

UCH - FC
Q. Ambiental
G 162
C. 1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**“DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS EN AGUAS DE UNA ZONA
VITIVINICOLA DE LA VI REGIÓN, POR MEDIO DE TÉCNICAS
CROMATOGRÁFICAS”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial
de los requisitos para optar al Título de:

Químico Ambiental

Sebastián Ignacio Gallardo Moscozo



Director de Seminario de Título: Ing. Agrónomo Adriana Nario
Profesor Patrocinante: M. Cs. Sylvia Copaja Castillo

Agosto de 2010
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el o (la) candidato (a):

SEBASTIÁN IGNACIO GALLARDO MOSCOZO

“DETERMINACIÓN DE PLAGUICIDAS EN AGUAS DE UNA ZONA VITIVINICOLA DE LA VI REGIÓN, POR MEDIO DE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Químico Ambiental

COMISIÓN DE EVALUACIÓN

Ing. Agrónomo Adriana Nario
Director Seminario de Título

M. Cs. Sylvia Copaja Castillo
Profesor Patrocinante

Dra. Marcela Urzúa
Corrector

M. Cs. Héctor Bravo
Corrector



Santiago de Chile, agosto de 2010

A mi madre





SEBASTIAN IGNACIO GALLARDO MOSCOZO

Nace un sábado 21 de Septiembre de 1985 en la actual región de los de los ríos, en un pueblo llamado Panguipulli en las cercanías de Valdivia, al poco se traslada con su madre a la región metropolitana donde se establecen. Al paso de los años se educa en diversos centros educacionales primarios, debido a los constantes cambios de domicilio, siendo el último la escuela particular Víctor Hugo, la educación secundaria la realiza en el Liceo José Victorino Lastarria del cual guarda los mejores recuerdos de su adolescencia, grandes amigos y una excelente formación académica la que le permitió una entrada a la educación superior, el año 2004 ingresa a la carrera de Química Ambiental.

Durante los años de universidad conoce a grandes persona que estarán por siempre en su vida, poco a poco va descubriendo nuevas habilidades y aspectos que mejorar, con el pasar de los años logra avanzar los ramos de la carrera, se convierte en ayudante de laboratorio, empieza a realizar clases particulares, hasta que llega la etapa final de la universidad, donde se llena de recuerdos y grandes personas y debe emprender el ultimo escaño de esta etapa que es el desarrollo de este seminario de título



en el centro de estudios nucleares de la Reina (CCHEN), donde adquiere conocimientos prácticos no tan solo de ciencias o técnico, sino que consejos prácticos de vida .

La vida depara grandes desafíos, éxitos y también posibles fracasos los se enfrentara con la frente en alto y con la certeza de tener las herramientas necesarias para afrontar cada uno de ellos.



AGRADECIMIENTOS

Primero que todo quiero agradecer a mi madre por su incondicional apoyo, entrega, esfuerzo y sacrificio durante todos estos años.

De igual manera agradezco a las autoridades de la Comisión Chilena de Energía Nuclear (CCHEN) por brindarme la posibilidad de desarrollar este seminario de título en sus instalaciones, especialmente a toda la sección de agricultura por brindarme todo el apoyo para la realización de este trabajo, a la Sra. Inés Pino, Sra. Ana María Parada, Sra. Adriana Nario y Sra. Ximena Videla, por su gran apoyo, entrega y aportes a este trabajo. A todas las demás personas que conocí CCHEN gracias por todos los consejos que me entregaron, más que profesionales o técnicos sino que consejos de vida.

Agradecer también a la profesora Sylvia Copaja por todo su apoyo, cariño y paciencia entregados, a además por facilitarme su equipo de HPLC y todo su conocimiento sobre el tema.

También quiero rescatar en a todos las personas que estuvieron presentes a lo largo de todos estos años de esfuerzo por conseguir mi sueño, a mis compañeros de universidad con los cuales vivimos momentos agradables y también especialmente a mis grandes amigas Catalina, Daniela e Ingrid por su valiosa amistad e incondicionalidad hacia mí. A los profesores de la facultad de ciencias por el conocimiento entregado durante estos cinco años.



