

UCH-FC

U. Ambiental

SM2

C.1

**DETERMINACION DE TRIBUTIL ESTAÑO EN SEDIMENTOS MARINOS
INTERMAREALES POR ESPECTROMETRIA DE MASAS ACOPLADO A
CROMATOGRAFIA GASEOSA.**

Memoria de Título entregada a la
Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de

QUÍMICO AMBIENTAL

Carmen Luz Saavedra Peralta

Director de Memoria: Dr. Pablo Richter Duk

Co-Director: Prof. Maria Inés Toral Ponce

Diciembre, 2004.

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

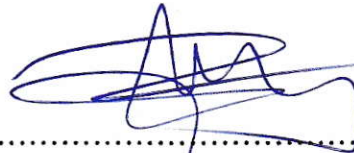
INFORME DE APROBACIÓN
MEMORIA DE TITULO

Se informa a la escuela de Pre-grado de la Facultad de Ciencias, Universidad de Chile que la memoria de Título presentado por la alumna

CARMEN LUZ SAAVEDRA PERALTA

ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Memoria de Título como requisito para optar al Título de Químico Ambiental.

Director de Memoria: Dr. Pablo Richter Duk



Co-Director: Prof. Maria Inés Toral Ponce



Comisión de Evaluación de Memoria de Título

Dr. Carlos Díaz



Dra. Verónica Arancibia

AGRADECIMIENTOS

En estos momentos recuerdo el sendero que me tocó caminar a lo largo de mi formación académica, no ausentes de dificultades y alegrías, y ahora, heme aquí en la recta final más fuerte que nunca. Por supuesto que esto no es mérito únicamente mío, sino también, de todas aquellas personas que me han acompañado en esta larga travesía, a quienes quiero agradecer y dedicar el fruto de este gran esfuerzo.

Primero que todo debo agradecer de mi familia el apoyo en las buenas y en las malas, en la salud y enfermedad de mi Mama, mi hermana Ceci, mi tía Iris y Paty y mis abuelas Tala y Tita.

También recuerdo a mis compañeras de colegio, que si bien no nos hemos visto muy seguido, cada vez que lo hacemos sentimos que el cariño y la confianza no han mermado por la erosión del tiempo.

Por otra parte están todos los amigos que conocí en la Universidad, que me han entregado su apoyo, cariño y confianza. En primer lugar quiero agradecer de forma especial a Roxana por alegrarme la vida, por escucharme y ser una excelente compañera de curso. También quiero agradecer a Carito y a Katherina por su cariño, amistad y compañía. Finalmente quiero agradecer a la Lele, a la Ale, al Alfredo, al Chico y al Negro ya que, todos, en algún aspecto u otro, han enriquecido mi vida.

En mi pasar por el laboratorio de Química Analítica conocí una gran variedad de personas con las cuales compartimos momentos memorables. Así que gracias chiquillos, Zaida, Elvira, Germán, Kissy, Pleyton, Sandra, Chelo y Andrés.

Dentro de los profesores que marcaron mi formación como profesional se encuentran Sylvia Copaja y María Inés Toral. Gracias por su abnegada entrega a la docencia. En especial agradezco a Meme por confiar en mí y aceptarme no sólo en su laboratorio sino también como su amiga, gracias por compartir con todos nosotros “los del lab” un espacio en su corazón.

No puedo irme de esta Universidad sin reconocer toda la ayuda de algunos funcionarios claves como lo son don Marco, Juan Carlos, Anita y Sole. Vale!

Finalmente agradezco a Felipe que me ha acompañado durante todos estos difíciles años de formación profesional y personal principalmente. También agradezco enormemente a Cristina que me ha tratado como su hija, a las niñas Tamara, Romina y Paz Belén que han llenado mis tardes de alegría.

INDICE DE CONTENIDO

1. Introducción	1
2. Marco Teórico	12
2.1. Cromatografía gaseosa	12
2.2. Espectrometría de masas	17
2.3. Extracción con agua subcrítica	20
2.4. Tratamiento de datos	28
3. Objetivos	32
3.1. Hipótesis	32
3.2. Objetivos Generales	32
3.2. Objetivos Específicos	33
4. Materiales y Método	34
4.1. Materiales	34
4.2. Reactivos	35
4.3. Preparación de disoluciones	36
4.3.1. Estándares de TBT	36
4.3.2. Estándar sustituto	36
4.3.3. Estándar interno	37

4.3.4. Otras disoluciones.....	37
4.4. Aparatos e Instrumentos	38
4.5. Procedimiento	39
4.5.1. Procedimiento de análisis por método convencional	39
4.5.2. Procedimiento de extracción de TBT por agua subcrítica, metodología propuesta	44
4.5.3. Colección de muestras reales	50
5. Resultados y Discusión	52
5.1. Determinación de TBT por cromatografía de gases con detección por masas	52
5.2. Validación de los parámetros analíticos	55
5.3. Desarrollo de un método analítico de extracción de TBT de sedimento marino por fluido subcrítico	58
5.4. Colección de Muestras Reales	62
5.5. Análisis de muestras reales por método convencional	64
5.6. Aplicación de metodología propuesta a muestras reales	67
6. Conclusión	68
7. Referencia Bibliográfica	70
7.1. Referencia general	70
7.2. Referencia específica	70

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1.1. Detectores más comunes y sus características.....	16
Tabla 2.3.1. Comparación de propiedades de los fluidos supercríticos con los gases y líquidos	25
Tabla 4.5.1.1. Masas y tiempos de retención para iones monitoreados.....	42
Tabla 4.5.2.1. Composición del material de referencia de sedimento marino para metales trazas y otros constituyentes de la National Research Council Canada, PACS-2	49
Tabla 5.1.1. Fragmentación de la molécula de TBTEt	54
Tabla 5.2.1. Construcción curva de calibración	55
Tabla 5.2.2. Parámetros analíticos obtenidos en la validación del método (2004).....	57
Tabla 5.2.3. Propiedades analíticas del método convencional de extracción de TBT realizado por CENMA (2001)	57
Tabla 5.3.1. Estudio de la temperatura	59
Tabla 5.3.2. Estimación de residuos generados en la etapa de extracción Sólido-líquido, según metodología utilizada	61
Tabla 5.4.1. Concentración de TBT encontrados en sedimentos del puerto de San Antonio el año 1998.....	62
Tabla 5.5.1. Resultados de análisis de TBT en muestras reales de sedimento colectadas en la playa de San Antonio y La Boca	66

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Molécula de TBT.....	2
Figura 1.2. Imagen de <i>Hexaples trunculus</i>	5
Figura 2.1.1. Sensibilidad de detectores más comunes.....	16
Figura 2.2.1. Diagrama de bloques de los componentes básicos de un espectrómetro de masas	18
Figura 2.3.1. Permisividad relativa del agua en función de la temperatura y de algunos solventes comunes a 20 o 25°C	23
Figura 2.3.2. Diagrama de fases hipotético del agua	26
Figura 4.5.1.1. Resumen del procedimiento analítico para la determinación de TBT en muestras de sedimento por el método convencional	43
Figura 4.5.2.1. Resumen del procedimiento analítico para la determinación de TBT en muestras de sedimento por el método propuesto	47
Figura 4.5.2.2. Sistema de extracción por fluido subcrítico	48
Figura 4.5.3.1. Mapa de la V y VI Región de Chile	50
Figura 4.5.3.2. Esquema de toma de muestra	51
Figura 5.1.1. Cromatograma en modalidad SCAN de un estándar de 0,5 mg mL ⁻¹ de TBT además de 0,1 mg mL ⁻¹ de estándar interno y sustituto	52
Figura 5.1.2. Espectro de masa de un estándar de 0,5 mg L ⁻¹ de TBT	53
Figura 5.2.1. Curva de calibración de TBT para muestras reales de agua y sedimento	56
Figura 5.4.1. Puntos del muestreo del puerto de San Antonio (1998).....	65

ABREVIACIONES

AcEt: acetato de etilo

AES: espectrometría de emisión atómica

ASE: extracción por solvente acelerada

DBT: dibutil estaño

ECD: detector de captura de electrones

FID: detector de ionización de llama

FS: fluido supercrítico

EFS: extracción con fluido supercrítico

FPD: detector fotométrico de llama

MAE: extracción por microonda asistida

MEPC: Marine Environment Protection Committee

MIP: plasma inducido por microondas

MPA: áreas protegidas marinas

NaBEt₄: tetraetilborato de sodio

NPD: detector nitrógeno y fósforo

PAHs: hidrocarburos aromáticos policíclicos

PCBs: bifenilos policlorados

PHW: agua caliente presurizada

QFAAS: espectrometría de absorción atómica con horno de cuarzo

SCAN: barrido

SIM: método del ión simplificado

TBT: tributil estaño

TBTd27: tributil estaño deuterado

TeBTd36: tetrabutyl estaño deuterado

TCD: detector de conductividad térmica

TPhT: trifenil estaño

RESUMEN

El tributilestaño (TBT) es un compuesto organometálico utilizado como agente antiincrustante de algas, moluscos y hongos en embarcaciones e instalaciones marinas. Este uso ha extendido su contaminación a escala global afectando aguas, sedimentos y biotas. En concentraciones de unos pocos ng L^{-1} puede causar desórdenes endocrinos conocido como imposex y se ha detectado en 63 géneros y 118 especies hasta la fecha.

Estudios recientes realizados en la costa centro y sur de Chile han detectado imposex en las especies de moluscos *Acanthina monodon* y *Nassarius gayi*.

En base a los antecedentes recopilados se decidió explorar una alternativa a la primera etapa de preparación de muestra para determinación de TBT en sedimentos marinos utilizando agua subcrítica. Esta técnica tiene la ventaja de ser limpia, evita la intoxicación del operador y la contaminación del medioambiente, y no requiere del uso de ácidos y disolventes orgánicos. El agua subcrítica es aquella que se encuentra en condiciones de altas temperaturas, altas presiones y por debajo de su punto crítico. Conjuntamente, y con el propósito de complementar un estudio anterior realizado por CENMA, se propuso determinar la presencia de TBT en el sector de la caleta del puerto San Antonio a nivel intermareal, para lo cual se implementó y validó la metodología convencional de extracción y análisis de TBT.

La hipótesis planteada respecto de la extracción de TBT desde sedimentos fue validada. Para una masa de 0,30 g de sedimento se obtuvo las siguientes condiciones óptimas de extracción: una temperatura óptima de 300°C con 30 minutos de extracción dinámico y 30 minutos de extracción estático y un caudal de 1,00 mL min⁻¹. En estas condiciones se lograron recuperaciones de 82,0 ± 7,5 % cuando se utilizó el material de referencia PACS-2. Se propone mejorar la extracción modificando el agua con mezclas de disolventes o con el uso de detergentes.

Por otra parte, se logró implementar y validar la metodología convencional de extracción con disolventes de TBT y su posterior determinación por GC-MS. La metodología presenta buenas propiedades analíticas y podría ser aplicada en el análisis de sedimentos dado que valores mencionados en referencias bibliográficas (Waldock, 1994) indican un rango de valores de 0,01 - 0,05 µg g⁻¹ para sedimentos poco contaminados y > 1 µg g⁻¹ en sedimentos que contienen partículas de pintura. El límite de detección encontrado fue de 0,11 ng g⁻¹ mientras que el límite de cuantificación fue de 0,27 ng g⁻¹ y para una concentración de 1,98 ng mg⁻¹ la desviación estándar relativa del método fue de 9,8%.

La hipótesis planteada respecto a la presencia de TBT en sedimentos no pudo ser verificada, dado que no se detectó la presencia de este compuesto en sedimentos marinos de la zona intermareal en la caleta del puerto de San Antonio utilizando la metodología convencional previamente implementada y validada. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes y para confirmar esta distribución se sugiere realizar un muestreo adicional donde se puedan tomar muestras de sedimentos anóxicos y en zona oscura

cercanos a la zona intermareal ya que en estas condiciones el TBT se puede estabilizar y acumular por años (Dowson y col, 1996; Waldock, 1994). También se pueden realizar estudios de los cambios en las concentraciones de TBT por variaciones estacionales, mensuales o diarias que den cuenta de la variable temporal.

ABSTRACT

Tributyltin (TBT) is an organometallic compound used as antifouling agent for algae, molluscs and fungi in marine facilities and ships. This use has extended its contamination to a global scale affecting water, sediment and biota. Concentrations of a few ng L^{-1} can cause endocrine disorders known as imposex, detected in 63 genus and 118 species until today.

Recent researches done in Chilean central and southern coasts have detected imposex in the molluscs species *Acanthina monodon* and *Nassarius gayi*.

Based on background compiled, it was purposed to explore an alternative for the first sampling preparation stage for the determination of TBT in marine sediments using subcritical water. This technique has the advantage of being clean, avoids operators intoxication and environmental pollution, and do not require the use of acids and organic solvents. The subcritical water is water in high temperature, high pressure and under critical point conditions. Altogether, and with the purpose of complementing a previous research done by CENMA, it was decided to determined the presence of TBT in the San Antonio's fishery harbor sector at intermareal level, whereby the conventional method of extraction of TBT was implemented and validated.

The hypothesis outlined regarding to the extraction of TBT from sediment was validated. For a mass of 0.30 g of sediment it was obtained the following good conditions of extraction: a good temperature of 300°C with 30 minutes of dynamic extraction and 30 minutes of static extraction and a flow of 1.00 mL min⁻¹. Under these conditions recoveries of 82,0 ± 7,5% were achieved when the material of reference PACS-2 was used. It is proposed to improve the extraction modifying the water with mixtures of solvent or with the use of surfactants.

On the other hand, it was possible to implement and to validate the conventional methodology of extraction with solvents of TBT and its later determination for GC-MS. The methodology presents good analytic properties and it could be applied in the analysis of sediments since you value mentioned in bibliographical references (Waldock, 1994) they indicate a range of values of 0,01 - 0,05 µg g⁻¹ for not very polluted sediments and > 1 µg g⁻¹ in sediments that contain particles of painting.. The detection limit was of 0.11 ng g⁻¹ while the quantification limit was of 0.27 ng g⁻¹ and for a concentration of 1.98 ng mg⁻¹ the relative standard deviation of the method was of 9.8 %.

The hypothesis outlined regarding the presence of TBT in sediments could not be verified, since the presence of this compound was not detected in marine sediments of the intermareal zone in the cove of San Antonio's port using it previously implemented and validated conventional methodology. However, these results are not conclusive and to confirm this distribution it is suggested to carry out an additional sampling where they

can take samples of not oxygenated sediments and in near dark area to the intermareal zone since under these conditions the TBT you can stabilize and to accumulate per years (Dowson and cabbage, 1996; Waldock, 1994). It can be carried out also studies of the changes in the concentrations of TBT for seasonal, monthly or daily variations that give bill of the temporary variable.

1. INTRODUCCION

El mar, desde los inicios de la vida en el planeta, ha tenido un rol fundamental y en ocasiones protagónico. El océano es responsable del balance térmico del planeta, es una fuente de recursos de valor como la alimentación, energía e incluso recreación, así como también es un medio de transporte muy favorable para el comercio a larga distancia.

Sin embargo, también se ha convertido en un verdadero sumidero universal de los desechos industriales y domésticos de la actividad antrópica. Al mar llegan toda clase de trazas metálicas provenientes del vertido de residuos líquidos a cuerpos de aguas superficiales, plaguicidas y otros desechos agrícolas, residuos domiciliarios, etc. Además se encuentran las fuentes de contaminación directa por vertidos como el petróleo.

Una vez que los contaminantes llegan al mar, una parte es captada por el plancton y se concentra a través de la malla trófica afectando los productos de consumo directo del hombre. Las zonas más afectadas son las playas y costas debido al impacto directo en el plancton, biota en general y por la eutroficación de esta zona afectando el sistema y mermando los recursos de un país (Moreno y Fedele, 2002).

Si bien el mar tiene una capacidad amortiguadora frente a los contaminantes que recibe y en altamar no se observan mayormente las consecuencias de éstos, esta capacidad

amortiguadora tiene límites, sobre todo frente al petróleo, grasas y compuestos orgánicos resistentes (COP).

