272	19,09	285	275,6	6,17
435	272	18,88	435	275,6	6,07

4-nitrofenol			2,6-dinitrofenol		
Tiempo, min	Absorbancia, nm	área (%)	Tiempo, min	Absorbancia, nm	área (%)
0	318	70,71	0	301,6	1,01
60	317	70,23	60	300,4	1,47
90	315,9	70,74	90	298,1	1,89
120	318,3	69,99	120	301,6	2,23
180	317,1	69,84	180	300,4	3,07
285	315,9	69,17	285	299,3	3,99
435	318,3	68,78	435	300,4	4,80

Figura 22: Área versus temperatura, de los compuestos fenólicos.

4.3.2. Efecto del pH y el peróxido de hidrógeno

Datos obtenidos para la muestra de rocío envejecido más la mezcla de fenoles y peróxido de hidrógeno 10 µM a pH 3,0.

Los espectros presentan las siguientes variaciones en cada uno de los compuestos analizados:

- **FENOL** desde t=0 hasta t=6 presenta un peak a los 272 nm y sus áreas en porcentaje disminuyen desde 20% (t=0min) hasta 18,88% (t=435min). Peak estándar: 272 nm.
- Fenol

Fenol	
Tiempo, min	Concentración, M
0	2,02E-04
15	2,05E-04
30	2,21E-04
45	2,16E-04
60	2,15E-04

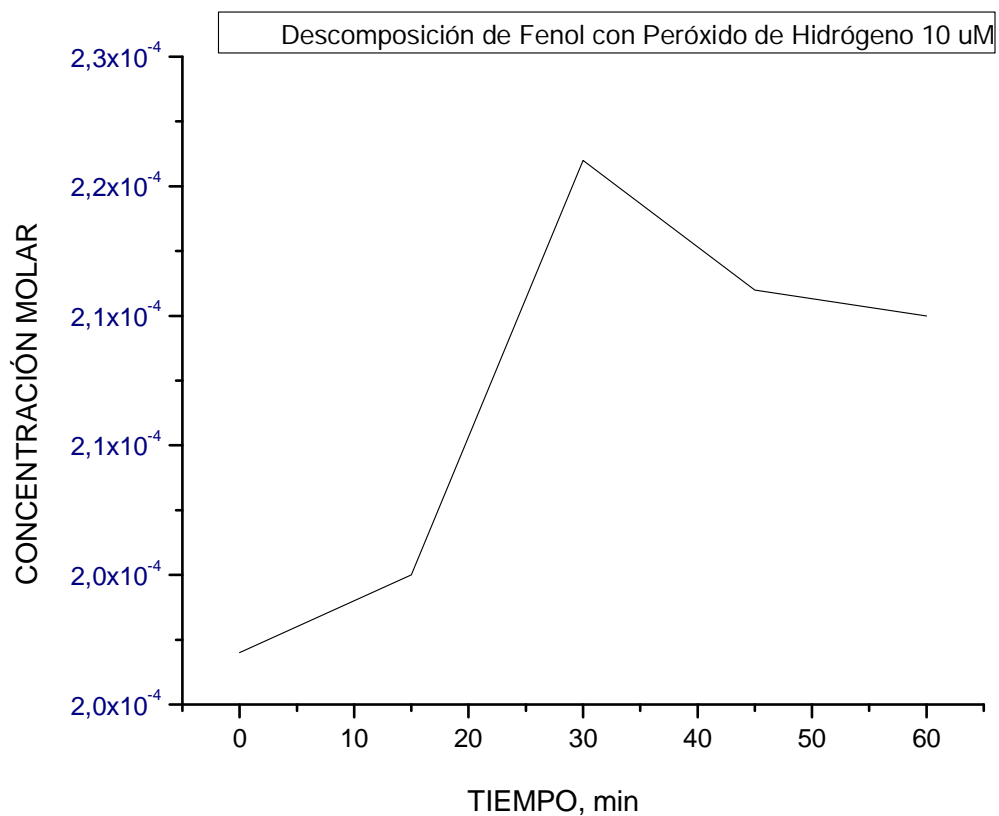


Figura 23: Descomposición del fenol con H₂O₂ a 10 µM

- **2-NP** presenta una fluctuación en sus peaks desde 274,4 hasta 276,7nm y sus áreas en porcentaje disminuyen desde 6,21% (t=0min) hasta 6,07% (t=435 min).
Peak estándar: 276,7 nm.

2-Nitrofenol

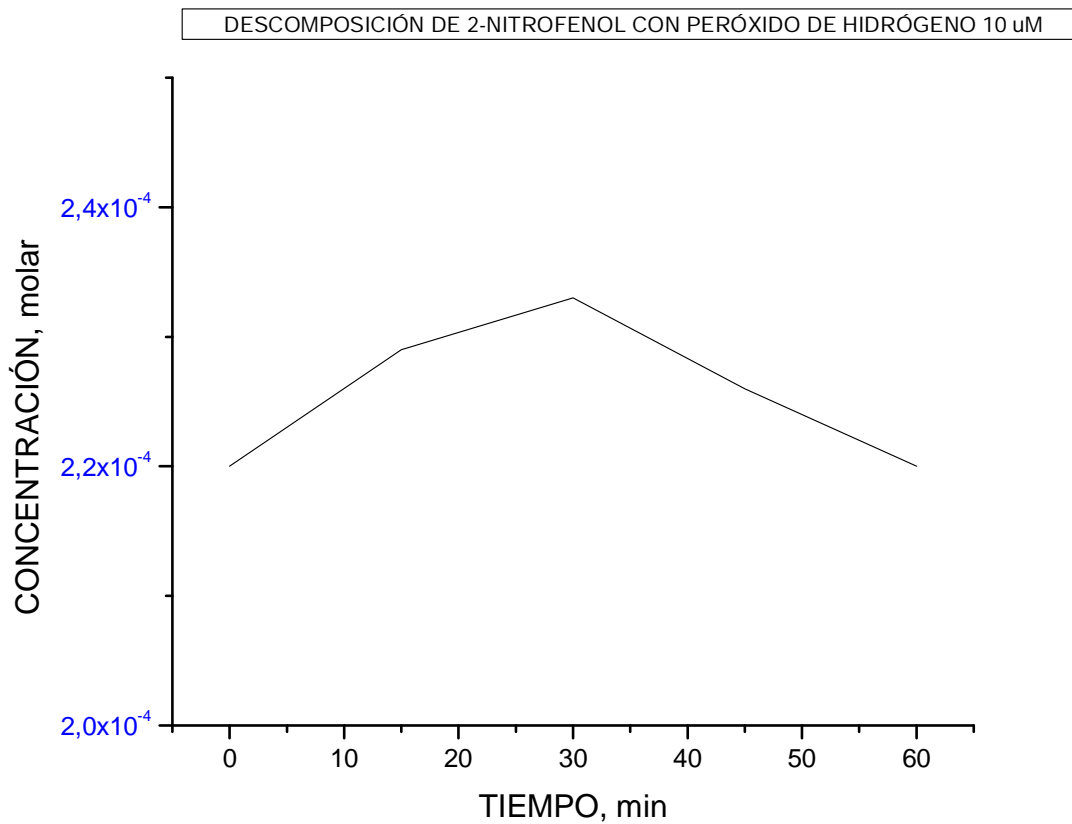


Figura 24: Descomposición del 2-nitrofenol con H_2O_2 a 10 μ M

- **4-NP** presenta una fluctuación en sus peaks desde 315,9 hasta 318,3 nm y sus áreas en porcentaje disminuyen desde 70,71% (t=0 min) hasta 68,78% (t=435 min).
Peak estándar: 318,3 nm.