La vida es como el mar

Por eso hay que darse

Como la espuma,

Dar sin esperar nada a cambio

Porque el mayor regalo

Es el que menos esperas

Gracias mi personita especial por abrir mi mente y las puertas de mi corazón



INDICE DE CONTENIDO

INDICE DE CONTENIDOS	vii
INDICE DE TABLAS	xi
INDICE DE FIGURAS	xv
RESUMEN	xvii
ABSTRACT	xix
I INTRODUCCION	1
1.1 Historia de los plaguicidas	1
1.2 Definición y clasificación de los plaguicidas	3
1.2.1 Organofosforados	4
1.2.2 Carbámicos	5
1.2.3 Aromáticos policlorados	6
1.2.4 Estrobilurinas	7
1.2.5 Piretroides	8
1.2.6 Derivados de la Atrazina	9
1.3 Efectos medio ambientales	10
1.4 Descripción de plaguicidas en estudio.	12
a) Diazinon	12
b) Sulfotep	13
c) Clorpirifos	14
d) Azinfos metil	15



e) Carbaril	16
f) Clorotalonil	17
g) Azoxistrobin	18
h) Kresoxim metil	19
1.5 Técnicas de análisis	20
1.5.1 Cromatografía	20
1.5.2 Cromatografía de Gases (GC)	20
1.5.3 Espectrometría de masas	23
1.5.4 Cromatografía Líquida (HPLC)	25
1.5.3.1 Cromatografía líquida en fase normal	25
1.5.3.2 Cromatografía líquida en fase inversa	26
1.5.5 Detector de fluorescencia	28
1.6 Técnicas de extracción	31
1.6.1 Extracción líquido – líquido	31
HIPÓTESIS	34
II OBJETIVOS	35
2.1 Objetivos generales	35
2.2 Objetivos específicos	35
III MATERIALES Y METODOS	36
3.1 Recolección de muestras de agua	36
3.2 Lavado material de vidrio	42
3.3 Plaguicidas en estudio	42



3.4	Preparación de los estándares	43
3.5	Determinación de los tiempos de retención (tr)	44
3.6	Determinación de los límites de Detección (LD) y Cuantificación (LC)	46
3.7	Extracción líquido- líquido	47
3.7.1	Determinación de los porcentajes de recuperación	47
3.7.2	Extracción de las muestras	48
IV	RESULTADOS Y DISCUSION	49
4.1	Validación del método analítico	49
4.2	Análisis químico (tr)	53
4.3	Curvas de calibración	56
4.4	Límite de detección y cuantificación	59
4.5	Porcentajes de recuperación del proceso de extracción	62
4.6	Comprobación por espectroscopia de masas	64
4.7	Resultado muestras de agua	72
4.7.1	Resultados <i>In-situ</i>	72
4.7.2	Resultados análisis por Cromatografía de gases	74
4.7.3	Resultados análisis por Cromatografía de HPLC	78
V	DISCUSION GENERAL	80
VI	CONCLUSIONES	83
VII	BIBLIOGRAFIA	86
	ANEXOS	92

ANEXO A

93

ANEXO B

105

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Concentración de los estándares plaguicidas (St) utilizados en las curvas de calibración ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).	44
Tabla 2	Áreas asociadas a las concentraciones de Carbaril	49
Tabla 3	Áreas asociadas a las concentraciones de Sulfotep	50
Tabla 4	Áreas asociadas a las concentraciones de Diazinon	50
Tabla 5	Áreas asociadas a las concentraciones de Clorotalonil	50
Tabla 6	Áreas asociadas a las concentraciones de Clorpirifos	51
Tabla 7	Áreas asociadas a las concentraciones de Kresoxim metil	51
Tabla 8	Áreas asociadas a las concentraciones de Azinfos metil	51
Tabla 9	Áreas asociadas a las concentraciones de Azoxistrobin	52
Tabla 10	Tiempos de retención de los plaguicidas estudiados	53
Tabla 11	Ecuaciones y coeficientes de regresión de las respectivas curvas de calibración, de cada plaguicida	56
Tabla 12	Valores de límites de detección (LD) y cuantificación (LC)	59
Tabla 13	Porcentajes de recuperación obtenidos para los diferentes estándares utilizados	62
Tabla 14	Valores <i>In-situ</i> para los sitios de muestreo, realizados en la primera campaña	72
Tabla 15	Concentraciones obtenidas para los extractos de la primera campaña de muestreo, concentraciones en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	74
Tabla 16	Concentraciones reales obtenidas para las muestras de agua de la primera campaña, analizadas por cromatografía de gases en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.	75
Tabla 17	Concentraciones obtenidas para los extractos de la segunda campaña de muestreo, concentraciones en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	76

Tabla 18	Concentraciones reales obtenidas para las muestras de agua de la segunda campaña, analizadas por cromatografía de gases. concentraciones en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	77
Tabla 19	Concentraciones obtenidas para los extractos analizados por HPLC, expresados en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	78
Tabla 20	Concentraciones reales obtenidas para las muestras de agua, analizadas por cromatografía líquida (HPLC)	78
Tabla 21	Reproducibilidad de los datos utilizados en la construcción de la curva de LD para Carbaril	94
Tabla 22	Reproducibilidad de los datos utilizados en la construcción de la curva de LD para Sulfotep	94
Tabla 23	Reproducibilidad de los datos utilizados en la construcción de la curva de LD para Diazinon	95
Tabla 24	Reproducibilidad de los datos utilizados en la construcción de la curva de LD para Clorotalonil	95
Tabla 25	Reproducibilidad de los datos utilizados en la construcción de la curva de LD para Clorpirifos	96
Tabla 26	Reproducibilidad de los datos utilizados en la construcción de la curva de LD para Kresoxim metil	96
Tabla 27	Reproducibilidad de los datos utilizados en la construcción de la curva de LD para Azinfos metil	97
Tabla 28	Reproducibilidad de los datos utilizados en la construcción de la curva de LD para Azoxistrobin	97
Tabla 29	Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de los porcentajes de recuperación de Carbaril	99
Tabla 30	Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de los porcentajes de recuperación de Sulfotep	99
Tabla 31	Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de los porcentajes de recuperación de Diazinon	100