Si se considera que la contaminación producida por una fuente local está sujeta a la translocación por corrientes marinas y el viento, ésta puede tener impactos a escala global. Un caso particular es el de los compuestos organoestañosos (Tuğrul y col, 1983) y especialmente, el tributil estaño (TBT). (Godoi y col, 2003; Marshall & Rajkumar 2003; Horiguchi y col, 2004)

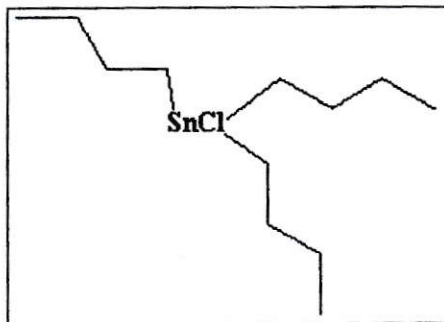


Figura 1.1. Molécula de TBT.

Las distintas formas de compuestos organometálicos de estaño se usan como pesticidas aunque también la forma de mono y di-organoestañosos se usa como estabilizante de productos basados en cloruro de polivinilo (PVC), vidrio y otros. El principal uso que se le ha dado al TBT es de agente antiincrustante de algas, moluscos y hongos en pinturas de barcos e instalaciones marinas (IMO, 2002; Waldock, 1994).

Este hecho ha dado como resultado que la extensión de la contaminación por TBT sea a escala global y principalmente en zonas de alto tráfico portuario afectando todos los componentes del sistema, ya sea el agua, los sedimentos y biotas (Gabrielides y col, 1990; Godoi y col, 2003; Horigushi y col, 2004; Marshall & Majkumar, 2003; Nias y col, 1993; Strand & Admund, 2003).

El estaño en los compuestos organometálicos se encuentra mayormente en un estado tetravalente en las formas de tetra, tri, di y monoalquil o aril. Estas especies se pueden encontrar como sales, óxidos, hidróxidos, ésteres o polímeros, pero la toxicidad es independiente del anión. Las formas tri-sustituidas son las más estudiadas dado que representan una mayor toxicidad, independiente del tamaño del grupo alquil o aril. Entre ellas las más tóxicas son el TBT y el trifenilestaño (TPT). Es por ello que la información disponible se centra principalmente en estos compuestos (Horigushi y col, 2002; Horigushi y col, 2004; Waldock, 1994).

La solubilidad en agua para el cloruro de TBT es de 10 mg L^{-1} y el coeficiente de partición entre el sedimento y el agua es del orden de $10^3 - 10^4$. Por lo tanto, el TBT se concentra en los sedimentos y en la biota especialmente en la de tipo bentónica. (Waldock, 1994)

Los compuestos tri-organometálicos de estaño en el ambiente se degradan secuencialmente a compuestos di y mono-estañosos inorgánicos. La degradación fotoquímica por radiación ultravioleta en estudios *in vitro* puede ser rápida (entre 2 y 3

días), pero en sistemas acuáticos la degradación biológica es más significativa por la pequeña cantidad de radiación UV que puede penetrar. En fase acuosa, la vida media es del orden de días a meses dependiendo de la temperatura y de la biomasa de algas. En sedimentos la degradación es más lenta y el TBT persiste en sedimentos anaeróbicos por años (Dowson y col, 1996; Waldock, 1994).

La acumulación de compuestos organometálicos, aún en concentraciones muy bajas puede producir algún efecto nocivo en organismos marinos (U'Ren, 1983), por lo que se pueden utilizar como bioindicadores de contaminación (Ellis & Pattisina, 1990; Marshall & Rajkumar, 2003; Pessoa y col, 2001). El TBT en particular, a concentraciones ambientales de sólo unos pocos ng L^{-1} puede causar desordenes endocrinos que producen trastornos en los genitales de hembras de diferentes especies de caracoles marinos (Ellis & Pattisina, 1990; Gooding y col, 1999; Huaquín y col, 2004; IMO, 2002; Marshall & Rajkumar, 2003; Nias y col, 1993; Saavedra & Ellis, 1990; Terlizzi y col, 2004; Waldock, 1994). Este desorden es conocido internacionalmente como imposex o pseudohermafroditismo y se ha detectado en 63 géneros y 118 especies (Gooding & col, 1999; Terlizzi y col, 2004). Estudios confirman que la presencia de TBT produce una alteración en la biotransformación o eliminación de la testosterona (Oberdorter & McClellan-Green, 2002; Gooding & LeBlanc, 2001; Gooding y col, 2003; Verslycke y col, 2003).

Estudios realizados en moluscos de las costas de Italia muestran que, a pesar de los esfuerzos iniciados hace 10 años para el uso restringido del TBT, todas las poblaciones

de *Hexaplex trunculus* (ver figura 1.1) consideradas presentan imposex, así como también todas las hembras de 13 poblaciones de áreas protegidas marinas (MPA) (Terlizzi y col, 2004).

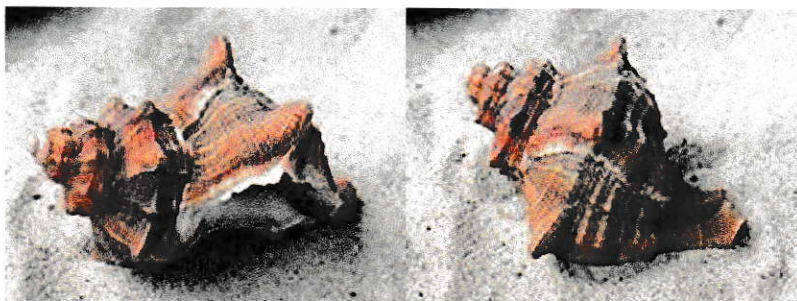


Figura 1.2. Imagen de *Hexaplex trunculus*.

Los efectos dañinos del TBT fueron reconocidos por la Internacional Maritime Organization (IMO) en 1989. En 1990, el Marine Environment Protection Committee (MEPC) de IMO adoptó la resolución en la cual recomienda que los países adopten medidas para eliminar el uso de pinturas anti-incrustantes que contienen TBT, en embarcaciones no recubiertas de aluminio menores de 25 metros de longitud y, eliminar el uso de pinturas anti-incrustantes con una tasa de lixiviación de más de $4 \mu\text{g cm}^{-2} \text{ día}^{-1}$ de TBT (IMO, 2002).

En noviembre de 1999, IMO resolvió desarrollar instrumentos legales a escala internacional para difundir los efectos dañinos de los agentes anti-incrustantes usados en los barcos. La resolución llamó a una prohibición global de la aplicación de compuestos

organometálicos que actúen como biocida o agente anti-incrustante en barcos para el 1° de enero del 2003, y una completa prohibición para el 1° de enero del 2008 (IMO, 2002).

Como la problemática generada por el uso del TBT tiene un alcance global, se han generado alternativas para minimizar la cantidad de TBT en el ambiente como por ejemplo el desarrollo de pinturas donde los compuestos organoestañosos se encuentran entrelazados al polímero base lo que trae como consecuencia una baja tasa de solubilidad del compuesto en el ambiente. También se ha sintetizado biocida y agente antiincrustante en las pinturas basados en cobre o silicio que pueden reemplazar el uso de TBT. Sin embargo cabe considerar que estas pinturas también pueden ser potenciales de causar problemáticas en los organismos por lo que requieren de un estudio toxicológico serio y acabado antes de su introducción al mercado (Birchenough y col, 2002), siguiendo una política preventiva más que reactiva.

Actualmente se tiende a hacer las superficies de los barcos más pulidas facilitando la remoción de los organismos marinos durante el paso del barco a través del agua sin necesidad de intoxicarlos. También se puede utilizar sistemas de limpieza bajo el agua evitando que el barco se coloque en un muelle seco mientras que instrumentos ultrasónicos y electrolíticos pueden servir como un medio para liberarse de agentes incrustantes.

Estudios recientes realizados en la costa centro y sur de Chile (Gooding, 1999; Huaquín, 2003; Huaquín^{a,b}, 2004) han detectado los efectos negativos del TBT en la aparición del

imposex en moluscos. Estudios realizados en poblaciones de *Acanthina monodon* y *N. gayi* ha llevado a determinar imposex en un elevado porcentaje en áreas portuarias y cercanas a ellas.

Los escasos estudios analíticos de determinación de TBT realizados en nuestro país (Egushi y col, 2001), indican que en ciertas zonas muestreadas del puerto de San Antonio las concentraciones en agua y sedimento están en los intervalos 2,6 - 6,6 ng mL⁻¹ y 0,1 - 82 ng g⁻¹, respectivamente. Además, se determinó la presencia de TBT en biota.

Con respecto al procedimiento analítico para la determinación de compuestos organoestañosos, éste resulta ser complicado y muy lento, siendo una limitante reconocida internacionalmente (Abalos y col, 1997; Morabito & Quevauviller, 2002; Schubert y col, 2000) y que para la cual, consecuentemente, se hace necesario encontrar algunas alternativas.

Los procedimientos de preparación de muestras para la especiación de compuestos organoestañosos en sedimento consisten en varias etapas, tales como: (i) extracción del analito desde la matriz, (ii) formación de derivados volátiles (sólo en caso de utilizar cromatografía gaseosa en la separación), (iii) preconcentración y (iv) análisis. Cada etapa contiene a su vez múltiples pasos que poseen varias fuentes de error y que, por lo tanto, requieren ser revisados y optimizados cuidadosamente de forma individual (Schubert y col, 2000).

La etapa (i) es considerada la más crítica en el procedimiento de preparación de la muestra, debido a la estabilidad limitada del analito y la fuerte interacción entre el analito y la matriz. La extracción de compuestos organoestañosos desde el sedimento requiere de medios ácidos combinados con disolventes orgánicos para una extracción líquido-líquido. Se puede aumentar la eficiencia de extracción mediante la adición de agentes acomplejantes o salinizadores que aumentan la solubilidad del analito en el disolvente orgánico. Conjuntamente con el tiempo consumido en la extracción por Soxhlet se debe aplicar agitación o sonicación como energías mecánicas adicionales para incrementar la eficiencia de extracción (Schubert y col, 2000). De modo que, el procedimiento de extracción de compuestos organoestañosos desde la matriz resulta ser muy lento, con un alto consumo de disolventes orgánicos y ácidos, y que requiere de energía mecánica adicional (en caso de no ser factible la utilización de un método automático esta energía la provee el analista químico). Además cabe señalar que la extracción resulta ser tóxica al medio ambiente y al operador. Se han utilizado algunas alternativas como el uso de extracción por microonda asistida (MAE), extracción por disolvente acelerada (ASE), extracción por fluidos supercríticos (SFE) (Schubert y col, 2000).

Las MAE y SFE son técnicas de extracción que merecen atención porque reducen el consumo de disolventes y el tiempo de análisis. Sin embargo, aún requieren de minimizar costos en la instrumentación y de mejorar la confiabilidad (Abalos y col, 1997). La ASE es una técnica de extracción muy eficiente que permite aumentar la tasa de extracción, respecto de sistemas convencionales, como el Soxhlet. Los tiempos de

extracción y la cantidad utilizada de disolventes orgánicos son disminuidos drásticamente.

Los análisis de compuestos organoestañosos son realizados mayormente con detectores fotométricos de llama (FPD) y espectrometría de masa (MS), que han reemplazado la espectrometría de absorción atómica con horno de cuarzo (QFAAS). Si bien existe una alta variabilidad en las recuperaciones obtenidas por FPD y MS, estas se atribuyen a la incertidumbre propia de las etapas de extracción y a la derivatización. Los mejores resultados en función de la reproducibilidad se obtienen con la espectrometría de emisión atómica con plasma inducida por microondas (MIP-AES). Sin embargo, el uso de esta técnica es aún escasa. Lo mismo se puede decir sobre la cromatografía líquida de alta resolución fluorimétrica (HPLC-fluorimétrica), aunque sólo pueda detectar TBT y TPhT. También se ha utilizado LC con plasma acoplado inductivamente con AES o MS (ICP-AES y ICP-MS, respectivamente), pero existen dificultades para optimizar las condiciones del HPLC y de los múltiples elementos del detector (Morabito y Quevauviller, 2002).

Una alternativa a la extracción de TBT en sedimentos aún no estudiada es la técnica de extracción con agua subcrítica. En estas condiciones es posible modificar las propiedades de disolvente del agua haciéndola más afín con compuestos menos polares (Kronholm, 2002).

Las extracciones en condiciones subcríticas se han aplicado en diversas áreas: determinación de bifenilos policlorados (PCBs) en suelos y sedimentos (Hawthorne y col, 1998), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en suelos, sedimentos y material particulado atmosférico (Hawthorne^b y col, 2000), determinación de surfactantes en lodo (Bruno y col, 2002), destrucción de explosivos en suelos contaminados (Hawthorne^a y col, 2000), extracción de betún de asfalto de pavimento (Houser, 1990), extracción de antioxidantes en plantas (Ibáñez y col, 2003) y también se ha estudiado la solubilidad de pesticidas en agua subcrítica (Curren & King, 2001a) para su posterior aplicación en la determinación de pesticidas en hígados de carne bovina (Curren & King, 2001b).

Teniendo todo lo anterior en consideración se decidió explorar una alternativa a la primera etapa de preparación de muestra para determinación de TBT en sedimentos marinos utilizando agua subcrítica. Esta técnica tiene la ventaja de ser limpia, ya que no sólo evita la intoxicación del operador y la contaminación del medioambiente, sino que además vuelve dispensable el uso de ácidos y disolventes orgánicos. Conjuntamente, y con el propósito de complementar el estudio precedente realizado en el CENMA (Egushi y col, 2001), se propuso determinar la presencia de TBT en el sector de la caleta del puerto San Antonio a nivel intermareal, para lo cual se implementó y validó la metodología convencional de extracción y análisis de TBT.

La importancia de realizar estudios de TBT en Chile radica en que este es un país pesquero y acuicultor, cuyas principales fortalezas y ventajas comparativas reside en la

alta productividad del ecosistema marino existente frente a nuestras costas. Las ricas zonas de surgencia en la zona centro-norte de nuestro país, así como las frías aguas de la zona sur austral dan origen a una variedad de recursos pesqueros disponibles para desarrollar actividades extractivas industriales y artesanales. La calidad de nuestras aguas, ecosistemas y geografía han permitido el desarrollo de numerosos recursos de cultivo. Durante el año 2002, los desembarques pesqueros y la cosecha desde centros de cultivo, superaron 4,7 millones de toneladas, cifra que representa el 5% de la captura mundial, ubicándolo como la sexta potencia en desembarques totales. Asimismo, Chile presenta una posición privilegiada en cuanto a sus exportaciones pesqueras, alcanzando el 2002, un valor de casi US\$ 2.000 millones, ocupando actualmente el séptimo lugar en el mundo. Además, la pesca da empleo directo a más de cien mil personas (Sociedad Nacional de Pesca).

2. MARCO TEORICO

2.1. Cromatografía Gaseosa (GC)

La cromatografía de gases es una poderosa técnica de separación que tiene incluido un detector, lo cual la hace una técnica muy completa y con una amplia aplicabilidad. Para que pueda utilizarse se necesita que los analitos sean volátiles y estables térmicamente. Si ello no es así, está la posibilidad de derivatizarlos. El fundamento de la separación depende del estado físico y de la naturaleza de las fases: Si la fase estacionaria es sólida ocurre el fenómeno de adsorción y si es líquida los analitos se separan de acuerdo a su polaridad y/o temperatura de ebullición. La muestra se volatiliza y se desplaza con la fase móvil, que es un gas inerte que no interactúa con el analito, a través de la fase estacionaria. El analito se reparte entre la fase móvil gaseosa y la fase estacionaria sólida ó líquida, de modo que si es retenido más fuertemente por la fase estacionaria se mueve más lentamente con el flujo de la fase móvil; por el contrario si es retenido con menos fuerza en la columna, se mueve con más rapidez en la fase móvil.