4-nitrofenol

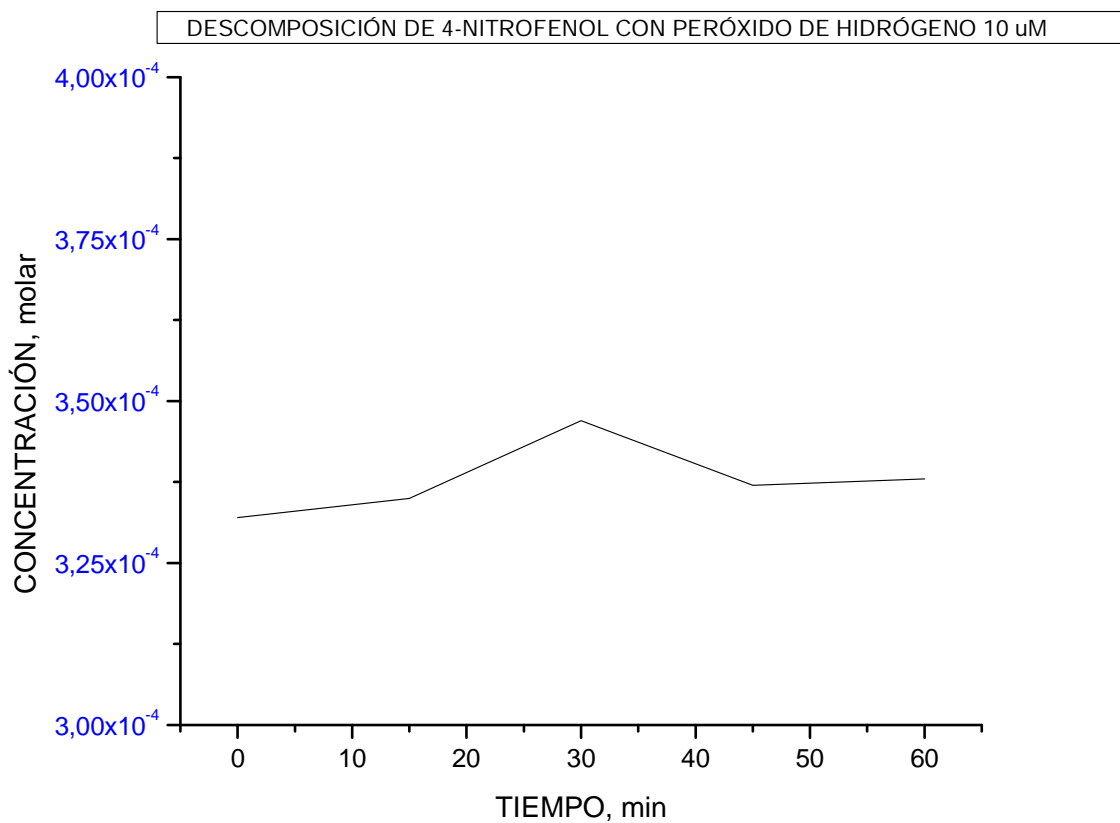


Figura 25: Descomposición del 4-nitrofenol con H₂O₂ a 10 μM

- **2,6-DNP** presenta una fluctuación en sus peaks desde 298,1 hasta 301,6nm y sus áreas en porcentaje aumentan desde 1,01% en (t=0min) hasta 4,8% (t=435 min).
Peak estándar: 436,6 nm.

2,6-dinitrofenol

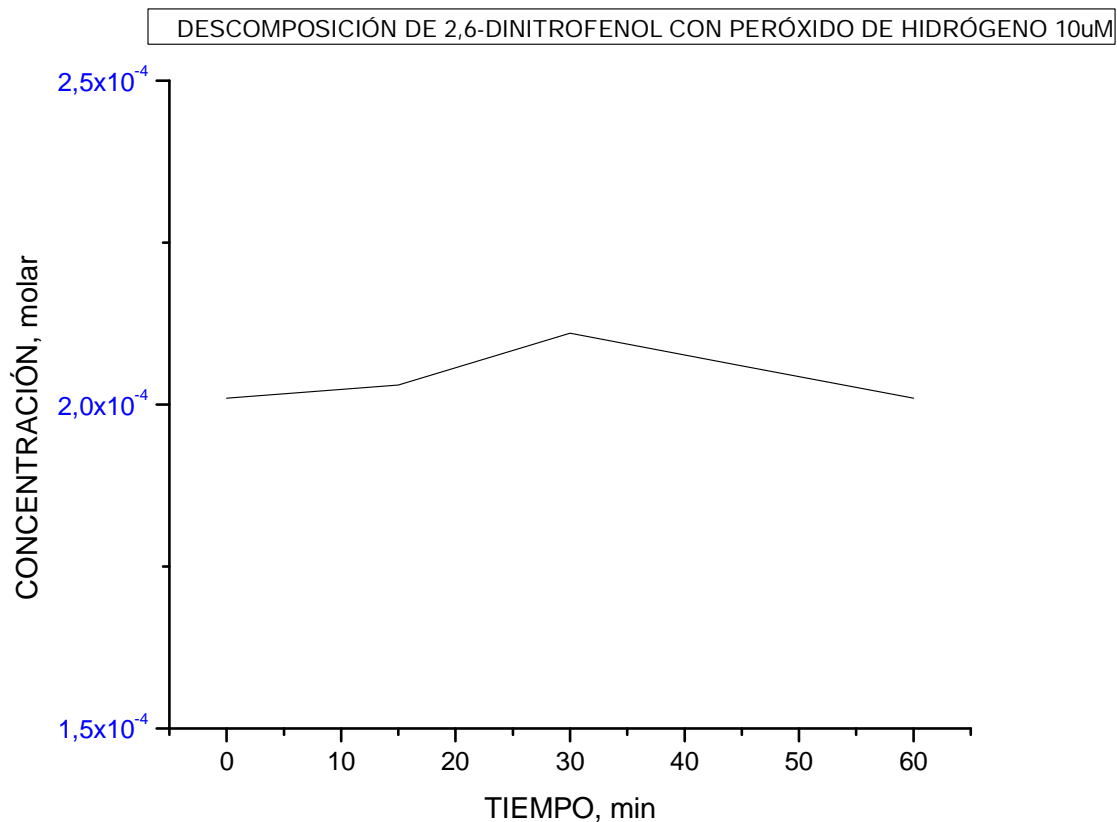


Figura 26: Descomposición del 2,6-dinitrofenol con H₂O₂ a 10 μM

4.4. Resultados de Bioensayos

Para verificar la validez de los resultados, se realizó una carta control, mediante 10 bioensayos, obteniéndose un valor promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación, especificados en la Tabla 7 y la Figura 27, que se muestran a continuación.

Tabla 7: Datos estadísticos de la carta control.

Valor promedio de 10 cartas control	0,66 mg/L
Coeficiente de variación, C.V (%)	8,67
Desviación estándar, s	0,06

Nota: el valor del CV debe ser $\leq 30\%$.