Tabla 32	Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de los porcentajes de recuperación de Clorotalonil	100
Tabla 33	Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de los porcentajes de recuperación de Clorpirifos	101
Tabla 34	Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de los porcentajes de recuperación de Kresoxim metil	101
Tabla 35	Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de los porcentajes de recuperación de Azinfos metil	102
Tabla 36	Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de los porcentajes de recuperación de Azoxistrobin	102
Tabla 37	Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de la concentración de los plaguicidas encontrados en V 1	103
Tabla 38	Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de la concentración de los plaguicidas encontrados en N 1	104
Tabla 39	Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de la concentración de los plaguicidas encontrados en Ne 1º campaña	104
Tabla 40	Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de la concentración de los plaguicidas encontrados en Ne 2º campaña	104
Tabla 41	Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de la concentración de los plaguicidas encontrados en río Tinguiririca	104
Tabla 42	Regresiones lineales para la determinación de los límites de detección y cuantificación	105
Tabla 43	Áreas promedio de las extracciones, para la determinación de los porcentajes de recuperación para cada compuesto en estudio	109
Tabla 44	Áreas promedio de los estándares de cada compuesto para comparación con los datos extraídos	110
Tabla 45	Áreas promedio obtenidas para los compuestos encontrados en V 1	111
Tabla 46	Áreas promedio obtenidas para los compuestos encontrados en N 1	112

Tabla 47	Áreas promedio obtenidas para los compuestos encontrados en N e, ambas campañas	113
Tabla 48	Áreas promedio obtenidas para los compuestos encontrados en río Tinguiririca	114

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura química general de plaguicidas órganos fosforados	4
Figura 2	Estructura general de los carbamatos	5
Figura 3	Esquema general de las vías de contaminación difusa por la aplicación de plaguicidas	11
Figura 4	Estructura química de Diazinon	12
Figura 5	Estructura química de Sulfotep	13
Figura 6	Estructura química de Clorpirifos	14
Figura 7	Estructura química de Azinfos metil	15
Figura 8	Estructura química de Carbaril	16
Figura 9	Estructura química de Clorotalonil	17
Figura 10	Estructura química de Azoxistrobin	18
Figura 11	Estructura química de Kresoxim metil	19
Figura 12	Esquema general del funcionamiento de Cromatografía de Gases	21
Figura 13	Esquema general del proceso de fluorescencia	29
Figura 14	Esquema general del proceso de extracción líquido- líquido	32
Figura 15	Ventisquero cero (V0), sitio de referencia	37
Figura 16	Punto uno de viña Ventisquero (V 1)	38
Figura 17	Punto uno de viña Neyen (N1)	39
Figura 18	Estanque de Viña Neyen (Ne)	40
Figura 19	Río Tinguiririca	41
Figura 20	Amplificación de las señales de Sulfotep (9,230), Diazinon (10,528) y Clorotalonil (11,104)	54
Figura 21	Amplificación cromatograma HPLC señal de Carbaril	55

Figura 22	Curva de calibración para Carbaril realizada en HPLC	58
Figura 23	Curva de calibración de Clorpirifos realizada en Cromatógrafo de Gases	58
Figura 24	Grafico de zona baja de la curva de calibración de Carbaril	60
Figura 25	Espectro de comparación de señal obtenida a los 9,2 minutos para Sulfotep	65
Figura 26	Espectro de comparación de señal obtenida a los 10,5 minutos para Diazinon (Dimipylate)	66
Figura 27	Espectro de comparación de señal obtenida a los 11,07 minutos para Clorotalonil (Tetrachloroisophthalonitrile)	67
Figura 28	Espectro de comparación de señal obtenida a los 13,6 minutos para Clorpirifos	68
Figura 29	Espectro de comparación de señal obtenida a los 18,5 minutos para Kresoxim Metil	69
Figura 30	Espectro de comparación de señal obtenida a los 27,9 minutos para Azinfos Metil	70
Figura 31	Espectro de comparación de señal obtenida a los 44,7 minutos para Azoxistrobin	71

RESUMEN

En la actualidad es imprescindible aumentar y maximizar la producción de alimentos a nivel mundial, con lo que nace la necesidad de recurrir al uso de agroquímicos, de igual forma es necesario crear legislaciones y métodos para hacer un proceso más eficiente y amigable con el medio ambiente.