El uso de columnas de dimensiones cada vez más pequeñas le confiere a esta técnica una alta capacidad de resolución en la separación de analitos de estructuras similares. La resolución en la separación de los analitos depende fundamentalmente de éstos, las características de la fase estacionaria, los flujos y las temperaturas aplicadas para lograr

la separación (isotérmica o de temperatura programada), en cambio la sensibilidad alcanzada depende principalmente del sistema detector.

La resolución de una columna es una medida de su capacidad de separar analitos y se puede determinar experimentalmente como se muestra en la ecuación 2.1.1.

$$R = \frac{2((t_R)_b - (t_R)_a)}{W_a + W_b} \quad (\text{ec. 2.1.1.})$$

donde $(t_R)_{a,b}$ son los tiempos de retención de las especies a y b a separar, y $W_{a,b}$ son sus anchos de las señales correspondientes. Así, valores menores a la unidad indican señales no resueltas o superpuestas lo cual indica que las especies a y b no fueron separadas de manera satisfactoria. En cambio valores mayores a la unidad (1,5) indican que sí fueron separadas. La resolución de una columna con una fase estacionaria determinada puede mejorarse alargando la columna.

Existen básicamente dos tipos de columnas: las abiertas o capilares y las rellenas. Las columnas rellenas fueron las primeras en desarrollarse y se caracterizan por su pequeña longitud (1-6 m) y su gran diámetro interno (2-4 mm) soportando tamaños de muestras del orden de mg y con un requerimiento de altas presiones, lo que las convierte en columnas de baja eficiencia de separación. Una vez desarrolladas las columnas capilares fue posible aumentar la eficiencia de separación por su pequeño diámetro interno de 0,5

mm y una longitud de 10 a 100 m disminuyendo el requerimiento de presión y soportando muestras pequeñas del orden de los ng.

Utilizando detectores tradicionales como Ionización de llama, Conductividad térmica, Captura electrónica, etc. se obtiene solo un cromatograma que consta de una o varias señales dependiendo de la muestra inyectada. Los parámetros que se observan en estos cromatogramas, son el tiempo de retención, el área y la altura de las señales. El tiempo de retención (t_R) es un parámetro cualitativo que nos permite “identificar” los analitos, mientras que el área y la altura nos permiten cuantificar éstos. Sin embargo, al utilizar estos detectores no siempre es fácil y confiable la identificación de los analitos conociendo el t_R , debido a que compuestos ligeramente diferentes podrían eluir juntos en una determinada columna. Para ello, se inyecta patrones y muestras en las mismas condiciones experimentales y se comparan los t_R . También se puede inyectar muestra sola y luego muestra mezclada o dopada con el estándar que se cree está presente en la muestra. Si la señal que se quiere asignar a un determinado compuesto aumenta su área al agregar el estándar, es una primera evidencia que ese analito está presente. Posteriormente se cambian las condiciones de trabajo, y si es posible se utiliza otra columna con fase estacionaria ligeramente diferente, y se inyecta nuevamente la muestra dopada con estándar. Si la señal analito-estándar sigue siendo una y no presenta desdoblamientos la certeza de que el analito está identificado es mucho mayor. Sin embargo, el uso de un detector de masas es una prueba irrefutable de la identificación del compuesto. En esta técnica (GC-MS) no sólo se obtiene un cromatograma con señales en función del tiempo, sino que también un espectro de masas asociado a cada

señal. Cabe destacar que este detector además es de alta sensibilidad y si se dispone de "ion trap" se puede concentrar un determinado compuesto y minimizar o eliminar las interferencias. Además no es necesaria la inyección de patrones, debido a que las señales espectrales están en una base de datos. Sin embargo, este es un instrumento de alto valor, al igual que su mantención.

Para realizar la cuantificación se utiliza el método del estándar interno para minimizar errores debido a la inyección de un volumen tan pequeño y/o el método de la adición estándar para minimizar efectos de matriz. Se construyen curvas de calibrado relacionando áreas o alturas con la concentración. Normalmente se prefiere el área a la altura, debido a que presenta mayor robustez.

En columnas capilares el caudal es lo suficientemente pequeño como para introducir la salida de la columna directamente en la cámara de ionización de un espectrómetro de masas. En cambio, en columnas rellenas y megacapilares es necesario emplear un separador de chorro con el fin de eliminar el gas portador que acompaña al analito.

Los detectores más comunes y sus características se muestran en la tabla 2.1.1 y en la figura 2.1.1 respectivamente. El detector más común es el de ionización de llamas (FID) utilizado para compuestos orgánicos especialmente en muestras de agua dado que es sensible al carbono pero no así al H_2O , CO_2 , SO_2 , y NO_x . El detector de captura de electrones (ECD) se utiliza para muestras ambientales con contenido halógeno como pesticidas y bifenilos policlorados. Además existe el espectrómetro infrarrojo de

transformada de Fourier (FTIR) y el espectrómetro de masas (MS) ambos utilizados para la identificación de componentes de mezclas complejas. El detector de masas se detalla a continuación, debido a que es el que se utilizó en este trabajo.

Tabla 2.1.1. Detectores más comunes y sus características.

Detector	Selectividad	Sensibilidad (g)	Tipo
FID	C-H (universal)	10^{-11}	Destructivo
NPD	N-P	10^{-12}	Destructivo
FPD	S-P	10^{-11}	Destructivo
ECD	Halógenos	10^{-12}	No Destructivo
TCD	Conductividad térmica (universal)	10^{-9}	No Destructivo
MSD	Universal	10^{-12} (SIM)	Destructivo

FID: detector de ionización de llama, NPD: detector nitrógeno y fósforo, FPD: fotométrico de llama, ECD: detector de captura de electrones, TCD: detector conductividad térmica, MSD: detector espectrométrico de masa.

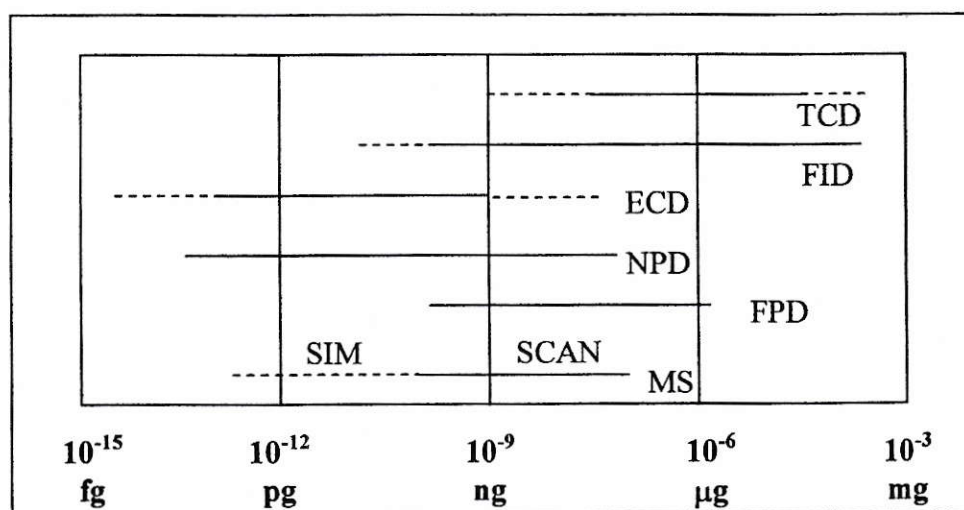


Figura 2.1.1. Sensibilidad de detectores más comunes.

2.2. Espectrometría de masas (MS)

La espectrometría de masas es una herramienta analítica de aplicación muy amplia dado que entrega información acerca de:

- (i) composición cualitativa y cuantitativa tanto de analitos orgánicos como inorgánicos en muestras complejas,
- (ii) estructuras de una amplia variedad de especies moleculares complejas,
- (iii) relaciones isotópicas de los átomos en las muestras y
- (iv) estructura y composición de superficies sólidas.

Los componentes principales de los espectrómetros de masas consisten en: sistema de entrada, fuente de iones, analizador de masas, detector, procesador de la señal, sistema de vacío y se muestran en la figura 2.2.1.

Sistema de entrada: permite la introducción de una muestra muy pequeña y representativa en la fuente de iones con la mínima pérdida de vacío.

Fuente de iones: se pueden clasificar entre duras y blandas. Las fuentes duras entregan elevadas energía a los iones formados de manera que se encuentran en estados vibracionales y rotacionales excitados. La relajación de estos iones produce una gran fragmentación de la molécula y resultan espectros de masa complejos. Las fuentes

blandas (ionización química y desorción) produce poca excitación, poca fragmentación y con ello espectros sencillos. En el primer caso se logra la identificación inequívoca del analito, mientras que el segundo permite determinar el peso molecular de este. De la fragmentación pueden resultar un gran número de iones (generalmente positivos) de varias masas de menor (en ocasiones mayores) que la del ión molecular los cuales son llamados iones descendientes o hijos. El ión molecular es un ión radical que tiene la masa molar de la molécula original (analito). El pico más grande en un espectro de masas se llama pico base.

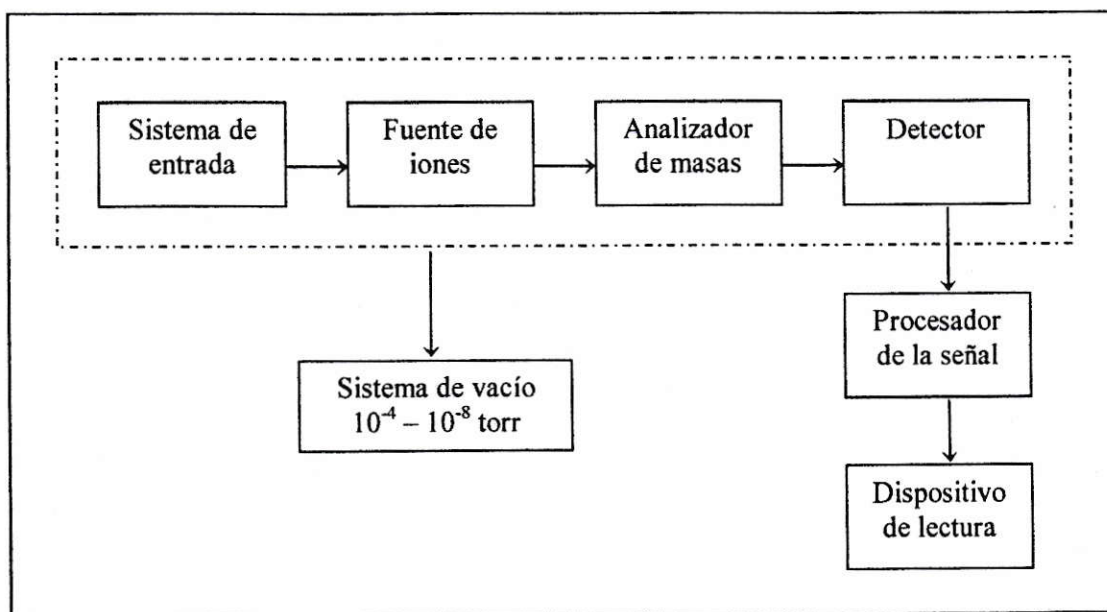


Figura 2.2.1. Diagrama de bloques de los componentes básicos de un espectrómetro de masas.

Analizador de masas: instrumento usado para separar iones con diversas relaciones masa/carga. Este instrumento debe distinguir entre diferencias muy pequeñas de masa y permitir el paso de un número suficiente de iones para dar lugar a corrientes de iones fácilmente medibles. Estas propiedades no son compatibles y por lo tanto se debe llegar a un compromiso. Actualmente el más utilizado corresponde a los analizadores de masa o los filtros de masas de cuadrupolo. Funciona como un filtro de banda estrecha variable con el fin de permitir la transmisión de un intervalo pequeño de relaciones m/z en determinadas condiciones de operación. Todos los demás iones son neutralizados y eliminados como moléculas sin carga. Variando las señales eléctricas de un cuadrupolo es posible variar el intervalo de valores m/z transmitidos, haciendo así posible el barrido espectral. Consta de un conjunto de 4 barras cilíndricas (6 mm x 15 cm) de metal que sirven de electrodos de filtro de masas, sujetas por soportes cerámicos resistentes mecánicamente a la temperatura. Los iones de la fuente son acelerados por un potencial de 5 a 15 V e introducidos en el espacio entre las barras. Las barras opuestas se conectan eléctricamente, un par al polo positivo y el otro la terminal negativo. A cada par de barras se aplican un potencial variable de corriente alterna de radiofrecuencia desfasados en 180 grados. Así, el primer par de cilindros permite el paso de iones de masa elevadas en el plano xz, el otro par permite el paso de iones de masas bajas en el plano yz, mientras que el funcionamiento de ambas permite el filtro de banda estrecho. El centro de esta banda puede variarse ajustando los potenciales de corriente alterna y continua. Al final de las barras se encuentra el detector.

Detector: convierte el haz de iones en una señal eléctrica. Generalmente se utiliza el multiplicador de electrones. Consta de una superficie de Cu /Be que emiten ráfagas de electrones al ser impactadas por iones o electrones de alta energía. Las ganancias de corriente pueden ser del orden de 10^7 .

Procesador de la señal: procesa la señal eléctrica y la almacena en la memoria de un ordenador donde puede ser mostrada o registrada de varias maneras.

Así, un espectrómetro de masas contiene un detector que convierte el haz de iones en una señal eléctrica que puede ser procesada y almacenada en la memoria de un ordenador y mostrada en una pantalla o registrada de diferentes maneras.

2.3. Extracción con agua subcrítica.

Las propiedades peculiares físicas y de disolvente del agua se fundamentan en su extraordinaria cohesividad interna comparado con prácticamente cualquier otro líquido. La molécula de agua tiene una estructura angular con distancias de enlace O-H de 0,958 Å y un ángulo de enlace O-H-O de 104,5°. La gran diferencia de electronegatividad entre hidrógeno y oxígeno confiere al enlace O-H un 33% de carácter iónico, como lo indica el momento dipolar del agua de 1,85 debye. El agua en condiciones normales es claramente una molécula altamente polar.

Las atracciones electrostáticas entre los dipolos de dos moléculas de agua tienden a orientarse de modo que el enlace O-H de una molécula apunta hacia la nube de un par libre de electrones del átomo de oxígeno de otra molécula. Esto resulta en una asociación intermolecular direccional conocida como puente de hidrógeno, una interacción crucial para las propiedades del agua y su rol como disolvente.

El carácter polar del agua la convierte en un excelente disolvente de compuestos polares e iónicos los cuales son llamados, por ende, hidrofílicos. Por otra parte, las sustancias apolares son insolubles en agua por lo que son llamadas hidrofóbicas. Estas últimas son solubles en compuestos apolares, por lo que se dice que “similar disuelve a similar”.

Los iones de una sal se comportan según la ley de Coulomb:

$$F = \frac{k \cdot q_1 \cdot q_2}{\epsilon_r \cdot r^2} \quad (\text{ec. 2.3.})$$

donde F es la fuerza existente entre las cargas q_1 y q_2 que se encuentran separadas por una distancia r, ϵ_r es la constante dieléctrica o permisividad relativa del medio entre ellas y k es la constante de proporcionalidad ($8,99 \cdot 10^9 \text{ J m C}^{-2}$). A medida que la constante dieléctrica del medio aumenta, la fuerza entre las cargas disueltas decrece. Así, la constante dieléctrica de un disolvente es una medida de su capacidad de mantener cargas opuestas separadas. En el vacío ϵ_r es igual a la unidad y en el aire es solo despreciablemente mayor.

Si comparamos las constantes dieléctricas de muchos disolventes con sus momentos dipolares permanentes se puede observar que estas cantidades incrementan conjuntamente pero no obedecen a ningún patrón regular.

La constante dieléctrica del agua se encuentra dentro de las más altas de cualquier líquido puro, mientras que los compuestos no polares como los hidrocarburos son relativamente pequeños. La fuerza entre dos iones separados por una distancia dada en líquidos no polares como hexano y benceno, es por lo tanto, 30 a 40 veces mayor que en agua. Consecuentemente, en los disolventes no polares (con un ϵ_r pequeño), los iones de carga opuesta se atraen entre sí tan fuertemente que se unen para formar una sal, mientras que las más débiles fuerzas entre iones en una solución acuosa (alto ϵ_r) permiten que se mantengan separadas cantidades significativas de los iones.