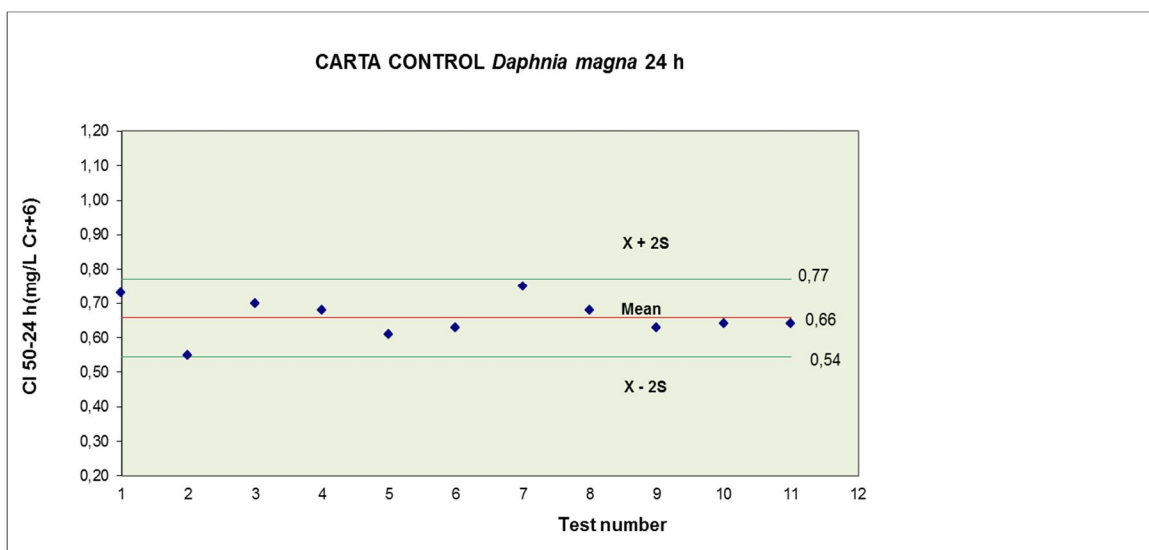


Figura 27: Carta control de *Daphnia magna* a las 24 horas.

La toxicidad de los compuestos fenólicos puros, obtenidos como CI_{50-48h} en mgL^{-1} y sus correspondientes unidades tóxicas ($UT=1/CI_{50-48h} \times 100$), se presentan en las Figuras 28 y 29, respectivamente.

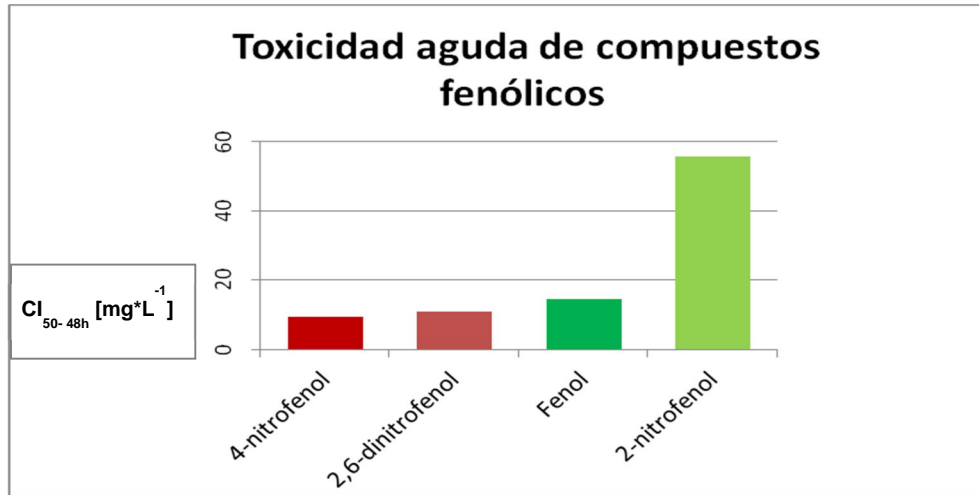


Figura 28: Cl_{50-48h} de compuestos fenólicos

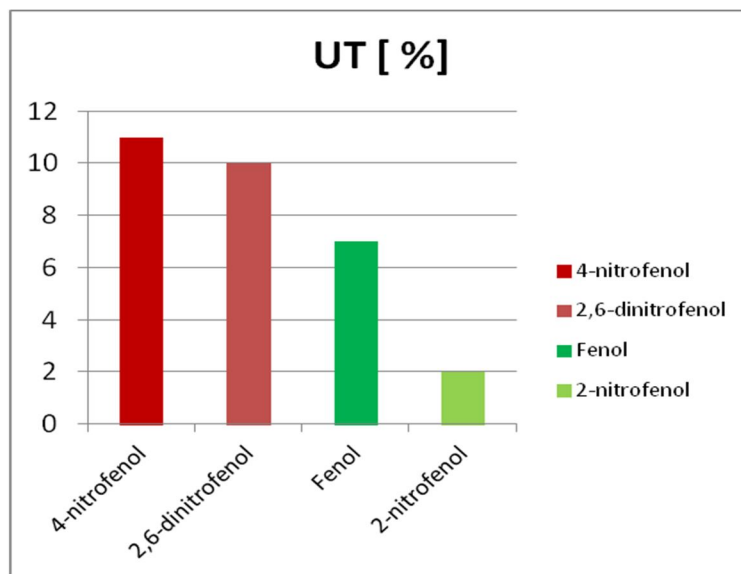


Figura 29: Unidades Tóxicas de los compuestos fenólicos

Las figuras anteriores muestran los niveles de toxicidad de los nitrofenoles estudiados, en los que se ha determinado su Cl_{50-48h} . Se observa un menor valor para el 4-nitrofenol (más tóxico) y un valor más alto para el 2-nitrofenol (menos tóxico). De igual forma se representaron las unidades tóxicas de cada compuesto, las que corresponden al

inverso de la Cl_{50-48h} donde se aprecia que el 4-nitrofenol es el de mayores unidades tóxicas.

La Tabla 8 muestra la comparación entre la toxicidad de los fenoles y su concentración.

Tabla 8: Cl_{50-48h} y concentración química de fenoles en muestras de rocío, en mgL^{-1} .

Compuesto	Concentración Cl_{50-48h}, [mgL^{-1}]	Concentración química en rocío, [mgL^{-1}]
Fenol	14	0,072
2-nitrofenol	56	0,014
4-nitrofenol	9	0,03
2,6-dinitrofenol	11	0,179

En estos resultados se aprecia que los niveles de estos cuatro compuestos fenólicos están muy por debajo de los niveles tóxicos determinados en donde además se debe considerar el tipo de compuesto y su procedencia.

5. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Desde el punto de vista de la composición química del rocío, los contaminantes más importantes presentes en la atmósfera de una zona céntrica de Santiago (Específicamente Estación Central) son: dióxido de azufre (IV) SO_2 , Óxidos de nitrógeno NO_x , ácido nítrico HNO_3 , ácido nitroso HNO_2 , amoníaco NH_3 , y peróxido de hidrógeno H_2O_2 junto al material particulado (PM_{10} y $\text{PM}_{2,5}$) que contiene sulfatos (SO_4^{2-}), nitratos (NO_3^-), amonio (NH_4^+) y calcio (Ca) los que corresponden a resultados de este trabajo. Mientras los niveles de cationes reflejan la composición del particulado y su eficiencia de captura, los niveles de aniones estarían influenciados por la formación y disociación durante la deposición de la fase líquida.

En general para explicar la composición química de los rocíos debemos considerar que las principales características son:

- Ocurre en la noche y durante la madrugada, con un mínimo de radiación solar y por lo tanto la fotoquímica debe ser despreciable.
- Ocurre en condiciones estacionarias, que en la mayoría son días de invierno, donde un régimen de inversión térmica.
- La concentración observada está determinada por factores locales, tales como la captura de material particulado y gases absorbidos sobre la capa (ya depositado sobre el colector) líquida. Por lo tanto, la composición química reflejará:
 - i. Lo que está presente en las partículas.
 - ii. Lo que está presente en los gases cerca del suelo o que difunden desde las capas de aire directamente sobre la superficie terrestre.
 - iii. La manera en que los gases adsorbidos son transformados en la capa acuosa o interfaz sólido- líquido durante la recolección.