El valor de ϵ_r se desvía con respecto a valor de 1 debido a polarizaciones inducidas y la orientación de los momentos dipolares permanentes. Así, ϵ_r aumenta a medida que aumenta la polarización molecular y también aumenta en la medida que el momento dipolar eléctrico molecular aumenta.

En el caso de gases $\epsilon_r \sim 1$, en cambio para líquidos polares disminuye según la temperatura porque el movimiento térmico al azar hace disminuir la polarización por orientación. En el caso de líquidos no polares no existe polarización por orientación, por lo que ϵ_r varía solo ligeramente con respecto a la temperatura debido al cambio de la

densidad con la temperatura. En la figura 2.2.1 se muestra la dependencia de la constante dieléctrica en función de la temperatura.

Así, a altas temperaturas es posible disminuir la constante dieléctrica del agua a valores característicos de disolventes orgánicos convirtiéndola en un disolvente de compuestos poco polares.

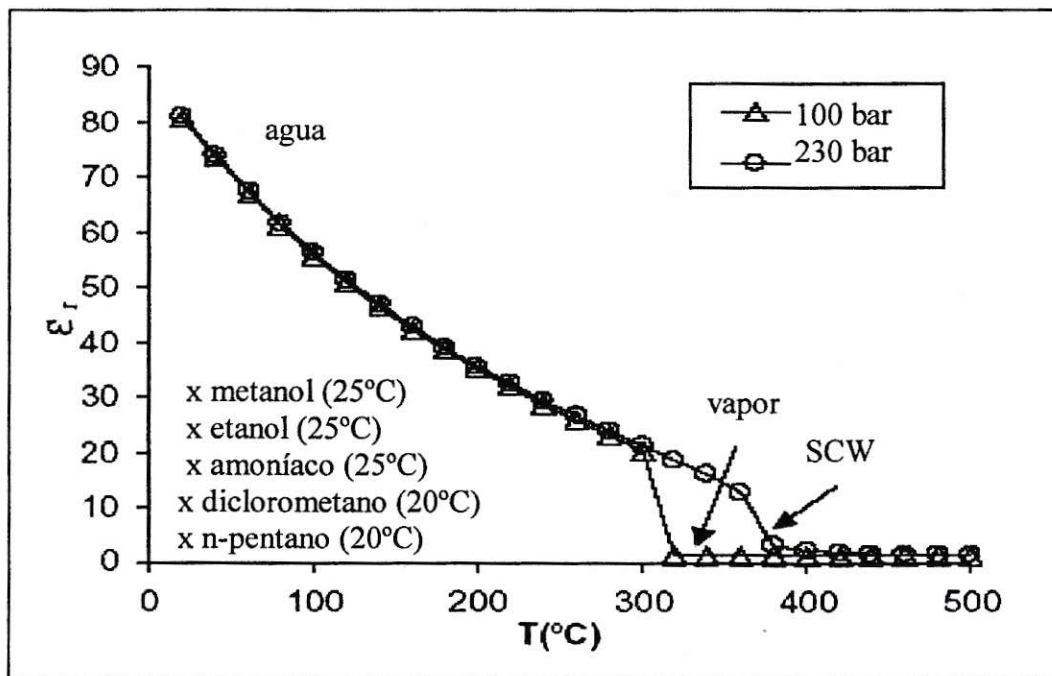


Figura 2.3.1. Permisividad relativa del agua en función de la temperatura y de algunos disolventes comunes a 20 o 25 $^{\circ}\text{C}$ (Kronholm, 2002).

Las extracciones con fluidos subcríticos ó supercríticos (EFS) son técnicas implementadas hace pocos años, sin embargo debido a su gran potencial éstas han

crecido en forma vertiginosa, sobre todo en los últimos años. Consiste en poner en contacto un fluido en condiciones sub ó supercríticas con una muestra generalmente sólida. El fluido pasa a través de la muestra y solubiliza los solutos de acuerdo a la polaridad. La extracción puede realizarse en forma estática manteniendo en contacto el fluido con el soluto en un recipiente cerrado durante un tiempo determinado, o bien puede hacerse en forma dinámica haciendo pasar constantemente el fluido a través de la muestra.

La presión crítica (P_c) es la presión más alta a la cual un gas puede licuarse por una disminución de la temperatura. De igual forma, la temperatura crítica (T_c) es la temperatura más alta a la cual un gas puede licuarse por una disminución de la temperatura. Para una sustancia a la T_c y a la P_c , la densidad del líquido y del gas es idéntica, tanto que las dos fases son indistinguibles. A la región de presión y temperatura sobre P_c y T_c se le denomina “región supercrítica”, de igual forma a la región bajo P_c y T_c se le denomina “región subcrítica”.

La densidad de estos fluidos depende de la presión y la temperatura a la cual éstos se encuentren expuestos, sin embargo está siempre cercana a los valores típicos para los líquidos. Este es el origen de las buenas propiedades disolventes de ellos. Las otras dos propiedades características son su alta difusividad y su baja viscosidad, las cuales son fuertemente significativas para lograr una extracción más expedita y eficiente. Los valores de viscosidad se encuentran entre aquellos de los líquidos y los gases, lo cual hace que éstos tengan mayores propiedades dinámicas que los líquidos. Por otra parte, su

muy baja tensión superficial le permite penetrar en sólidos porosos y compactos. Respecto a los coeficientes de difusión de solutos en FS, éstos se encuentran entre aquellos que exhiben en líquidos y gases. Debido a que estos coeficientes son más altos en líquidos, la transferencia de masa es usualmente más favorable.

En la tabla 2.2.1 se muestran los órdenes de magnitud característico de cada estado de un fluido supercrítico.

Tabla 2.3.1. Comparación de propiedades de los fluidos supercríticos con los gases y líquidos. Los datos indican solo orden de magnitud (Skoog^a y col, 2001).

Estado de la materia	Densidad (g cm ⁻³)	Coefficiente de difusión (cm ² s ⁻¹)	Viscosidad (g cm ⁻¹ s ⁻¹)
Líquido	0,6 - 2	(0,2 - 2) x 10 ⁻⁵	(0,2 - 3) x 10 ⁻²
FS	0,2 - 0,5	10 ⁻³ - 10 ⁻⁴	(1 - 3) x 10 ⁻⁴
Gas	(0,6-2) x 10 ⁻³	(1-4) x 10 ⁻¹	(1 - 3) x 10 ⁻⁴

El disolvente más utilizado en condiciones subcríticas es el agua, su T_c es 374,1 °C y su P_c es 3160 psi; se habla de agua subcrítica o agua caliente presurizada (PHW). Se utiliza entre 100° y 374,1 °C, con presiones suficientes para mantenerla en estado líquido. El disolvente más utilizado para la extracción con fluido supercrítico es el CO₂ debido principalmente a que sus condiciones críticas son fáciles de alcanzar; su temperatura crítica es de solo 31,0 °C, mientras su presión crítica es de 1060 psi. En la figura 2.3.1 se muestra un diagrama de fases hipotético del agua donde se distingue el punto triple, el

punto crítico y las zonas correspondientes a agua subcrítica y supercrítica (Kronholm, 2002).

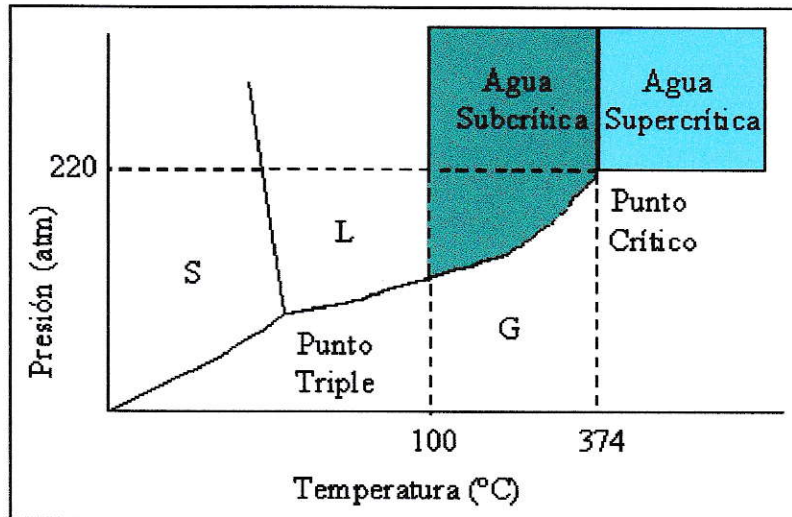


Figura 2.3.2. Diagrama de fases hipotético del agua.

El CO₂ es un disolvente apolar, por lo que disuelve analitos apolares, para lograr extracciones de compuestos mas polares se agrega un cosolvente que modifica la polaridad del fluido. En cambio el agua en condiciones atmosféricas es un disolvente polar, que disuelve solutos polares e iónicos. A medida que se aumenta la temperatura del agua, a una presión alta, las características de este disolvente comienzan a cambiar, su constante dieléctrica baja y comienza a solubilizar analitos de menor polaridad. Estas técnicas no son excluyentes, si no más bien complementarias, ya que algunas extracciones son mucho más eficientes en agua subcrítica y otras en CO₂ supercrítico solo o modificado. A esto se suma el hecho de que el agua es de bajísimo costo y de mayor facilidad de adquisición y almacenaje. Dada estas características, no solo se ha

utilizado con fines de determinar concentración de contaminantes, sino que también se está utilizando en la limpieza de terrenos contaminados.

Con CO₂ supercrítico la extracción de alcanos, hidrocarburos policíclicos aromáticos, bifenilos policlorados es de moderada a excelente. Esto se debe a que el CO₂ extrae analitos menos polares debido a su naturaleza apolar. En cambio el agua subcrítica parte como un disolvente muy polar y llega a ser menos polar en la medida que la temperatura aumenta, hasta que su polaridad (en términos de su constante dieléctrica ϵ) llega a ser similar al metanol o acetonitrilo a ≈ 200 °C. La constante dieléctrica del agua es 80 a temperatura ambiente y gradualmente baja a 27 a 250 °C. Analitos como los hidrocarburos policíclicos aromáticos requieren de temperaturas de por lo menos 250 a 300 °C para ser solubilizados en agua subcrítica. La presión tiene pequeño efecto mientras el agua permanezca en estado líquido. El agua en condiciones atmosféricas se caracteriza por tener una alta tensión superficial y viscosidad, en condiciones subcríticas estas dos propiedades disminuyen notoriamente. El agua subcrítica ha sido menos utilizada que el CO₂ supercrítico, debido a que las investigaciones son más recientes, pero considerando la amplia gama de variabilidad de ϵ desde 80 a 20 comparada con la del CO₂ supercrítico desde ≈ 1 a 2 su potencial parece ser mucho mayor.

Con respecto a la extracción de compuestos organometálicos, se ha revisado la bibliografía y sólo se han encontrado extracciones con CO₂ supercrítico modificado al 5 % con metanol. López (López y col, 1997) extrajo compuestos organomercuriales y

organoestáñicos desde muestras de suelo y sedimentos realizando complejación “in situ” con dietilditiocarbamato de dietilamonio. En muestras contaminadas artificialmente, y en material de referencia certificado las especies di y trialquilestaño fueron extraídas cuantitativamente, sin embargo las monosustituídas se extraen solo en un 20 %. En cambio Cai (Cai y col, 1994) obtuvo bajos resultados en la extracción de dibutilestaño desde muestras reales y rendimientos muy cercanos a la cuantitatividad en la extracción de tributilestaño desde 2 materiales de referencia certificado. Fernández (Fernández y Bayona, 1997) también obtuvo similares resultados al realizar extracciones de compuestos organoestaño. Este autor chequeó la eficiencia de diferentes modificadores (ácido fórmico, ácido clorhídrico en metanol, etc.) del CO₂ supercrítico.

Extracciones de estos compuestos con agua subcrítica no han sido informados.

2.4. Tratamiento de datos.

En este trabajo se utilizó los parámetros que se definen y explicitan a continuación.

Límite de detección

Se define como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente a la señal del blanco o ruido de fondo. Si bien el término significativamente diferente deja un margen amplio en la definición estricta de límite de detección, este se ha utilizado con bastante aceptación como la señal del blanco más tres

veces la desviación estándar del blanco. Esta definición proporciona un valor en función de la señal del blanco y que se puede convertir en unidades de concentración a través de la curva de calibración o en función de la señal de un estándar de concentración conocida como se muestra en la ecuación 2.4.1.

$$LD = \frac{(\bar{A}_{bl} + 3 \cdot \sigma) \cdot C_{cc}}{A_{cc}} \quad (\text{ec. 2.4.1.})$$

donde \bar{A}_{bl} es el área promedio de 10 valores de la señal ruido del blanco, σ es la desviación estándar de estos, A_{cc} y C_{cc} son las áreas y concentraciones, respectivamente, del estándar de concentración más baja de la curva de calibración.

Límite de Cuantificación o Determinación

Es considerado como el límite inferior para medidas cuantitativas precisas.

$$LC = \frac{(\bar{A}_{bl} + 10 \cdot \sigma) \cdot C_{cc}}{A_{cc}} \quad (\text{ec. 2.4.2.})$$

donde \bar{A}_{bl} , σ , A_{cc} y C_{cc} son los mismos parámetros descritos anteriormente en el ítem de límite de detección.

Repetibilidad

La precisión describe la reproducibilidad de los resultados - esto es, el grado de concordancia entre los valores numéricos de dos o más mediciones repetidas, o que se han realizado de la misma forma. Mide el error aleatorio o indeterminado de un análisis. Para describir la precisión se utilizan principalmente tres parámetros: desviación estándar, varianza y coeficiente de variación o desviación estándar relativa (Skoog^a y Leary, 1994). Este último parámetro se utilizan con frecuencia para comparar las precisiones de los resultados que tienen diferentes unidades o magnitudes (Miller y Miller^a, 2002).

Cabe destacar que, si bien la referencia citada (Skoog^a y Leary, 1994) utiliza los términos reproducibilidad y repetibilidad como sinónimos, la otra referencia hace una distinción acorde con los convenios modernos. La repetibilidad se refiere a la precisión del método donde una de una misma persona en el mismo laboratorio con el mismo material y disoluciones y con las mismas condiciones de temperatura, humedad y demás condiciones de laboratorio realiza las mediciones repetidas sucesivamente. En cambio, la reproducibilidad se refiere a la precisión del método, que surgen de la realización de las mediciones por diferentes personas en diferentes condiciones, en diferentes laboratorios y equipamientos.

Por lo tanto, para describir la precisión del método se utilizaron las siguientes expresiones:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (\text{ec. 2.4.3.})$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N-1}} \quad (\text{ec. 2.4.4.})$$

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{N} \quad (\text{ec. 2.4.5})$$

3. OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

3.1.1. Es factible extraer el tributil estaño de sedimentos marinos con agua subcrítica.

3.1.2. Dada la actividad pesquera realizada en el puerto de San Antonio, y su característica de bahía se espera encontrar tributil estaño en sedimentos de la zona intermareal.

3.2. Objetivos Generales

- o Desarrollo de una metodología de extracción de TBT en sedimentos marinos por agua subcrítica y comparación con la metodología convencional de extracción con disolvente.

- o Determinar la presencia de TBT en muestras de sedimentos marinos de la zona intermareal en la caleta del puerto de San Antonio.

3.3. Objetivos Específicos

- o Conocer y usar la metodología de análisis convencional de TBT.
- o Validar las propiedades analíticas del método convencional.
- o Implementar una metodología de extracción de TBT por agua subcrítica en sedimento marino y compararla con el método convencional.
- o Realizar un muestreo de sedimentos de San Antonio y La Boca.
- o Aplicar el método convencional y la extracción con agua subcrítica a muestras de sedimentos del puerto de San Antonio y La Boca.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Materiales

- Columna florisil
- Embudo de separación de 50 mL y 100 mL
- Embudo analítico de vástago corto
- Filtro N°5A
- Jeringas de 50 μ L, 100 μ L, 200 μ L y 500 μ L
- Matraz de fondo redondo de 250 mL
- Matraz de aforo de 10 mL
- Microvial con tapa hermética
- Pipeta total de 1 mL, 2 mL, 10 mL, 20 mL y 30 mL
- Pipetas Pasteur
- Probeta de 10 mL y 100 mL
- Tubo centrífuga de 50 mL.
- Tubo concentrador
- Vial con tapa hermética

4.2. Reactivos

- Estándar de TBT, TBTd₂₇, TeBTd₃₆. (WACO)
- Ácido acético (99,8%, Riedel de Haën)
- Acetato de sodio (JT Baker)
- Tetraetilborato de sodio (WACO y OSAKA)
- Cloruro de sodio (Merck p.a.)
- Sulfato de sodio anhidro (12-60 mesh, JT Baker ultra resi-analysed)
- Acetato de etilo (99,9%, Merck HPLC)
- Hexano (95%, Merck HPLC)
- Acetona (99, 5%, Merck HPLC)
- Éter (99%, JT Baker)
- HCl fumante 37% (Merck p.a.)
- Nitrógeno gaseoso (99,995%, AGA)
- Agua desmineralizada
- Set Pak Cartridges Florisil 6cc, 500 mg (Waters W1060L4)
- Material de Referencia de Sedimento Marino para metales trazas y otros constituyentes de la National Research Council Canada, PACS-2.

4.3. Preparación de disoluciones

4.3.1. Estándares de TBT

Disolución estándar stock ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$): se pesó 10 mg de TBT y se aforó a 100 mL con hexano.

Disolución estándar $10 \mu\text{g mL}^{-1}$: se midió 1 mL de la disolución estándar stock y se aforó a 10 mL con hexano.

Disolución estándar $1 \mu\text{g mL}^{-1}$: se midió 1 mL de la disolución estándar $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ y se aforó a 10 mL con acetona.

Disolución estándar $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$: se midió 0,1 mL de la disolución estándar $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ y se aforó a 10 mL con acetona.

4.3.2. Estándar sustituto

Disolución sustituto stock $100 \mu\text{g mL}^{-1}$: se pesó 10 mg de TBTd_{27} y aforó a 100 mL con hexano.

Disolución sustituto $10 \mu\text{g mL}^{-1}$: se midió 1 mL de la disolución sustituto stock y se aforó a 10 mL con hexano.

Disolución sustituto $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$: se midió 0,1 mL de disolución $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ y se aforó a 10 mL con acetona.

4.3.3. Estándar interno

Disolución estándar interno stock $100 \mu\text{g mL}^{-1}$: se pesó 10 mg de TeBTd₃₆ y se aforó a 100 mL con hexano.

Disolución estándar interno $10 \mu\text{g mL}^{-1}$: se midió 1 mL de la disolución estándar interno stock y se aforó a 10 mL con hexano.

4.3.4. Otras disoluciones

Disolución tampón (pH 5): se mezcló en una razón de 5,9 volúmenes de disolución ácido acético 2 M por 14,1 volúmenes de disolución de acetato de sodio 2 M. Luego se verificó el pH.

Disolución NaBEt₄ al 2% (p/v): se pesó 0,2 g y se aforó a 10 mL con agua desmineralizada.

Disolución NaCl al 3% (p/v): se pesó 3 g y se aforó a 100 mL con agua desmineralizada.

Disolución de 1 mol L⁻¹ HCl en metanol: se mezcló en una razón de 1 volumen de HCl concentrado por 11 volúmenes de metanol.

Disolución 1 mol L⁻¹ HCl-metanol en acetato de etilo: se mezcló en una razón de 1 volumen de HCl-metanol por 1 volumen de acetato de etilo.

Disolución éter en hexano 5% (v/v): se midió 5 mL de éter y se aforó a 100 mL con hexano.

4.4. Aparatos e Instrumentos

Todas las disoluciones acuosas fueron preparadas con agua desmineralizada obtenidas por el desmineralizador Barnstead D4742 y para pesar el reactivo correspondiente se utilizó una balanza Mettler Toledo PB 1502. Las muestras fueron concentradas con el rotaevaporador Büchi Rotavapor R-205 acoplado a un baño Büchi Heating Bath B-490 y un refrigerante: Neslab RTE – 111. Para agitar las muestras se utilizó un agitador Taitec recipro agitador SR-2W y para centrifugar se utilizó una centrifuga Beckman GS-15. Finalmente los análisis fueron realizados en un cromatógrafo de gases HP6890 con la ayuda de una columna HP5MS acoplado a un detector de masa HP 5973 Mass Selective Detective.

4.5. Procedimiento

4.5.1. Procedimiento de análisis por método convencional

La metodología “Determinación de compuestos organoestañosos en muestras de agua y sedimento por dilución isotópica GC-MS” de Iwamura y Kadokami del Instituto Kitakyusyu, Japón se describe con detalle y es considerada como metodología convencional en este trabajo.

Los materiales de vidrio se lavaron con agua potable y detergente. Luego con 1 mol L^{-1} HCl-metanol, después con agua desmineralizada y finalmente con acetona.

Se pesó 2 g de una muestra de sedimento homogeneizado y se transfirió a un tubo centrífuga de 50 mL.

Se adicionó 0,1 mL de disolución de sustituto $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, 10 mL de disolución 1 mol L^{-1} HCl-metanol/acetato de etilo (1:1) y se agitó por 20 min en el agitador.

Enseguida se centrifugó (2500 rpm, 20 min) la muestra, y el sobrenadante se retiró con una pipeta Pasteur y se transfirió a un balón de fondo redondo.

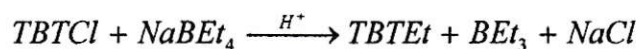
Este procedimiento de extracción se repitió 3 veces.

El sobrenadante se filtró con un filtro N°5A y se transfirió el filtrado a un matraz de fondo de redondo de 250 mL. Se lavó el residuo del filtro con 5 mL de la disolución de 1 mol L^{-1} HCl-metanol/acetato de etilo (1:1).

Enseguida se concentró el extracto de la muestra a alrededor de 10 mL en un rotaevaporador y luego se concentró a alrededor de 2 mL con nitrógeno gaseoso.

Luego se adicionó 20 mL de tampón y 2 mL de disolución NaBEt₄ 2% y se homogenizó.

La muestra se transfirió a un embudo de separación de 50 mL y se agitó por 10 min. Este procedimiento comprende la reacción de derivatización donde se etila el TBT transformándolo en una especie volátil para su posterior análisis por cromatografía de gases. La reacción se muestra a continuación:



El matraz de fondo redondo se lavó con 5 mL de hexano y se transfirió a un embudo de separación y se agitó por 10 min. Se colectó la fase orgánica y la fase acuosa se devolvió al embudo y luego se adicionó 5 mL de hexano al embudo y se agitó por 10 min. En seguida se colectó la fase orgánica junto con la porción anterior incluyendo la emulsión que se formó y se secó pasando la muestra por Na₂SO₄ dispuesto en un embudo analítico. Luego se adicionó 5 g de cobre para eliminar las interferencias aniónicas. Si se produce cambio de color en el cobre se agregó otra porción de cobre reducido. Por último, la muestra se concentró a 1 mL con nitrógeno gaseoso.

En la figura 4.5.1.1 se muestra un resumen del procedimiento analítico para la determinación de TBT en muestras de sedimento por el método convencional.

Clean-up

Se acondicionó una columna de florisil con 10 mL de hexano. Luego se inyectó la muestra concentrada y se colectó la muestra eluida. Se adicionó 6 mL de una disolución éter-hexano colectando la solución eluida. Se juntó ambas porciones eluidas y se concentró con cuidado a 0,2 mL. Con una pipeta Pasteur se transfirió la muestra a un microvial adicionando además 20 μL de la disolución estándar interno $1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Curva de Calibración

La curva de calibración se construyó utilizando seis puntos (estándares) además de un blanco.

En cada embudo de separación de 100 mL se adicionó 30 mL de disolución NaCl 3% y la alícuota de disolución estándar correspondiente.

Estas alícuotas fueron de 100 μL , 200 μL y 500 μL de la disolución estándar $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y de 100 μL , 200 μL y 500 μL de la disolución estándar $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Luego, en cada embudo, se adicionó 0,5 mL de disolución sustituto $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, 1 mL de tampón, 0,5 mL de NaBEt₄ 2% y se agitó por 10 min. Enseguida se adicionó 3 mL de hexano y se agitó por 10 min. Se colectó la fase orgánica en otro embudo de separación de 50 mL y la fase acuosa se retornó al embudo de separación de 100 mL. Este procedimiento se repitió 3 veces. La totalidad de la fase orgánica se secó pasándola por Na₂SO₄ anhidro. La muestra se colectó en un matraz de aforo de 10 mL y se aforó con

hexano. Finalmente se adicionó 0,1 mL de disolución estándar interno (TeBTd36) 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Una alícuota de esta última fue transferida a un vial.

Condiciones de Análisis

Condiciones para llevar a cabo la cromatografía gaseosa.

Columna: HP5MS

Temperatura: 60°C (min) – 20°C min^{-1} a 130°C – 10°C min^{-1} a 210°C – 5°C min^{-1} a 260°C – 10°C min^{-1} a 300°C – 300°C (2min).

Temperatura de inyección: 290°C.

Caudal gas carrier: 1 mL min^{-1} de He (modo constante)

Modo de inyección: splitless.

Iones monitoreados se muestran en la tabla 4.5.1.1.

Tabla 4.5.1.1. Masas y tiempos de retención para iones monitoreados.

Especie	Ion monitoreado		Tiempo de Retención (min)
	Identificar	Cuantificar	
TBT	261,0	263	10,19
TBT d27 (SS)	316,0	318	10,00
TeBT d36 (SI)	316,0	318	11,40

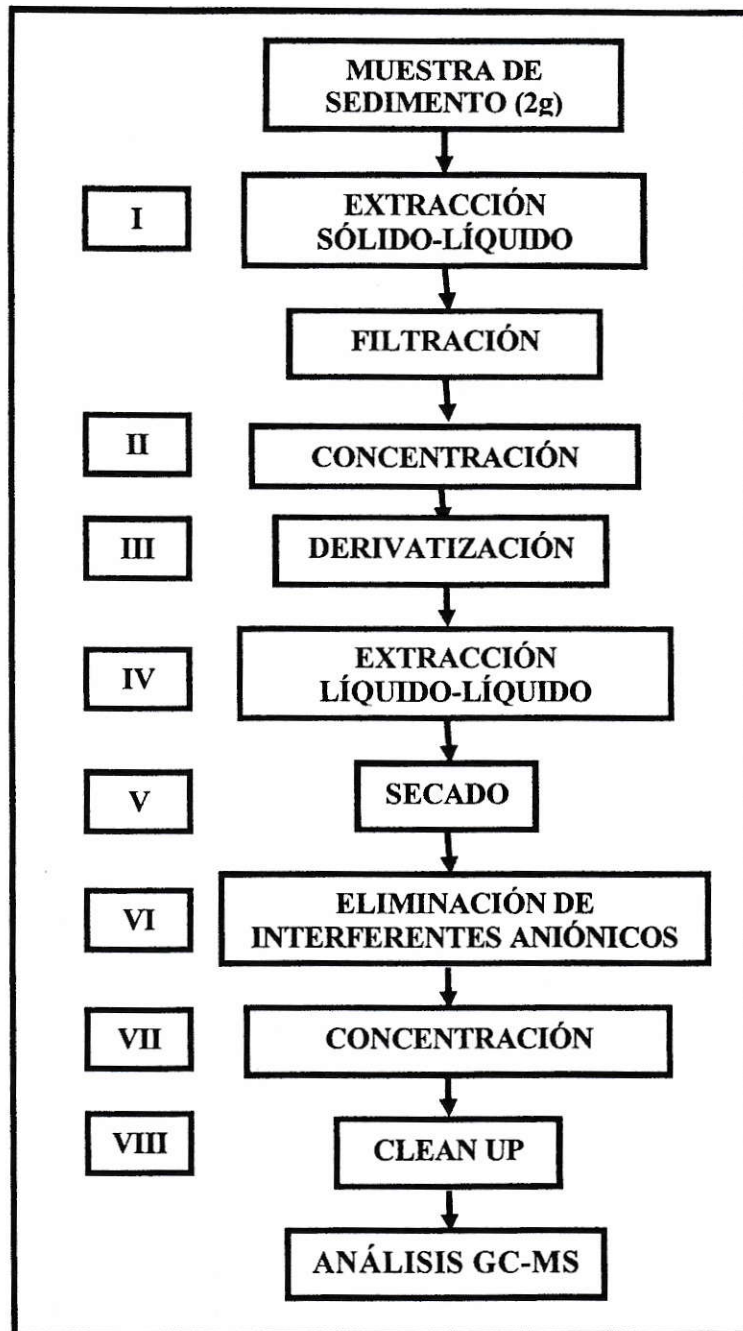


Figura 4.5.1.1. Resumen del procedimiento analítico para la determinación de TBT en muestras de sedimento por el método convencional. I) con HCl/MeOH/AcEt, II) y VII) con rotaevaporador, III) con NaBEt₄, IV) con hexano, V) con Na₂SO₄, VI) Cu reducido, VIII) con columna florisil.

Condiciones para llevar a cabo la detección por espectrometría de masa.

Interfase: 280°C

Fuente de iones: 230°C

Energía de ionización: 70 eV.

4.5.2. Procedimiento de extracción de TBT por agua subcrítica, metodología propuesta.

El procedimiento de preparación de muestras para la determinación de TBT consta de 3 etapas básicamente.

- (i) extracción sólido-líquido para extraer el analito desde la matriz a la fase acuosa
- (ii) formación de derivados volátiles o derivatización
- (iii) extracción líquido-líquido para pasar el analito de la fase acuosa a la fase orgánica

Los análisis de los extractos con agua subcríticos fueron realizados por el método convencional cambiando la primera etapa de extracción como se puede apreciar en las figuras 4.5.1.1.y 4.5.2.1.

Se utilizó un sistema que consta de:

- o bomba recíproca serie II Isocratic HPLC Pump
- o horno de aluminio
- o precalentador: precolumna y 2 m de tubo de acero inoxidable SS-316, 1/16"
- o celda de extracción: columna de HPLC sin relleno, 3,9 x 150 mm
- o columna de enfriamiento: 2 m de tubo de acero inoxidable SS-316, 1/16"
- o manómetro
- o válvula

Funcionamiento de sistema subcrítico y optimización de variables asociadas

El disolvente de extracción utilizado pasa por la bomba la cual entrega energía cinética al fluido. Luego ingresa al horno de aluminio, que se encuentra a la temperatura deseada, pasa por el precalentador y entra a la celda de extracción donde se inserta previamente la muestra. A la salida de la celda de extracción se encuentra la columna de enfriamiento y la válvula. La válvula permite regular la presión interna del sistema, una vez encendida la bomba y mantenerla fija una vez apagada. Por lo tanto, si la bomba se apaga y se cierra la válvula toda la extracción es considerada estática. Consecuentemente, al mantener encendida la bomba con la válvula abierta, la extracción es dinámica. De este modo, se puede fijar la duración de cada tipo de extracción.

Una vez finalizada la extracción, la muestra se recolecta y se almacena en un frasco de vidrio ámbar que se encuentra al final del tubo de acero para su posterior análisis. El sistema de extracción por fluido subcrítico se muestra en la figura 4.5.2.2.

Para determinar la factibilidad de implementación de una metodología de extracción de TBT por fluido subcrítico, se estudió la temperatura de extracción en el intervalo 50 a 300 °C.

Para la optimización de esta variable de extracción se utilizó un material de referencia de sedimento marino para metales trazas y otros constituyentes de la National Research Council Canada, PACS-2. La composición de este material de referencia se detalla en la tabla 4.5.2.1. Este sedimento es de color gris y de textura limosa-arcillosa.