El hecho que la recolección se realice en la mañana temprano implicaría que la química de radicales sería nula. Podrían ocurrir reacciones con ozono, pero el ozono nocturno está bajo valores “de fondo” (Rubio y col, 2001). Podrían ocurrir reacciones radicalarias si hubiera peróxido de hidrogeno, que en presencia de trazas de metales generarían pequeñas cantidades de radicales hidroxilos o por ultimo reacciones con radicales NO_3 .

La química del rocío es compleja ya que estaría dominada por catálisis de metales traza en la interfaz partícula y superficie del colector. Lo que se observaría en el rocío es la resultante de lo que existiría en la atmósfera y todos los procesos nocturnos señalados. Esto implica que la formación de la fase acuosa sobre las superficies y la química que en ella ocurre modificaría las concentraciones de algunas sustancias contaminantes. La deposición del rocío removería significativamente a algunos contaminantes y tal vez concentre a algunos de ellos y los devuelva a la atmósfera, considerando que con la evaporación estamos proporcionando una fuente de contaminantes en la atmósfera.

Con relación al pH de los rocíos, los datos obtenidos durante 2010 varían desde 6,79 hasta 7,75. Estos datos y los obtenidos en años anteriores (Rubio y col, 2001;) señalan que existiría una alcalinización moderada con relación a la saturación con CO_2 . Similares resultados se han obtenido y reportado en otros rocíos urbanos (Takenaka y col, 2003).

Las aguas de rocío tienen pH sobre el valor que corresponde a las muestras saturadas con dióxido de carbono (pH = 5,6). Esto indicaría que el pH del rocío está condicionado por los agentes contaminadores primarios (amonio y probablemente calcio) y secundarios, tales como ácido nítrico y ácido sulfúrico. Lo más probable es que se incorporen todos estos compuestos como partículas atmosféricas por la sedimentación gravitacional (partículas gruesas) y/o la difusión de tipo convectiva promovida por la condensación del rocío (partículas más pequeñas) (Takeuchi y col, 1988; Takeuchi y col, 2003). A este respecto, es interesante observar cantidades de sulfato, de nitrato y de amonio hasta en 26% del PM_{10} recogido en la ciudad de Santiago (CONAMA, 2003). También, el PM_{10} abarca el 38% de las partículas naturales que deben ser ricas en sales y óxidos de calcio.

Los valores de concentración, expresadas como μEqL^{-1} , de los iones mayoritarios presentes en las aguas de rocío, en la Tabla 4, muestran, que el catión mayoritario es calcio y el anión mayoritario es nitrato. Se puede relacionar la alta concentración de iones Ca^{2+} , a la presencia de carbonatos (CO_3^{2-}) y silicatos (SiO_3^{2-}), presentes en el polvo natural (Rubio y col, 2001).

Los valores de conductividad reflejan el contenido iónico presente. Asimismo, se debe destacar la baja acidez, debida principalmente a la presencia de carbonato de calcio (CaCO_3) (Rubio y col, 2008), señalan que la acidez del rocío en la zona céntrica de Santiago (Comuna Estación Central) está determinada por contaminación primaria debido a calcio y amonio y contaminación secundaria por ácido nítrico y sulfúrico.

5.1. Identificación y Cuantificación de fenoles en agua de rocío

Durante el período muestreado (Agosto- Octubre 2010), se analizaron veintidós muestras de rocío, el porcentaje de la presencia (número de veces que está detectado en las veintidós muestras) de cada uno de los compuestos estudiados arrojó el siguiente resultado: fenol 95,4%; 4-nitrofenol 72,7%; 2-nitrofenol y 3-nitrofenol 68,2%; 2,6-dinitrofenol 40,9%; 2,5-dinitrofenol 31,8%; 2,3-dinitrofenol 22,7%.

Los nitrofenoles son compuestos polares hidrofílicos que se incorporan a las aguas de nubes, niebla, lluvia y superficie (Harrison y col, 2005) y que deben estar presente en el rocío. Los datos recogidos en la Tabla 5 apoyan esta hipótesis.

Los datos de la tabla permiten concluir que:

- Fenol y nitrofenoles están presentes en la mayoría de las muestras con concentraciones en el intervalo micromolar.
- El 4-nitrofenol es el nitrofenol presente, en la mayoría de las muestras y se encuentra en concentraciones más altas.
- El 3-nitrofenol está sólo esporádicamente presente en las muestras. Ocasionalmente, puede alcanzar concentraciones altas.
- Los diferentes dinitrofenoles están presente en un pequeño número de muestras. A veces, pueden llegar a altas concentraciones, mayores a $1,0^{-3}$ M.

Las concentraciones de nitrofenoles son más altas en el rocío que en otros aerosoles (Harrison y col, 2005).

De los resultados presentados en la Tabla 8, se observa que las concentraciones de fenol y 2,6-dinitrofenol son las mayores. El fenol está presente en 95% de las muestras y el 2,6-dinitrofenol en 41%. Además existe una mayor concentración del 4-nitrofenol que el 2-nitrofenol. Las concentraciones de los fenoles y nitrofenoles en el agua de rocío podrían ser resultado de una mayor solubilización de estos compuestos desde la fase gas a la fase acuosa depositada. A modo de ilustración la Tabla 9 se presentan las concentraciones de fenol y nitrofenoles en aire, medidos en Estación Central durante el año 2011 (comunicación personal Dra. Rubio).

Tabla 9: Niveles de fenol, 2-nitrofenol y 4-nitrofenol en muestras de aire.

Muestra	Compuesto	Concentración [$\mu\text{g}/\text{m}^3$]
1	Fenol	0,102
	2-NF	0,034
	4-NF	0,042
2	Fenol	0,058
	2-NF	0,013
	4-NF	0,040

El hecho de que el 4-nitrofenol esté más concentrado que el 2-nitrofenol en la fase acuosa, podría deberse a su mayor solubilidad desde la fase gas, de acuerdo a la constante de Henry (ver constantes en Anexo) (Harrison y col, 2005), ó a una desorción desde el material particulado depositado conjuntamente con el agua de rocío. También no se descarta, la ocurrencia de reacciones de formación, como por ejemplo la reacción de fenol y ácido nitroso en fase acuosa.

Los valores de concentración promedio de los compuestos, fenol y nitrofenoles son más altos que los obtenidos en aguas de lluvias de otras ciudades como: Milán, Portland y en Suiza (Leuenberger y col, 1988). La Tabla 10 muestra valores de fenol, 2-nitrofenol y 4-nitrofenol, determinados en agua de lluvia y niebla de ciudades europeas. No hay reportes en aguas de rocío para este tipo de compuestos (Harrison y col, 2005). Sin embargo, la presencia de contaminantes en agua de rocío depende de la atmósfera local y esto hace difícil una comparación con otras ciudades del mundo.

Tabla 10: Concentraciones en μgL^{-1} de nitrofenoles en niebla y agua de lluvia de algunas ciudades de Europa.

Compuesto	Niebla	LLuvia
Fenol	91,8	7,7
2-nitrofenol	No detectado	1,4
4-nitrofenol	40,2	16

No se observan tendencias claras en los datos recogidos de la Tabla 10. Esto puede ser debido al número de factores que determinan la concentración medida en la muestra: concentración en fase gaseosa, el coeficiente de Henry, parámetro de alojamiento, la presencia de los contaminantes, tanto en fase gaseosa como en el material particulado, la formación en el rocío (Heal y col, 2007; Vione y col, 2004; Patnaik y Khoury, 2004), y el consumo durante la exposición en la toma de muestras (Vione y col, 2009).