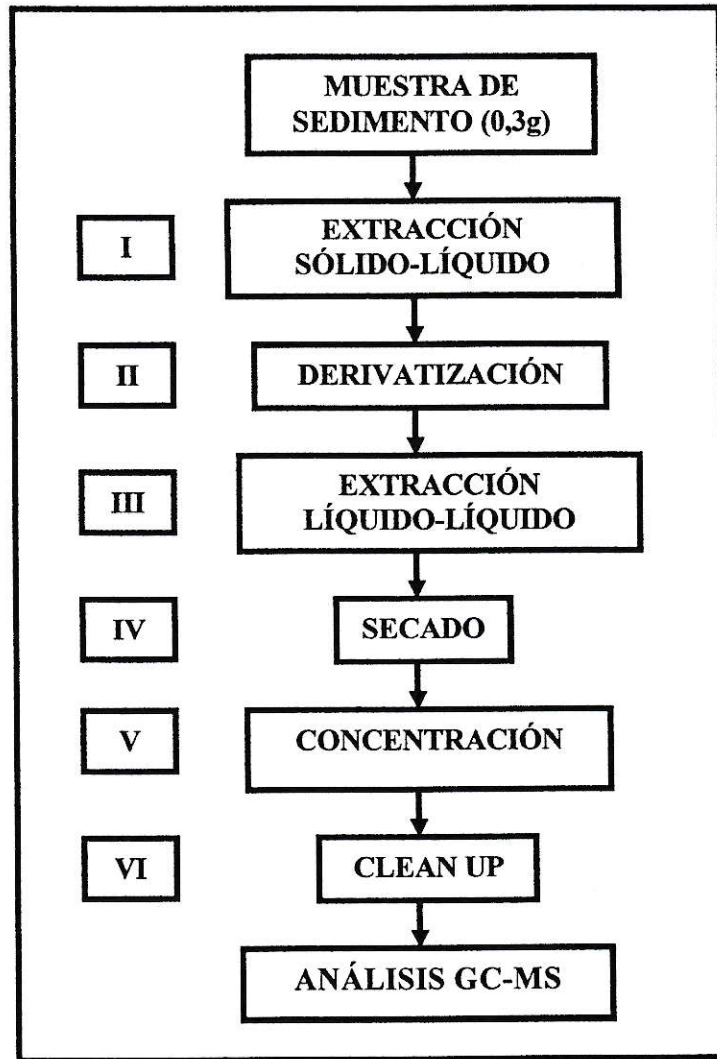


Figura 4.5.2.1. Resumen del procedimiento analítico para la determinación de TBT en muestras de sedimento por el método propuesto. I) con agua subcrítica, II) con NaBEt₄, III) con hexano, IV) con Na₂SO₄, V) con rotaevaporador, VI) con columna florisil.

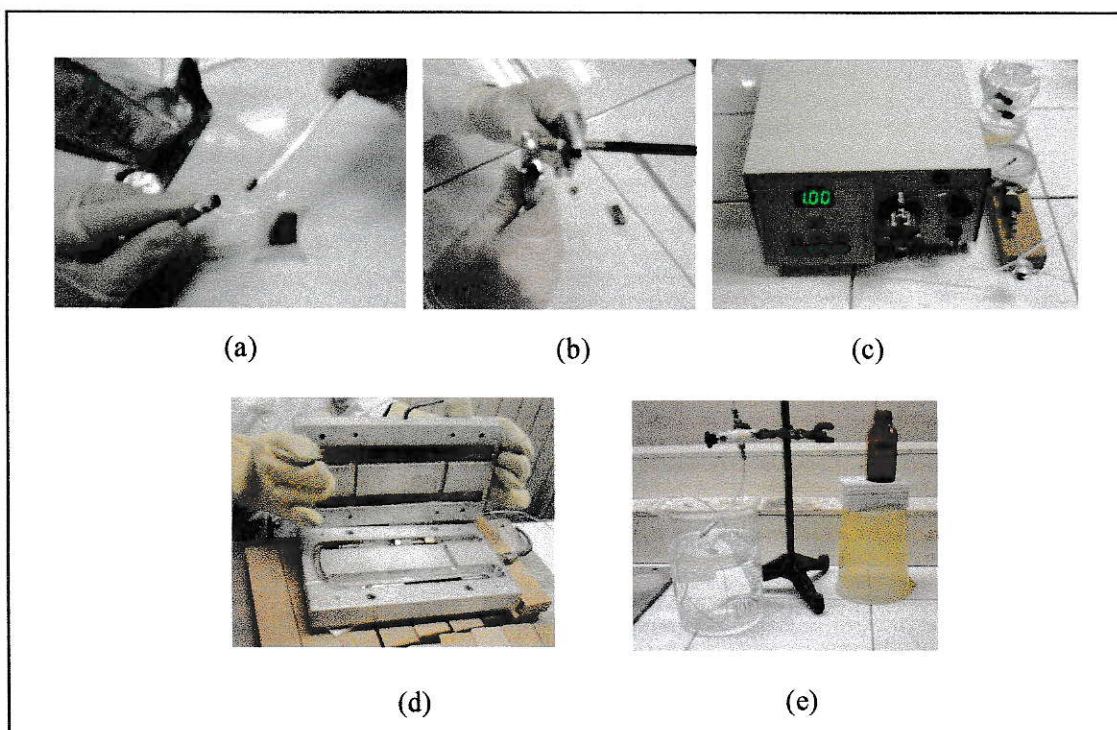


Figura 4.5.2.2. Sistema de extracción por fluido subcrítico. (a) inserción de muestra de sedimento en la celda de extracción, (b) sello de columna, (c) bomba HPLC y manómetro, (d) horno con columna de precalentamiento y celda de extracción en su interior, (e) columna de refrigeración y colección de la muestra extraída.

Tabla 4.5.2.1. Composición del material de referencia de sedimento marino para metales trazas y otros constituyentes de la National Research Council Canada, PACS-2 (valores certificados).

Especie	Cantidad (mg/Kg)
Antimonio, Sb	11,3 ± 2,6
Arsénico, As	26,2 ± 1,5
Berilio, Be	1,0 ± 0,2
Cadmio, Cd	2,11 ± 0,15
Cromo, Cr	90,7 ± 4,6
Cobalto, Co	11,5 ± 0,3
Cobre, Cu	310 ± 12
Plomo, Pb	183 ± 8
Litio, Li	32,2 ± 2,0
Manganeso, Mn	440 ± 19
Mercurio, Hg	3,04 ± 2,20
Molibdeno, Mo	5,43 ± 0,28
Níquel, Ni	39,5 ± 2,3
Selenio, Se	0,92 ± 0,22
Estroncio, Sr	1,22 ± 0,14
Talio, Ta	0,6 (valor informado)
Estaño, Sn	19,8 ± 2,5
Uranio,	0,3 (valor informado)
Vanadio, Va	133 ± 5
Zinc, Zn	364 ± 23
Tributil estaño, TBT (como estaño)	0,98 ± 0,13
Dibutil estaño, DBT (como estaño)	1,09 ± 0,15
Monobutil estaño, MBT (como estaño)	0,3 (valor informado)

4.5.3. Colección de muestras reales

La toma de muestra de sedimentos marinos se realizó en la caleta del puerto de San Antonio y en playa de La Boca, como se muestra en la figura 4.5.3.1. El puerto de San Antonio consideró como una zona contaminada por TBT y la playa de La Boca, en cambio, se consideró como un posible blanco. Debido a la inestabilidad del compuesto en el agua (Waldock, 1994), éste no podría ser transportado como tal desde el Lago Rapel donde circulan pequeñas embarcaciones, hasta la localidad de La Boca.

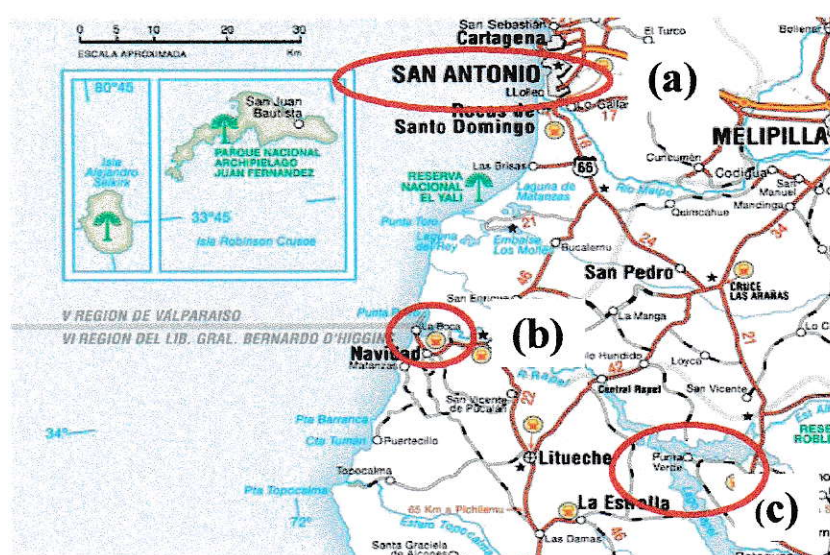


Figura 4.5.3.1. Mapa de la V y VI Región de Chile.

(A) San Antonio, (B) La Boca y (C) Lago Rapel.

Las muestras fueron recogidas el día 25/11/2003 en la zona intermareal y en condiciones de marea alta, nubosidad total, vientos hacia el continente oeste (hacia el continente) y temperaturas de 14°C. Las coordenadas fueron para la playa de San Antonio 33°34'86'' y las coordenadas de La Boca fue de 33°57'95''S/71°52'95''W.

Se tomaron dos muestras de sedimento cercanas entre ellas. Para la toma de muestra de sedimento se descartaron los primeros 10 cm del perfil, debido a que el TBT se puede descomponer por infiltración de la radiación solar. Los siguientes 10 cm se obtuvieron con un tubo core y se conservaron en un frasco de vidrio ámbar sellado. Se conservaron a 4°C hasta llegar al laboratorio donde fueron congelados a -20°C hasta el análisis. El muestreo se ilustra en la figura 4.5.3.2.

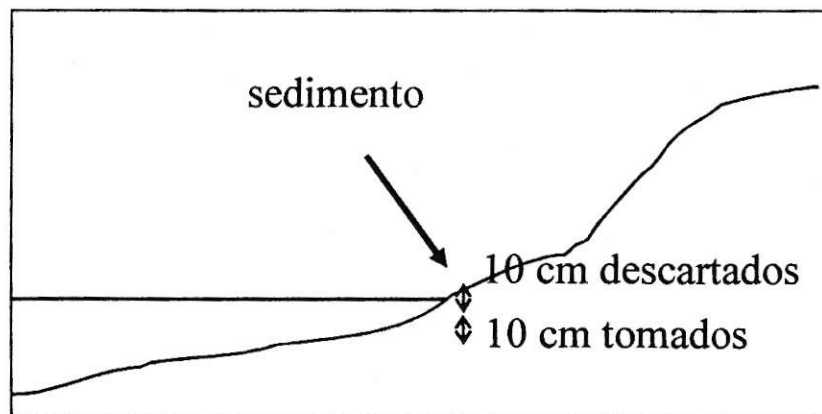


Figura 4.5.3.2. Esquema de toma de muestra.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Determinación de TBT por cromatografía de gases con detección por masas

La metodología analítica para determinar TBT se basa en la técnica de cromatografía de gases por detección de masa (GC-MS). La figura 5.1.1 muestra el cromatograma obtenido en modalidad *SCAN* de un estándar que contiene $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de TBT, $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de estándar interno (TBTd36) y $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de estándar sustituto (TBTd27). Como se puede apreciar el tiempo de retención para TBT es de 9,97 min. Los compuestos TBTd27 ($t_R = 9,79 \text{ min}$) y TBTd36 ($t_R = 11,19 \text{ min}$), son utilizados como estándares sustitutos e internos, respectivamente.

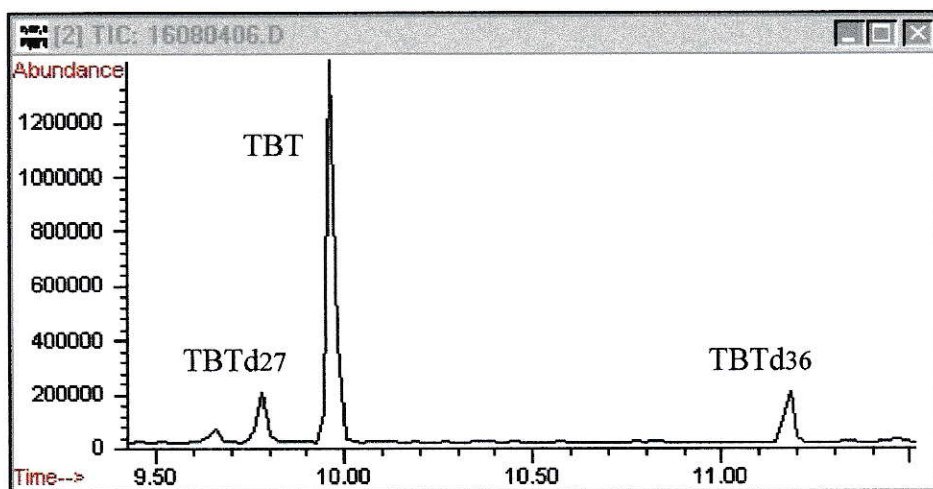


Figura 5.1.1. Cromatograma en modalidad *SCAN* de un estándar de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de TBT además de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de estándar interno y sustituto.

Cabe señalar la función de los estándares utilizados. El estándar interno tiene como finalidad corregir posibles corrimientos en los tiempos de retención de las señales cromatográfica, en cambio el estándar sustituto tiene la finalidad de corregir pérdidas producidas durante la etapa de derivatización.

A partir del cromatograma obtenido en modalidad *SCAN* es posible obtener el espectro de masas del analito de interés TBTEt, el que se muestra en la figura 5.1.2. La fragmentación de esta molécula se muestra en la tabla 5.1.1 donde se puede relacionar la pérdida alternada de butilo y etilo formando especies reconocidas en el espectro de masa. El pico base se encuentra a m/z de 207 presentando la mayor sensibilidad. Sin embargo esta masa es muy poco selectiva ya que es característica de aceites de silicona y del sangrado de columnas capilares. El ión 263 es más específico del TBT ya que se produce una fragmentación donde la molécula de TBT sólo pierde un butilo.

Por lo tanto se eligió el ión 261 para identificar y el ión 263 para cuantificar el TBT ya que permite la correcta identificación del compuesto, sin confundirlo con otros compuestos existentes en las complejas matrices reales.

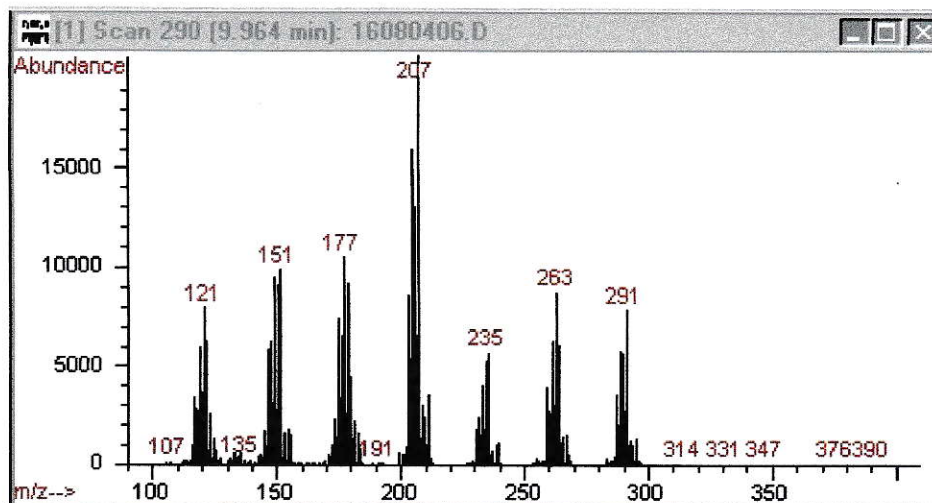


Figura 5.1.2. Espectro de masa de un estándar de 0,5 mg L⁻¹ de TBT.