En particular, la reacción con HONO puede tener lugar durante la recogida de rocío debido a la presencia conjunta de ambos compuestos. De hecho, se midió una concentración media de 0,15 mM HONO en las muestras de rocío recogidas. Estos procesos pueden dar nitrosaminas y otros compuestos de mayor toxicidad que los nitrofenoles (Heal y col, 2007; Vione y col, 2004).

Una característica peculiar de los datos recogidos en la Tabla 6 es la presencia de 3-nitrofenol y varios dinitrofenoles en el rocío. En particular, una concentración importante de dinitrofenoles en rocío podría estar asociado a sus bajos valores de pKa (Tehanet y col, 2002), un factor que aparentemente aumentaría su valor de la constante de Henry. El 3-nitrofenol podría ser emitido por las fuentes móviles. El muestreo en un lugar de gran tráfico ejemplo: en túneles, podría servir para probar esta posibilidad.

Rubio y col., (2001) han estimado 12,7 litros de agua depositada por los eventos de rocío por año y por metro cuadrado en el centro de Santiago. Monto total estimado de los principales fenoles depositados anualmente por metro cuadrado serían os mostrados en la Tabla 6.

Como se mencionó anteriormente, el fuerte descenso observado en la fase gaseosa para el fenol, 2-nitrofenol y 4-nitrofenol en el período de 4,00 a 8,00 horas podría ser debido, al menos parcialmente, a su incorporación al rocío que se está formando (Rubio y col, 2003). De hecho, si se considera un volumen alrededor de rocío medio (100 ml/m²) y la concentración promedio de fenol en rocío, la cantidad de contaminante incorporado a la fase líquida corresponde a la de una columna de aire que va desde los primeros 20 metros solo contiene fenol y de 20 a 150 metros solo contiene 4-nitrofenol.

Estas son longitudes plausibles para una atmósfera nocturna de alta estabilidad, tal como la predominante en la ciudad de Santiago.

5.2. Estabilidad de compuestos fenólicos en aguas de rocíos.

Los resultados obtenidos mostraron que los fenoles en solución acuosa son estables frente a cambios de temperatura, presencia de H_2O_2 y presencia de H_2O_2 a pH ácido. Estos resultados permiten establecer que los valores de concentraciones medidos son los reales y no ha habido pérdidas por reacciones químicas. Las referencias bibliográficas relacionadas con reacciones químicas de fenol y nitrofenoles en fase acuosa son escasos (Vione y col, 2005). Se postula la formación de 2 y 4 nitrofenol por reacción de fenol con nitrito en medio ácido. Esta reacción es mediada por el agente nitrante NO_2 .

Que los fenoles estudiados presenten estabilidad en las condiciones de temperatura y pH y frente a H_2O_2 , se corresponde con estudios realizados en el laboratorio de cinética y fotoquímica de la USACH (Comunicación personal Dra. Rubio). Se ha determinado que el fenol solo reacciona con nitrito a pH 2,3, y que la reacción con H_2O_2 a pH neutro es muy lenta.

Las reacciones fotoquímicas se descartan debido a que a la hora en que se forma el rocío (7 AM) la radiación solar se encuentra en un flujo muy débil. Asimismo los niveles de ozono nocturno son cercanos a cero.

5.3. Toxicidad de nitrofenoles

La toxicidad de los compuestos fenólicos en tejidos celulares ha sido estudiada por varios autores (Rippen 1989; Merck 2010; Goi 2001). Los fenoles reaccionan con oxidándose que los conducen a hidroquinonas y catecoles, y finalmente a quinonas (Shadnia y col, 2008).

En la Tabla 8 se muestra en forma comparada las concentraciones de algunos nitrofenoles en muestras de rocío y la toxicidad de los compuestos puros, expresada como CI_{50-48h} . Se puede observar en ella, que los niveles promedio de fenoles en rocío son 60 a 400 veces menores que los niveles necesarios para igualar las concentraciones tóxicas en cada uno de estos compuestos mediante bioensayo con *Daphnia magna*. Pero se debe considerar que el rocío es una mezcla de derivados fenólicos, que en conjunto podría aumentar su toxicidad en aquellos seres vivos con los cuales tengan acción.

La toxicidad aguda de los compuestos fenólicos estudiados a las 48 horas (CI_{50-48h}), sobre *Daphnia magna* se muestra en la Tabla 11. Esta tabla muestra datos publicados entre 1989 a 2010. En ellas se observa el mismo resultado encontrado en el presente estudio de acción individual.

Tabla 11: Toxicidad frente a *D. magna* de compuestos fenólicos según literatura.

Compuesto	$CI_{50-48 h}$ (mgL-1)	Referencia
Fenol	12,0	Rippen , 1989
2-Nitrofenol	17,0	Merck, 2010
4-Nitrofenol	9,8	Merck, 2010
2,4-dinitrofenol	4,1	Goi, 2001

Recientemente se ha publicado (Zhao y col, 2010) un estudio realizado a 250 fenoles, y 252 compuestos alifáticos, demostrando que existe relación entre el grado de ionización y de hidrofobicidad con la toxicidad. Esta toxicidad se relacionaría con la estructura química del compuesto y con sus propiedades físico-químicas. Un análisis QSAR (relación cuantitativa entre estructura y actividad), utiliza descriptores moleculares

tales como, hidrofobicidad, polaridad y ionización, llegando a la conclusión que, la ionización de los compuestos, no sólo afecta las interacciones con macromoléculas, sino también con los sitios activos de éstas (péptidos, proteínas y ácidos nucleicos) contribuyendo con un aumento de la toxicidad de estos compuestos (Zhao y col, 2010).

La hidrofobicidad expresada como la partición entre 1-octanol y agua (P), de un xenobiótico es fundamental para predecir la toxicidad en el medioambiente de este químico. Modelos para predecir la toxicidad de fenoles y anilinas son comúnmente asociados al LogP pero, términos tales como pKa y orbitales de menor energía también son utilizados, ya que éstos, pueden representar el grado de electrofilia o ionización de los compuestos (Cronin y col, 2000). La ionización de un compuesto puede tener un rol importante en el grado de la toxicidad. Estudios recientes han demostrado que la fracción ionizada de las moléculas podría ser también una contribución para la toxicidad. Como por ejemplo, en una serie de derivados del ácido benzoico, las formas ionizadas y las no ionizadas mostraron contribuciones diferentes para el ensayo de toxicidad resultante en *Daphnia magna* (Zhao y col, 1988).

La toxicidad de los fenoles (bioensayo en *D. magna*) aumenta con el aumento del carácter hidrofóbico del compuesto, mientras que la toxicidad de los mismos, disminuye al disminuir el pH (Cronin y col, 2000), los datos se presentan en la Tabla 12.

Tabla 12: Toxicidad de nitrofenoles en *Daphnia magna* a pH 6.0, 7.8, y 9.0, respecto al logP, y pKa.

Compuesto	log	log	log	log P	pK _a
	(1/Cl ₅₀) a pH 6.0	(1/Cl ₅₀) a pH 7.8	(1/Cl ₅₀) a pH 9.0		
2-nitrofenol	3,76	3,64	3,51	1,79	6,80
3-nitrofenol	3,75	3,71	3,53	2,00	8,27
2,4-dinitrofenol	5,18	4,68	4,49	1,67	4,03

Los compuestos químicos polares son un poco menos tóxicos que los no-polares, estos compuestos (polares) pueden ser identificados por su acidez y por formar enlaces de hidrógeno (Zhao y col, 2010).

Con los antecedentes presentados se podría inferir que la toxicidad de compuestos fenólicos, estaría relacionada y a la vez depende del carácter hidrofóbico del compuesto, su polaridad y el grado de ionización que tenga a un determinado valor de pH.

6. CONCLUSIONES

- En muestras ambientales de agua de rocío recolectadas en la comuna de Estación Central de Santiago, se encuentra la presencia de compuestos fenólicos.
- Los compuestos fenólicos encontrados son: fenol ($0,072 \text{ mgL}^{-1}$), 2-nitrofenol ($0,014 \text{ mgL}^{-1}$), 3-nitrofenol ($0,004 \text{ mgL}^{-1}$), 4-nitrofenol ($0,030 \text{ mgL}^{-1}$), 2,3-dinitrofenol ($0,042 \text{ mgL}^{-1}$), 2,5- dinitrofenol ($0,043 \text{ mgL}^{-1}$) y 2,6-dinitrofenol ($0,179 \text{ mgL}^{-1}$).
- Las muestras de rocío, tanto la muestra compuesta (2010) como la muestra de rocío fresca (2011) no presentaron toxicidad aguda, frente a bioensayo con *D. magna* según la norma chilena oficial 2083.
- El estudio de bioensayos realizado con la mezcla de fenoles, dio como resultado ser tóxico en concentraciones mayores a las encontradas en el rocío estudiado, con un incremento de un 50% de su toxicidad respecto de cada uno de los componentes puros.

PROYECCIÓN DE ESTE TRABAJO

El presente trabajo se ha realizado considerando sólo la Toxicidad Aguda de los Compuestos Fenólicos (fenol, 2-nitrofenol, 4-nitrofenol, y 2,6-dinitrofenol), sobre el organismo *D. magna*. Sin embargo, con el objetivo de completar aún más esta línea de investigación, es que la recomendación inmediata es poder estudiar, la exposición a pequeñas dosis de estos compuestos y constante en el tiempo, es decir, realizar un estudio de la Toxicidad Crónica, sobre el organismo más adecuado de manera de extrapolar los resultados a humanos.

7. BIBLIOGRAFÍA

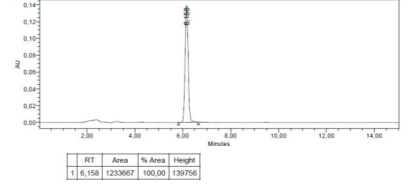
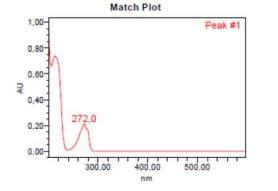
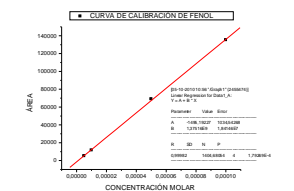
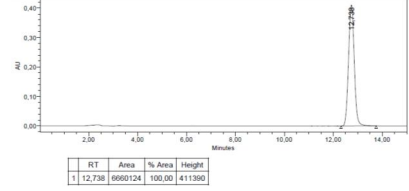
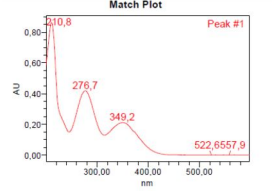
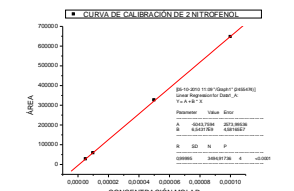
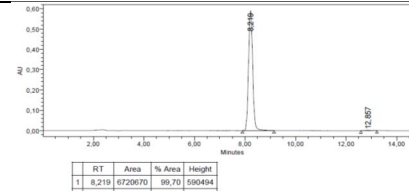
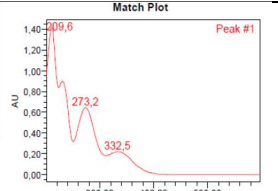
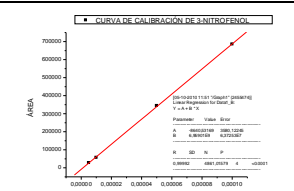
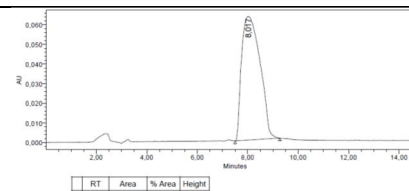
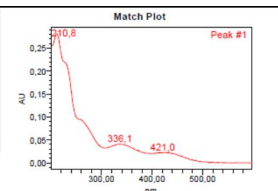
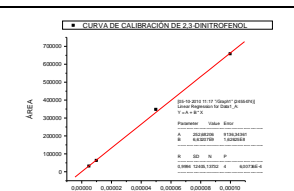
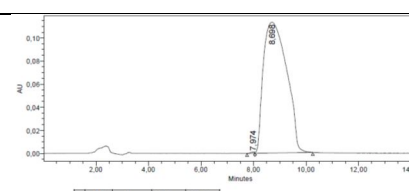
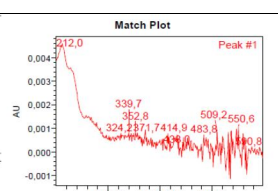
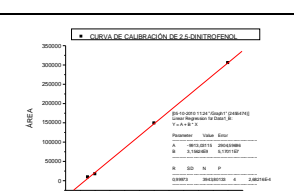
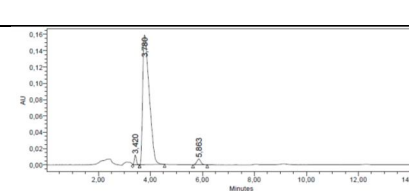
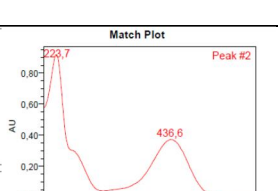
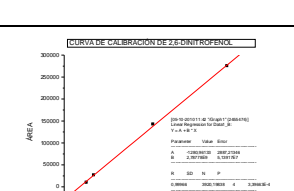
1. ACKER KARIN, BEYSENS DANIEL, MÖLLER DETLEV., "NITRITE IN DEW, FOG, CLOUD AND RAIN WATER: AN INDICATOR FOR HETEROGENEOUS PROCESSES ON SURFACES", *ATMOSPHERIC RESEARCH*, VOLUME 87, PAG. 200 – 212, 2008.
2. AGAM N., BERLINER P.R., "DEW FORMATION AND WATER VAPOR ADSORPTION IN SEMI-ARID ENVIRONMENTS—A REVIEW", *JOURNAL OF ARID ENVIRONMENTS*, VOLUME 65, 572 – 590, 2006.
3. AGENCIA PARA SUSTANCIAS TÓXICAS Y EL REGISTRO DE ENFERMEDADES, ATSDR, RESUMEN DE SALUD PÚBLICA FENOL CAS#: 108-95-2, DEPARTAMENTO DE SALUD Y SERVICIOS HUMANOS DE LOS ESTADOS UNIDOS, SEPTIEMBRE 2008.
4. BEYSENS D., SHARAN G., MILIMOUK – MELNYTCHOUK I., "A STUDY OF DEW WATER YIELDS ON GALVANIZED IRON ROOFS IN KOTHARA (NORTH- WEST INDIA)", *JOURNAL OF ARID ENVIRONMENT*, VOLUME 69, 259 – 269, 2006.
5. BEYSENS DANIEL., "THE FORMATION OF DEW" *ATMOSPHERIC RESEARCH*, VOLUME 39, ISSUES 1 -3, PAG. 215- 237, OCTOBER 1995.
6. CASTILLO, GABRIELA (EDITORIA), " ENSAYOS TOXICOLÓGICOS Y MÉTODOS DE EVALUACIÓN DE CALIDAD DE AGUAS" PAG. 52-65, EDITORIAL MÉXICO IMTA, 2004, CANADÁ IDRC, 2004.
7. CHAPPLE, C. (1998) MOLECULAR-GENETIC ANALYSIS OF PLANT CYTOCHROME P-450-DEPENDENT MONOOXYGENASES. *ANN REV PLANT PHYSIOL PLANT MOL BIOL* 49, 311-343.
8. CRONIN, M. T. D, ZHAO, R. L. YU, "PH- DEPENDENCE AND QSAR ANALYSIS OF THE TOXICITY OF PHENOLS AND ANILINES TO DAPHNIA MAGNA", *ENVIRONMENT TOXICOLOGY*, VOLUME 15, 140 – 148, 2000.
9. FERNANDEZ P, GRIFOLL M, SOLANAS A M, BAYONA J M, ALBAIGES J, "BIOASSAY – DIRECTED CHEMICAL ANALYSIS OF GENOTOXIC COMPONENTS IN COASTAL SEDIMENTS ". *ENVIRONMENTAL SCIENCE AND TECHNOLOGY* 26, 817 – 829 1992.
10. GOBIERNO DE CHILE, MINISTERIO DEL MEDIOAMBIENTE, SISTEMA DE INFORMACIÓN NACIONAL DE CALIDAD DEL AIRE, SINCA 2009.