Tabla 5.1.1. Fragmentación de la molécula de TBTEt (319g mol⁻¹).

Especie	Masa/Carga
(But) ₃ Sn ⁺	290
(But) ₂ SnEt ⁺	263
(But) ₂ Sn H ⁺	234
ButSnEt ⁺	206
ButSnH ₂ ⁺	178
SnH ₃ ⁺	122

5.2. Validación de los parámetros analíticos

Una vez definidas las condiciones de análisis del detector de masas, se procedió a validar los parámetros analíticos de la metodología convencional de extracción de TBT. Para ello se realizó una curva de calibración con estándares de TBT en un rango de concentración desde 1 hasta 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La curva de calibración se construye graficando en el eje x “concentración de TBT en el estándar /concentración del estándar interno” y en el eje y “área de TBT en el estándar/área del estándar interno”. Los datos de la construcción de la curva de calibración se muestran en la tabla 5.2.1 y la curva de calibración de muestra en la figura 5.2.1.

Tabla 5.2.1. Construcción curva de calibración.

C TBT (ng/mL)	C SI (ng/mL)	C SS (ng/mL)	A TBT	A SI	A SS	CTBT / CSI	ATBT / ASI
1	100	100	224	25868	3427	0,01	0,00866
2	100	100	340	22853	4361	0,02	0,0149
5	100	100	665	22773	4101	0,05	0,0292
10	100	100	1359	25117	3238	0,1	0,0541
20	100	100	2784	26676	4954	0,2	0,104
50	100	100	7565	32456	5023	0,5	0,233

C: concentración, A: área, TBT: tributil estaño, SI: estándar interno, SS: estándar sustituto.

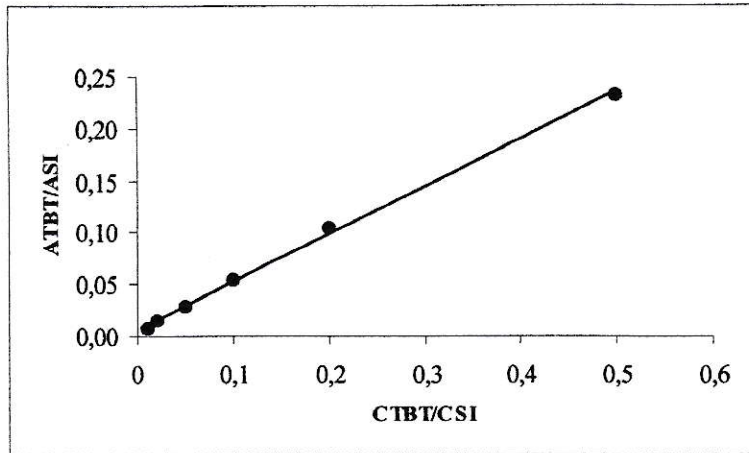


Figura 5.2.1. Curva de calibración de TBT .

La regresión lineal obtenida entrega la siguiente curva:

$$\frac{ATBT}{ASI} = 0.4571 \frac{CTBT}{CSI} + 0.007 \quad (\text{ec. 5.2.1})$$

$$R^2 = 0,9985$$

A partir de esta curva de calibración se calcularon los parámetros analíticos utilizando las expresiones que se citan en el capítulo 2 “Marco Teórico”. Si comparamos los parámetros analíticos con los obtenidos por Egushi el año 2001, podemos observar que no presentan mayor diferencia, como se muestra en la tabla 5.2.2 y 5.2.3.

Tabla 5.2.2. Parámetros analíticos obtenidos en la validación del método (2004).

Propiedades Analíticas	En solución líquida (ng mL⁻¹)	Sedimento (ng g⁻¹)
L. Detección	0,57	0,11*
L. Cuantificación	1,3	0,27*
RSD (%) (conc)	9,8 (50 g mg ⁻¹)	9,8 (1,98 ng mg ⁻¹)

*considerando 2 g de sedimento y aforando a 10 mL como volumen final.

Tabla 5.2.3. Propiedades analíticas del método convencional de extracción de TBT realizado por CENMA (Egushi y col, 2001).

Propiedades Analíticas	Agua (ng mL⁻¹)	Sedimento (ng g⁻¹)
L. Detección	0,31	0,092
L. Cuantificación	1,03	0,307
RSD (%) (conc)	5,0 (2,0)	14,4 (1,0)

5.3. Desarrollo de un método analítico de extracción de TBT de sedimento marino por fluido subcrítico

La idea de utilizar el fluido subcrítico busca reemplazar la primera etapa del proceso de extracción por disolvente del método convencional por extracción por agua subcrítica del método propuesto. El fundamento de la extracción por agua subcrítica consiste que en condiciones subcríticas es posible cambiar algunas propiedades del agua entre ellas la polarizabilidad de las moléculas de agua haciéndola menos polar (Kronholm, 2002) y, por lo tanto, más afin con moléculas como el TBT. Además, el agua en condiciones subcríticas, presenta cambios en otras propiedades como la viscosidad que es un orden de magnitud mas bajo que los líquidos, el coeficiente de difusividad de los solutos en ellos son un orden de magnitud más altas que en los líquidos y finalmente la densidad se mantienen dentro del mismo orden de magnitud.

Las principales etapas de cada método se resumen en:

Método convencional

- 1) Proceso de Extracción por Disolvente
- 2) Derivatización
- 3) Análisis GC-MS

Método propuesto

- 1) Proceso de Extracción por Fluido Subcrítico
- 2) Derivatización
- 3) Análisis por GC-MS

Tanto la etapa de extracción por disolvente como la derivatización constituyen etapas previas al análisis y que en su totalidad acarrearán muchos errores además de ser lento y engorroso (como se puede ver en la parte experimental).

En el estudio de la factibilidad de desarrollar este método se deben estudiar las siguientes variables: temperatura, tiempo de extracción dinámico, tiempo de extracción estático, masa de sedimento utilizada y caudal de la bomba. La principal variable a estudiar es la temperatura ya que es la que otorga la energía suficiente para poder extraer el analito de la matriz que está fuertemente entrelazado.

Durante el tiempo de análisis fue posible realizar el estudio de la temperatura. Los resultados se encuentran en la tabla 5.3.1.

Tabla 5.3.1. Estudio de la temperatura, n=3 (tiempo de extracción estático: 30 min, tiempo de extracción dinámico: 30 min, caudal del agua: 1 mL min⁻¹, masa de sedimento: 0,300 g).

Temperatura de Extracción (°C)	Recuperación (%)
20	3,3 ± 0,30
50	10,0 ± 0,91
250	17,6 ± 1,61
300	82,0 ± 7,50

Los resultados obtenidos del estudio de la temperatura demuestran una dependencia entre la eficiencia de extracción y la temperatura. Se puede observar que a mayor temperatura mayor es el porcentaje de extracción de TBT. La mayor eficiencia se logró en condiciones de muy altas temperaturas (300°C) con 30 minutos de extracción dinámico y 30 minutos de extracción estático. Estas condiciones no son mejores que el procedimiento convencional donde demora 60 minutos en total durante las tres (3) extracciones de 20 minutos con la disolución 1 mol L⁻¹ HCl-MeOH/AcEt. Además hay que considerar el tiempo de calentamiento del horno que puede llegar a ser de 2 horas para alcanzar la temperatura de 300°C. Por otra parte el material que se encuentra dentro del horno presenta fatiga por la alteración del revestimiento de estos a la temperatura de 300°C.

Dado los problemas de fatiga que presentó el material, no es posible continuar con el estudio a esa temperatura y, por lo tanto, es necesario disminuir obligatoriamente la temperatura de extracción.

Se podría pensar que una variación en la presión podría ser una solución. Sin embargo, como se puede observar en la figura 2.2.1, la constante dieléctrica no cambia mayormente dentro de un gran rango de presión de 100 y 230 bar (equivalentes a 1451 psi y 3338 psi respectivamente) hasta los 300°C. Ya que la constante dieléctrica es la propiedad del agua que más cambia en condiciones subcríticas y que influye en mayor medida en la disolución de compuestos menos polares, se puede decir que un cambio en la presión no mejoraría la eficiencia de extracción.

Si bien no se ha logrado disminuir el tiempo de extracción, cabe considerar que el uso de agua subcrítica como fluido de extracción resulta ser menos tóxico tanto para el operador como para el medioambiente dado que las cantidades y los volúmenes de residuos son considerablemente menores. La estimación de los residuos se muestra en la tabla 5.3.2.

También es relevante mencionar que la metodología fue optimizada con un material de referencia que consiste en un sedimento contaminado y posteriormente certificado, el cual tiene un contenido de metales trazas considerable, como se puede observar en la tabla 4.5.2.1, lo que permite que demuestra que la metodología puede ser aplicada a muestras reales sin presentar problemas de interferencias.

Tabla 5.3.2. Estimación de residuos generados en la etapa de extracción sólido-líquido, según metodología utilizada.

Tipo de Residuo	Método Convencional	Método Subcrítico
Sólido	2 g de sedimento	0,3 g de sedimento
Líquido	35 mL HCl/MeOH/AcEt	215 mL de agua

Si bien no fue posible mejorar el tiempo de análisis utilizando agua subcrítica en lugar de la extracción por disolvente de la metodología convencional, se propone mejorar la extracción modificando el agua con mezclas de disolventes o con el uso de detergentes.

Sin embargo, este estudio requiere de un tiempo considerable por este motivo no ha sido considerado en este trabajo.

5.4. Colección de Muestras Reales

Un estudio previo realizado en el puerto de San Antonio (Egushi y col, 2001) encontró TBT en agua sedimento y biota. Las concentraciones de TBT encontradas en los sedimentos del puerto de San Antonio se muestran en la tabla 5.4.1 mientras que los puntos de muestreo se indican en la figura 5.4.1.

Tabla 5.4.1. Concentración de TBT encontrados en sedimentos del puerto de San Antonio el año 1998.

Leyenda	Punto de Muestreo	Concentración en Sedimento (ng/g)
SS2	Desembocadura	0,4
SS1	Molo	28,8
S4	Camanchaca (sur pesquera)	8,6
SA	Muelle Molino	82,2
SB	Poza	*

* no se tomó muestra de sedimento, 90 m de profundidad.

Se puede observar que la zona de mayor impacto se encuentra en el Muelle Molino la cual tiene una profundidad de disco Secchi de 2,3 m y una profundidad total de 9 m.

Estas condiciones de baja infiltración de la radiación solar, sumado al bajo recambio de aguas, disminuiría la redisolución del TBT, explicando de esta forma su alta concentración.

El segundo sector más contaminado corresponde al Molo que se caracteriza por su alto tráfico de embarcaciones de gran envergadura constituyendo una zona de directo impacto por el TBT lixiviado de las carcasas de los barcos.

El sector de Camanchaca que se encuentra al sur de una pesquera se encuentra constantemente abatido por la descarga de residuos sólidos y líquidos propios de la faena de la harina de pescado. Por lo tanto es una zona eutroficada donde la zona predominante anaeróbica formada facilita la acumulación del TBT.

Por los valores encontrados en la Desembocadura se puede deducir que a mar abierto existe una facilidad para la descomposición del TBT debido al mayor recambio de aguas facilitando la redisolución del TBT para su posterior degradación.

Finalmente, no fue posible tomar una muestra en el sector de la Poza dada la gran profundidad de 90 m.

A raíz de estos antecedentes, y con el propósito de complementar el estudio precedente, en este trabajo se decidió la presencia de TBT en el sector de la caleta del puerto de San Antonio a nivel intermareal, y además medir su concentración en un punto alejado del puerto, hacia el sur, en el sector La Boca (VI Región).

Se decidió tomar muestras en estos puntos, debido a que en el primer caso, la caleta del puerto esta muy cercana al punto de mayor concentración encontrado (Muelle Molino) y

por otra parte, es posible estimar la capacidad de degradación del TBT en la zona intermareal. El segundo punto seleccionado en el sector de la Boca, se podría considerar como una zona blanco al no estar impactada directamente por el tráfico portuario.

Así, se colectaron muestras de sedimento en la zona intermareal de la caleta de San Antonio y en la playa La Boca. Ambas muestras presentaban tamaños de partículas de arena y grava.

5.5. Análisis de muestras reales por método convencional

Los resultados obtenidos del análisis de las muestras de TBT en la caleta del puerto de San Antonio y La Boca se encontraron por debajo del límite de detección del método, tal como se muestra en la tabla 5.5.1. Esto indica que a pesar que había sido detectada la presencia de TBT en el puerto de San Antonio, tanto en agua como en sedimentos (Egushi y col, 2001), y el problema de imposex en moluscos de la zona (Huaquín^b, 2004), la contaminación por este compuesto podría ser por ahora de carácter puntual en términos temporales.

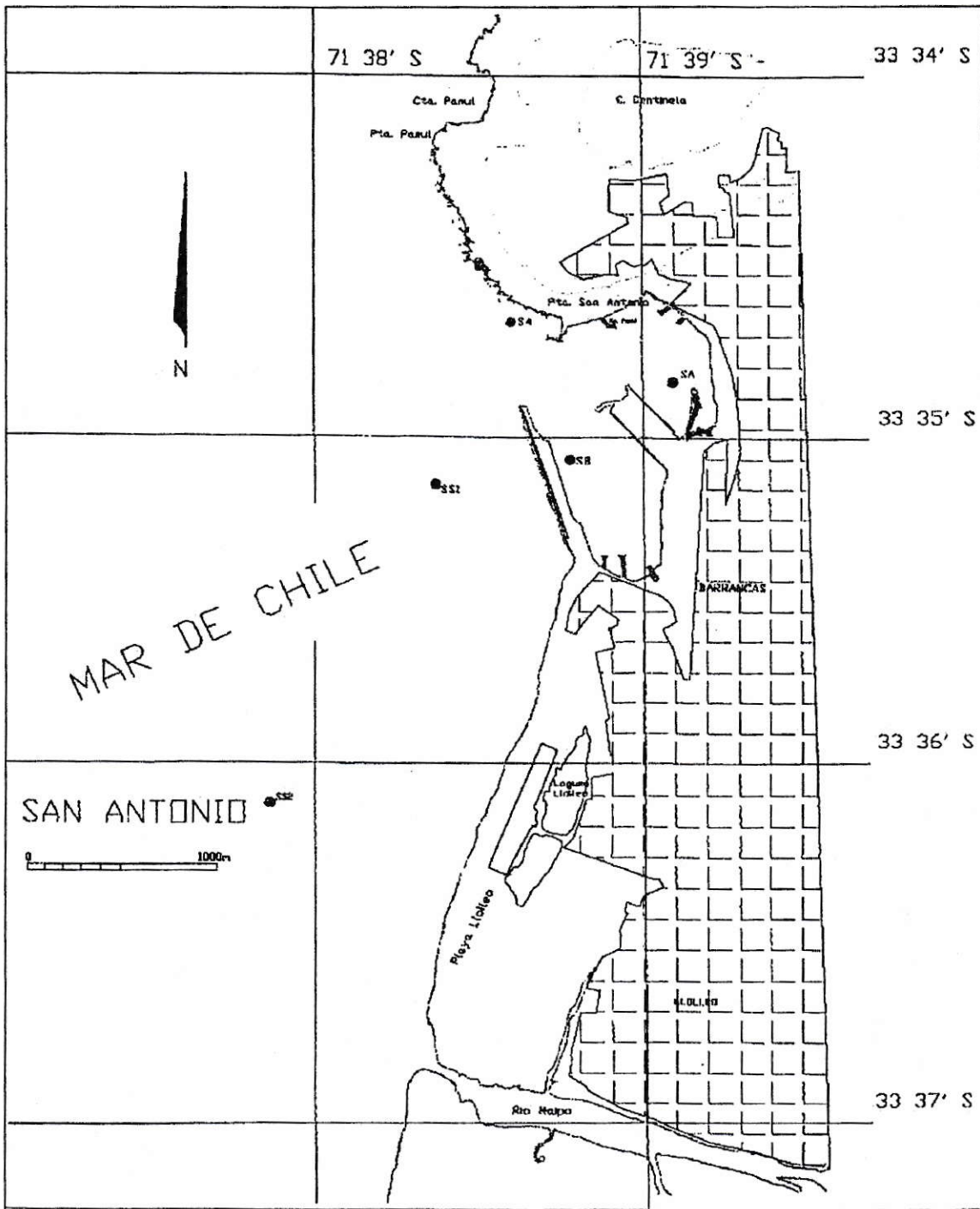


Figura 5.4.1. Puntos del muestreo del puerto de San Antonio (1998).

Es posible que en un sedimento de fracción gruesa el TBT no quede retenido en la estructura y pase a horizontes más profundos ya sea solubilizado en el agua, o bien se arrastre como precipitado o, por otra parte, es posible que la zona intermareal tenga una alta tasa de degradación por los continuos cambios de contenido de agua y aire en la fracción porosa sumado a la infiltración de la radiación solar, y efectivamente el TBT no se acumula en la zona intermareal. Para confirmar estos resultados se sugiere realizar un muestreo adicional donde se puedan tomar muestras de sedimentos anóxicos y en zona oscura, cercanas a la zona intermareal, ya que en estas condiciones el TBT se puede estabilizar y acumular por años (Dowson y col, 1996; Waldock, 1994). También se pueden realizar estudios de los cambios en las concentraciones de TBT por variaciones estacionales, mensuales o diarias que den cuenta de la variable temporal, ya que por cambios en la cantidad de radiación infiltrada, el caudal, la marea y la temperatura pueden causar variabilidad en la movilidad del TBT.

Finalmente los resultados encontrados en La Boca eran los esperados dado que se consideró un blanco ya que en esa zona solo se practica la pesca de forma artesanal.

**Tabla 5.5.1. Resultados de análisis de TBT en muestras reales de sedimento
colectadas en la playa de San Antonio y La Boca.**

Punto Muestreo	Sedimento (ng g⁻¹)
Punto 1, San Antonio	< LD
Punto 2, San Antonio	< LD
Punto 1, La Boca	< LD
Punto 2, La Boca	< LD

5.6. Aplicación de metodología propuesta a muestras reales

Las muestras reales analizadas por el método convencional no detectaron la presencia de TBT por lo que no requerían análisis posterior por la metodología propuesta con agua subcrítica. Por lo tanto no se comparó la recuperación de ambos métodos en muestras reales con lo que no se pudo cumplir el objetivo planteado.

5. CONCLUSION

La hipótesis planteada respecto de la extracción de TBT desde sedimentos fue válida. Para una masa de 0,30 g de sedimento se obtuvo las siguientes condiciones óptimas de extracción: una temperatura óptima de 300°C con 30 minutos de extracción dinámico y 30 minutos de extracción estático y un caudal de 1,00 mL min⁻¹. En estas condiciones se lograron recuperaciones de 82,0 ± 7,5 % cuando se utilizó el material de referencia PACS-2. Se propone mejorar la extracción modificando el agua con mezclas de disolventes o con el uso de detergentes.

Por otra parte, se logró implementar y validar la metodología convencional de extracción con disolventes de TBT y su posterior determinación por GC-MS. La metodología presenta buenas propiedades analíticas y podría ser aplicada en el análisis de sedimentos dado que valores mencionados en referencias bibliográficas (Waldock, 1994) indican un rango de valores de 0,01 - 0,05 µg g⁻¹ para sedimentos poco contaminados y > 1 µg g⁻¹ en sedimentos que contienen partículas de pintura. El límite de detección encontrado fue de 0,11 ng g⁻¹ mientras que el límite de cuantificación fue de 0,27 ng g⁻¹ y para una concentración de 1,98 ng mg⁻¹ la desviación estándar relativa del método fue de 9,8%.

La hipótesis planteada respecto de la presencia de TBT en sedimentos no pudo ser verificada, dado que no se detectó la presencia de este compuesto en sedimentos marinos de la zona intermareal en la caleta del puerto de San Antonio utilizando la metodología

convencional previamente implementada y validada. Sin embargo, estos resultados no son concluyentes y para confirmar esta distribución se sugiere realizar un muestreo adicional donde se puedan tomar muestras de sedimentos anóxicos y en zona oscura cercanos a la zona intermareal ya que en estas condiciones el TBT se puede estabilizar y acumular por años (Dowson y col, 1996; Waldock, 1994). También se pueden realizar estudios de los cambios en las concentraciones de TBT por variaciones estacionales, mensuales o diarias que den cuenta de la variable temporal.

Aún cuando la metodología propuesta en este trabajo puede ser mejorada como se ha mencionado, un estudio de esta naturaleza adquiere especial relevancia por cuanto, si bien el problema no se ha estudiado a largo de las costas chilenas, es de vital importancia no solo realizar los estudios correspondientes para medir el impacto, sino que, mas importante aún, es necesario tomar medidas restrictivas del uso de TBT tanto de las embarcaciones nacionales como extranjeras. Estas medidas tendrían como finalidad proteger los recursos y la economía ya que finalmente los afectados somos todos los chilenos por la merma de la cantidad, variedad y calidad de los recursos marinos.

7. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

7.1. Referencia general

Levine, I.N. (1996). Sistemas electroquímicos. En Fisicoquímica. Editorial McGraw-Hill, cuarta edición, Vol 2, Pp 469-474.

Miller, J.N. y Miller, J.C. (2002). En Estadística y quimiometría para química analítica., Editorial Prentice Hall, cuarta edición, Pp 6, 125-127.

Skoog^a, D.A, Holler, F.J. y Nieven, T.A. (2001). En Principios de Análisis Instrumental. Editorial McGraw-Hill, quinta edición, Pp 730-755, 759-782, 831-841.

Skoog, D.A. y Leary, J.J. (1994). Espectrometría de masas. En Análisis Instrumental. Editorial McGraw-Hill, cuarta edición, Pp 491-538.

Voet, D. y Voet, J. (1995). Aqueous Solutions. En Biochemistry. Editorial John Wiley & Sons, segunda edición, Pp 29-32.

7.2. Referencia específica

Abalos, M., Bayona, J.M., Compañó, R., Granados, M., Leal, C. y Prat, M.D. (1997). Analytical procedures for the determination of organotin compounds in sediment and biota: a critical review. J Chromatogr A 788: 1-49.

Birchenough, A.C., Evans, S.M. y Welch, R. (2002). Re-colonization and recovery of populations of dogwhelks *Nucella lapillus* (L.) on shores formerly subject to severe TBT contaminations. Mar Pollut Bull 44(7): 652-659.

Bruno, F., Curini, R., Di Corcia, A., Fochi, I, Nazzari, M y Samperi, R. (2002). Determination of surfactants and some of their metabolites in untreated and anaerobically digested sewage sludge by subcritical water extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry. Environ Sci Technol 26(19): 4145-4161.

Cai, Y., Alzaga, R. y Bayona, J. (1994). In situ derivatization and supercritical fluid extraction for the simultaneous determination of butyltin and phenyltin compounds in sediment. Anal Chem 66: 1161-1167.

- Curren^a, M.S.S. y King, J.W.** (2001). Solubility of triazine pesticides in pure and modified subcritical water. *Anal Chem* 73(4): 740-745.
- Curren^b, M.S.S. y King, J.W.** (2001). Using hot water as solvent to analyze atrazine in meat. *Agric Res Pp* 22.
- Directemar.** Número de recaladas de naves nacionales y extranjeras por Puerto, año 2002. En tráfico portuario, en línea. www.directemar.cl.
- Dowson, P.H., Bubb, J.M. y Lester, J.N.** (1996). Persistence and degradation pathways of tributyltin in freshwater and estuarine sediments. *Estuarine, coastal and shelf science* 42(5): 551-562.
- Egushi, Y., Quiroz, G., Astudillo, J., Calderón, K. y Verdugo, R.** (2001). Determinación de compuestos organoestañosos (terbutilestaño) en matrices medioambientales por GC-MS. XXIV Jornadas Chilenas de Química, Universidad de la Frontera, Temuco.
- Ellis, D.V., y Pattisina, L.A.** (1990). Widespread neogastropod imposex: a biological indicator of global TBT contamination? *Mar Pollut Bull* 21(5): 248-253.
- Fernández, I. y Bayona, J.** (1997). Supercritical fluid extraction of priority organotin contaminants from biological matrices. *Analytica Chimica Acta* 355: 269-276.
- Gabrielides, G.P., Alzieu, C., Readman, J.W. y Bacci, E.** (1990). MED POL Survey of organotins in the Mediterranean. *Mar Pollut Bull* 21(5): 233-237.
- Godoi, A.F.L., Montone, R.C. y Santiago Silva, M.** (2003). Determination of butyltin compounds in surface sediments from Sao Paulo State coast (Brazil) by gas chromatography-pulsed flame photometric detection. *J Chromatogr A* 985 (1): 205-210.
- Gooding, M., Gallardo, C., LeBlanc, G.** (1999). Imposex in three marine gastropod species in Chile and potencial impact on muriciculture. *Mar Pollut Bull* 38(2): 1227-1231.
- Gooding, M.P. y LeBlanc, G.A.** (2001). Biotransformation and disposition of testosterone in the eastern mud snail *Ilyanassa obsoleta*. *Gen Comp Endocrinol* 122:172-180.
- Gooding, M.P., Wilson, V.S., Folmar, L.C., Marcovich, D.T. y LeBlanc, G.A.** (2003). The biocide tributyltin reduces the accumulation of testosterone as fatty acid ester in the mud snail (*Ilyanassa obsoleta*). *Environ Health Perspect* 111(4): 426-430.

- Hawthorne, S.B., Grabanski, C.B., Hageman K.J. y Miller, D.J.** (1998). Simple method for estimating polychlorinated biphenyl concentrations on soils and sediments using subcritical water extraction coupled with solid-phase microextraction. *J Chromatogr A* 814(1): 151-160.
- Hawthorne^a, S.B., Lagadec, A.J.M, Kalderis, D., Lilke, A.V. y Miller, D.J.** (2000). Pilot-scale destruction of TNT, RDX y HMX on contaminated soils using subcritical water. *Environ Sci Technol* 34(15): 3224-3228.
- Hawthorne^b, S.B., Trembley, S., Moniot, C.L., Grabanski, C.B. y Miller, D.J.** (2000). Static subcritical water extraction with simultaneous solid-phase extraction for determining polycyclic aromatic hydrocarbons on environments solids. *J Chromatogr A* 886(1): 237-244.
- Horigushi, T., Li, Z., Uno, S., Shimizu, M., Shiraishi, H., Morita, M., Thompson, J.A.J., y Levings, C.D.** (2004). Contamination of organotin compounds and imposex in molluscs from Vancouver, Canada. *Mar Environ Res* 57(1): 75-88.
- Horigushi, T., Kojima, M., Matsuo, T., Shiraishi, H., Morita, M. y Adachi, Y.** (2002). Tributyltin and triphenyltin induce spermatogenesis in ovary of female abalone, *Haliotis gigantea*. *Mar Environ Res* 54(3-5): 679-684.
- Houser, T.J.** (1990). Novel method of bitumen extraction from asphalt pavement. *Prepr Am Chem Soc, Div Pet Chem* 35(3): 511-514.
- Huaquín, L., Osorio, C.** (2003). Alteración de la sexualidad de *Acanthina monodon* (Gastropoda: muricidae) en el litoral de Chile central, inducida por compuestos organoestañosos. *Cien Tecnol Mar* 26 (2): 97-107.
- Huaquín^a, L., Osorio, C., Verdugo, R.** (2004). Imposex en poblaciones de *Acanthina monodon* (Pallas, 1774) y *Nassarius gayi* (Kiener, 1835) en las costas de Chile. Resumen de VIII Congreso Internacional de Malacología Médica y Aplicada.
- Huaquín^b, L., Osorio, C., Collado, G. y Verdugo, R.** (2004). Morphological changes in the reproductive system of females affected with imposex in populations of *Acanthina monodon* from the coast of Central Chile. Enviado.
- Ibañez, E., Kubátová, A., Señoráns, F.J., Caverro, S., Reglero, G., y Hawthorne, S.B.** (2003). Subcritical water extraction on antioxidant compounds from rosemary plants. *J Agric Food Chem* 51 (2): 375-382.
- International Maritime Organization.** (2002). Anti-fouling systems. En Focus on IMO, Pp 1-31.

- Kronholm, J.** (2002). Utilization of pressurized hot water and supercritical water in the treatment of polluted water and soils. Yliopistopaino, Helsinki.
- Lopez, V., Liua, Y. y Beckert, F.** (1997). Interlaboratory evaluation of an off-line supercritical fluid extraction and gas chromatography with atomic emission detection method for the determination of organotin compounds in soil and sediments. *J Chromatogr A* 785: 279-288.
- Marshall, D.J. y Rajkumar, A.** (2003). Imposex in the indigenous *Nassarius kraussianus* (Mollusca: Neogastropoda) from South African harbors. *Mar Pollut Bull* 46(9): 1150-1155.
- Morabito, R. y Quevauviller, P.** (2002). Performances of spectroscopic methods for tributyltin (TBT) determination in the 10 years of the EU-SM&T organotin programme. *Spectroscopy Europe* 18-23.
- Moreno, C. Y Fedele, A.** (2002). Ecosistemas marinos y del borde costero. En Informe país, Estado del medio ambiente en Chile 2002. Editorial LOM. Pp 251-298
- Nias, D.J., McKillup, S.C. y Edyvane, K.S.** (1993). Imposex in *Lepsiella vinosa* from Southern Australia. *Mar Pollut Bull* 26(7): 380-384.
- Oberdorster, E. y McClellan-Green, P.** (2002). Mechanism of imposex induction in the mud snail, *Ilyanassa obsoleta*: TBT as a neurotoxin and aromatase inhibitor. *Mar Environ Res* 54(3-5): 715-718.
- Pessoa, M.F., Fernando, A. y Oliveira, J.S.** (2001). Use of imposex pseudo-hermaphroditism as indicator of the occurrence of organotin compounds in portuguese coastal waters Sado and Mira estuaries. *Environ Toxicol* 16, 234-241.
- Saavedra, M.M., y Ellis, D.V.** (1990). Widespread neogastropod imposex in the northeast pacific: implications for TBT contaminations surveys. *Mar Pollut Bull* 21(5): 244-247.
- Schubert, P., Rosenberg, E. y Grasserbauer, M.** (2000). Optimization of a sample preparation procedure for the speciation of organotin compounds in sediment samples using GC-AED. *Intern J Environ Anal Chem* 78 (3-4): 185-204.
- Sociedad Nacional de Pesca.** La pesca en Chile. En línea, www.mardechile.cl.
- Strand, J. y Asmund, G.** (2003). Tributyltin accumulation and effects in marine molluscs from West Greenland. *Environ Pollut* 123: 31-37.
- Tuğrul, S., Blkas, T.I. y Goldberg, E.D.** (1983). Methyltins in the marine environment. *Mar Pollut Bull* 14(8): 297-303.

- Terlizzi, A., Delos, A.L., Garaventa, F., Faimali, M. y Geraci, S. (2004).** Limited effectiveness of marine protected areas: imposex in *Hexaplex Trunculus* (Gastropoda, Muricidae) populations from Italian marine reserves. *Mar Pollut Bull* 48: 164-192.
- U'Ren, S.C. (1983).** Acute toxicity of bis(tributyltin) oxide to a marine copepod. *Mar Pollut Bull* 14(8): 303-306.
- Verslycke, T., Poelmans, S., De Wasch, K., Vercauteteren, J., Devos, C., Moens, L., Sandra, P., De Brabander, H.F. y Janssen, C.R. (2003).** Testosterone metabolism in the estuarine mysid integer (*Crustacea Mysidacea*) following tributyltin exposure. *Environ Toxicol Chem* 22(9): 2030-2036.
- Waldock, M.J. (1994).** Organometallic compounds in the aquatic environment. En P. Calow (ed), *Handbook of Ecotoxicology*. Blackwell Scientific Publications, Vol 2, Pp 106 -129.