11. GUILHERMINO L, DIAMANTINO T, SILVA M, Y SOARES A.M., "ACUTE TOXICITY TEST WITH DAPHNIA MAGNA: AN ALTERNATIVE TO MAMMALS IN THE PRESCREENING OF CHEMICAL TOXICITY?" ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY 46, 357 – 362, 2000.
12. HARRISON, M.A.J., BARRA, S., BORGHESI, D., VIONE, D., ARSENE, C., OLARIU, R.J. NITRATED PHENOLS IN THE ATMOSPHERE: A REVIEW. ATMOSPHERIC ENVIRONMENT 39, 231 - 248, 2005.
13. HEAL, M.R., HARRISON, M.A.J., CAPE, J.N., 2007. AQUEOUS-PHASE NITRATION OF PHENOL BY N₂O₅ AND CLN O₂. ATMOS. ENVIRON. 41, 3515–3520.
14. INSTITUTO NACIONAL DE NORMALIZACIÓN (INN), NORMA CHILENA OFICIAL, NCh 2083.Of 1999, "AGUAS – BIOENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE LA MOVILIDAD DE DAPHNIA MAGNA O DAPHNIA PULEX (CRUSTÁCEA, CLADÓCERA).
15. LEUENBERGER C, CZUCZWA J, TREMP J, GIGER W, "NITRATED PHENOLS IN RAIN: ATMOSPHERIC OCCURRENCE OF PHYTOTOXIC POLLUTANTS" CHEMOSPHERE, 17, 511-515, 1988.
16. MORALES RAÚL (EDITOR). CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA URBANA. EPISODIOS CRÍTICOS DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL EN LA CIUDAD DE SANTIAGO. EDITORIAL UNIVERSITARIA, 2006.
17. PATNAIK, P., KHOURY, J.N., 2004. REACTION OF PHENOL WITH NITRITE ION: PATHWAYS OF FORMATION OF NITROPHENOLS IN ENVIRONMENTAL WATERS. WATER RES. 18, 206–210
18. RUBIO M, LISSI E, VILLENA G, "NITRITE IN RAIN AND DEW IN SANTIAGO CITY, CHILE. ITS POSSIBLE IMPACT ON THE EARLY MORNING START OF THE PHOTOCHEMICAL SMOG": ATMOSPHERIC ENVIRONMENT 36, 293 – 297, 2001.
19. RUBIO M, LISSI E, VILLENA G, ELSHORBANY Y.F, KLEFFMANN J, KURTENBACH R, WIESEN P, "SIMULTANEOUS MEASUREMENTS OF FORMALDEHYDE AND NITROUS ACID IN DEWS AND GAS PHASE IN THE ATMOSPHERE OF SANTIAGO, CHILE" ATMOSPHERIC ENVIRONMENT 43, 6106 – 6109, 2008.
20. SHADNIA H, Y WRIGHT J, "UNDERSTANDING THE TOXICITY OF PHENOLS: USING QUANTITATIVE STRUCTURE- ACTIVITY RELATIONSHIP AND ENTHALPY CHANGES TO DISCRIMINATE BETWEEN POSSIBLE MECHANISMS", CHEMOSPHERE RES. TOXICOLOGY, 21, 1197 – 1204, 2008.
21. TAKENAKA NORIMICHI, HIROYUKI SODA, KEIICHI SATO, HIDETOSHI TERADA, TAKAHIKO SUZUE, HIROSHI BANDOW, Y YASUAKI MAEDA, "DIFERENCE IN AMOUNTS AND COMPOSITION OF DEW FROM

- DIFFERENT TYPES OF DEW COLLECTORS", WATER, AIR, AND SOIL POLLUTION, VOLUME 147, PAG. 51 – 60, 2003.
22. TAKEUCHI, M., OKOCHI, H., IGAWA, M., CONTROLLING FACTORS OF WEAK ACID AND BASE CONCENTRATIONS IN URBAN DEW WATER –COMPARISON OF DEW CHEMISTRY WITH RAIN AND FOG CHEMISTRY. THE CHEMICAL SOCIETY OF JAPAN, 75, 757 – 764, 2002.
 23. TAKEUCHI, M., OKOCHI, H., IGAWA, M., DEPOSITION OF COARSE SOIL PARTICLES AND AMBIENT GASEOUS COMPONENTS DOMINATING DEW WATER CHEMISTRY. JOURNAL OF GEOPHYSICAL RESEARCH 108, 4319. 2003.
 24. TEHAN, B.G., LLOYD, E.J., WONG, M.G., PITT, W.R., MONTANA, J.G., MANALLACK, D.T., GANCIA, W., 2002. ESTIMATION OF pKA USING SEMIEMPIRICAL MOLECULAR ORBITAL METHODS. PART 1: APPLICATION TO PHENOLS AND CARBOXYLIC ACIDS. QUANT. STRUCT.-ACT RELIAB. 21, 457–472.
 25. VALLE V, PEDRO, LUCAS F, BERNARDO, "TOXICOLOGÍA DE ALIMENTOS" INSTITUTO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA, CENTRO NACIONAL DE SALUD AMBIENTAL, MÉXICO D.F. 2000.
 26. VIONE, D., BELMONDO, S., CARNINO, L., 2004. A KINETIC STUDY OF PHENOL NITRATION AND NITROSATION WITH NITROUS ACID IN THE DARK. ENVIRON. CHEM. LETT. 2, 135–139.
 27. VIONE, D., MAURINO, V., MINERO, C., DUNCIANU, M., OLARIU, R.I., ARSENE, C., SARAHA, M., MAILHOT, G., 2009. ASSESSING THE TRANSFORMATION KINETICS, OF 2- AND 4-NITROPHENOL IN THE ATMOSPHERIC AQUEOUS PHASE. IMPLICATIONS FOR THE DISTRIBUTION OF BOTH NITROISOMERS IN THE ATMOSPHERE. ATMOS. ENVIRON. 43, 2321–2327.
 28. VIONE, D., MAURINO, V., MINERO, C., PELIZZETTI, E., 2002A. PHENOL PHOTONITRATION. ANN. CHIM.-ROME 92, 919–929.
 29. VIONE, D., MAURINO, V., MINERO, C., PELIZZETTI, E., 2002B. NEW PROCESSES IN THE ENVIRONMENTAL CHEMISTRY OF NITRITE: NITRATION OF PHENOL UPON NITRITE PHOTOINDUCED OXIDATION. ENVIRONMENTAL SCI TECHNOL. 36, 669-676.
 30. ZHAO Y, ZHANG X, WEN Y, FENG S, ZHAN G, WEI Q, HONG Q, JIAN X, LIAN S, ABRAHAM M, " TOXICITY OF ORGANIC CHEMICALS TO TETRAHYMENAPYRIFORMIS: EFFECT OF POLARITY AND IONIZATION ON TOXICITY", CHEMOSPHERE 79, 72 – 77, 2010.

8. ANEXOS

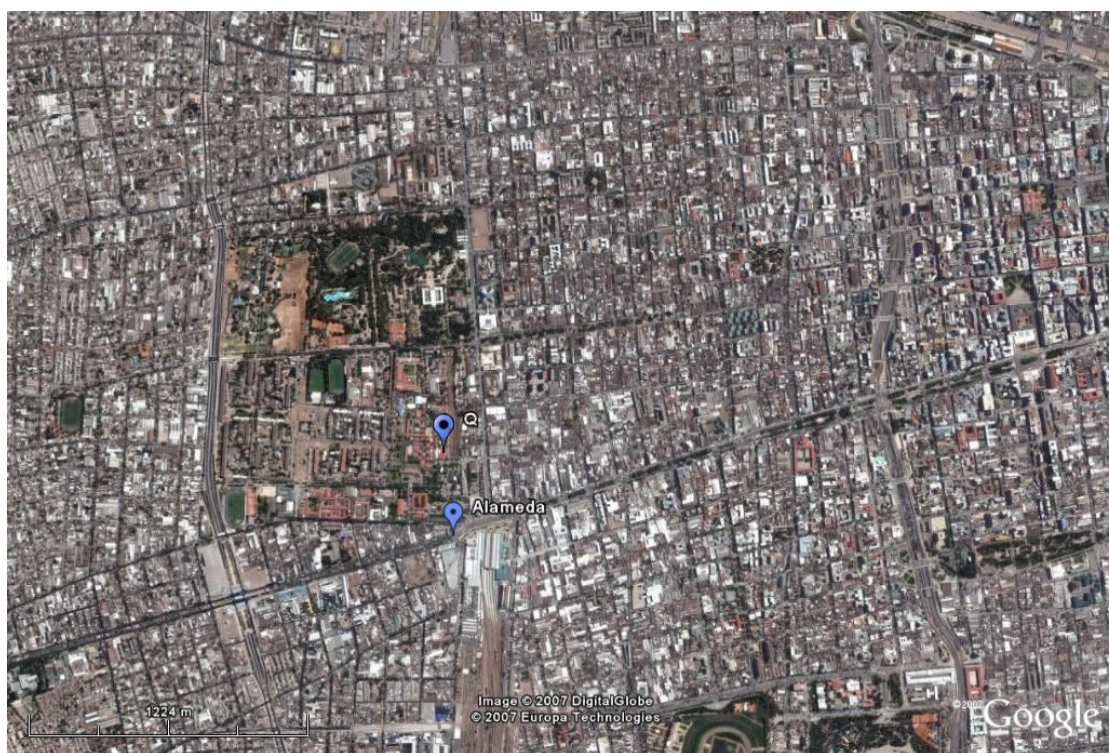
- 8.1. Cromatogramas, espectros y curvas de calibración de cada compuesto puro identificado en muestras de rocío.

Compuesto	Cromatograma	Espectro	Curva de calibración																
Fenol	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>RT</th> <th>Area</th> <th>% Area</th> <th>Height</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 6,158</td> <td>1233667</td> <td>100,00</td> <td>130756</td> </tr> </tbody> </table>	RT	Area	% Area	Height	1 6,158	1233667	100,00	130756										
RT	Area	% Area	Height																
1 6,158	1233667	100,00	130756																
2-Nitrofenol	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>RT</th> <th>Area</th> <th>% Area</th> <th>Height</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 12,738</td> <td>6666124</td> <td>100,00</td> <td>411360</td> </tr> </tbody> </table>	RT	Area	% Area	Height	1 12,738	6666124	100,00	411360										
RT	Area	% Area	Height																
1 12,738	6666124	100,00	411360																
3-Nitrofenol	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>RT</th> <th>Area</th> <th>% Area</th> <th>Height</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 8,219</td> <td>6720070</td> <td>99,70</td> <td>560464</td> </tr> <tr> <td>2 12,857</td> <td>19992</td> <td>0,30</td> <td>1115</td> </tr> </tbody> </table>	RT	Area	% Area	Height	1 8,219	6720070	99,70	560464	2 12,857	19992	0,30	1115						
RT	Area	% Area	Height																
1 8,219	6720070	99,70	560464																
2 12,857	19992	0,30	1115																
2,3-dinitrofenol	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>RT</th> <th>Area</th> <th>% Area</th> <th>Height</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 8,017</td> <td>3205097</td> <td>100,00</td> <td>63038</td> </tr> </tbody> </table>	RT	Area	% Area	Height	1 8,017	3205097	100,00	63038										
RT	Area	% Area	Height																
1 8,017	3205097	100,00	63038																
2,5-dinitrofenol	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>RT</th> <th>Area</th> <th>% Area</th> <th>Height</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 7,974</td> <td>11137</td> <td>0,16</td> <td>1006</td> </tr> <tr> <td>2 8,698</td> <td>7023064</td> <td>99,84</td> <td>113207</td> </tr> </tbody> </table>	RT	Area	% Area	Height	1 7,974	11137	0,16	1006	2 8,698	7023064	99,84	113207						
RT	Area	% Area	Height																
1 7,974	11137	0,16	1006																
2 8,698	7023064	99,84	113207																
2,6-dinitrofenol	 <table border="1"> <thead> <tr> <th>RT</th> <th>Area</th> <th>% Area</th> <th>Height</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1 3,420</td> <td>60869</td> <td>2,10</td> <td>11534</td> </tr> <tr> <td>2 3,780</td> <td>2769153</td> <td>95,35</td> <td>158743</td> </tr> <tr> <td>3 5,863</td> <td>74271</td> <td>2,56</td> <td>6858</td> </tr> </tbody> </table>	RT	Area	% Area	Height	1 3,420	60869	2,10	11534	2 3,780	2769153	95,35	158743	3 5,863	74271	2,56	6858		
RT	Area	% Area	Height																
1 3,420	60869	2,10	11534																
2 3,780	2769153	95,35	158743																
3 5,863	74271	2,56	6858																

8.2. Constantes de Henry determinadas a 308 K, en [mol Kg⁻¹ atm⁻¹]

Fenol	2100
2-NF	72
3-NF	1,6 *10 ⁴
4-NF	2,1 *10 ⁴

8.3. Mapa de ubicación de la Facultad de Química y Biología de la USACH, en la comuna de Estación Central, Santiago, Chile.



8.4 Presiones

Fenol : Presión de vapor, Pa a 20°C: 47

2-nitrofenol : Presión de vapor, Pa a 25°C: 15

4-nitrofenol : Presión de vapor, Pa a 20°C: 0,0032