Este estudio consistió en realizar análisis de aguas destinadas al riego de dos predios vitivinícolas, y aguas del río Tinguiririca, mediante la técnica de extracción líquido-líquido, para posterior detección de residuos de plaguicidas por cromatografía líquida (HPLC) y cromatografía de gases (GC- μ ECD, GC-MS). Se realizaron dos campañas de muestreos durante la estación primaveral. Los plaguicidas que se determinaron fueron: Azinfos metil, Azoxistrobin, Carbaril, Clorotalonil, Clorpirifos, Diazinon, Kresoxim metil, Sulfotep

Dentro de los resultados se detectó Carbaril y Clorpirifos en la muestra del río Tinguiririca. Para la viña N se detectó Clorpirifos en el punto Ne mientras que en punto N1 se detectó Clorotalonil. En la viña V, se detectó Clorpirifos y Azoxistrobin en el punto V1.

Con el método utilizado se logró detectar concentraciones del orden de los 10^{-3} $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, estos resultados permitieron concluir que los residuos de plaguicidas existente en las muestras de aguas de riego analizadas cumplen la norma chilena para cuerpos de

agua destinadas al riego (Nch 1.333/94) por lo tanto los plaguicidas detectados por sus bajas concentraciones no presentan un peligro ambiental.

ABSTRACT

Actually, is essential to increase and maximize the worldwide food production, hence the necessity of using agrochemicals, is equally necessary to establish laws and methods for a more efficient process in a friendly environment.

In this study were analyzed water samples from irrigation water from two vineyards and water samples took from the Tinguiririca River, by the liquid-liquid extraction methodology, and later residue pesticides detection by liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC - μ ECD, GC - MS). The pesticides analyzed were Azinphos methyl, Azoxystrobin, Carbaryl, Chlorothalonil, Chlorpyrifos, Diazinon, Kresoxim methyl and Sulfotep.

Carbaryl and Chlorpyrifos were detected at Tinguiririca River samples. At Vineyard N was detected Chlorpyrifos at Ne point, while at N1 point was detected Chlorothalonil. In vineyard V was detected Chlorpyrifos and Azoxystrobin at V1 point. With the methodology used was possible to detect pesticides residue concentrations in the order of $10^{-3} \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

With these results it was possible to conclude that the pesticides found in the irrigation water samples complies with the standard Chilean norm for irrigation water bodies (Nch 1.333/94, MOP), therefore due to the low pesticides concentration detected there were not environmental harmful.

I.- INTRODUCCIÓN

1.1 Historia de los plaguicidas

Los plaguicidas son conocidos como sustancias químicas capaces de destruir, mitigar o controlar plagas, son utilizados mayoritariamente con fines agrícolas controlando plagas de insectos, hongos, malezas y ácaros, dándoles el nombre de insecticidas, fungicidas, herbicidas y acaricidas respectivamente, usados en la agricultura y además para proteger la salud pública y control de parásitos animales. (Miller GT, 2004)

La historia de los plaguicidas se puede resumir y dividir en tres grandes etapas: la primera a principios del siglo XIX, cuando se descubrió accidentalmente la acción plaguicida de algunos elementos naturales como el azufre, cobre, arsénico, piretrinas (sustancias obtenidas de los pétalos del crisantemo) y fósforo; así mismo se inicio el uso de los derivados del petróleo. La segunda etapa se puede situar en 1922, cuando se emplearon diferentes aceites insecticidas y poco más tarde los primeros productos sintéticos La tercera etapa del empleo de plaguicidas en la agricultura se inicia a partir de 1939 en que Muller descubrió las propiedades insecticidas del DDT (dicloro-difenil-tricloroetano, $C_{14}H_9Cl_5$) producto sintetizado en el siglo XIX por Zeidler. El comienzo de los plaguicidas sintéticos parte durante la década de 1940 y favoreció al incremento de la producción alimenticia nivel mundial, también contribuyo a la salud humana a través del control de insectos vectores de enfermedades (Estrada, 1998). Luego a partir de 1960 comenzaron a manifestarse los impactos adversos de estos sobre el medio

ambiente y la salud humana. Actualmente la producción mundial es de unos diez millones de toneladas, y más del ochenta por ciento se produce en Europa y EE.UU.

En las primeras décadas el uso de los plaguicidas no fue controlado, se aplicaban grandes cantidades de estos, de los cuales solo un pequeño porcentaje llegaba al organismo objetivo, por lo que el resto llegaba al suelo, en el cual se producen procesos tales como lixiviación y difusión, por esta vía los residuos pueden llegar a otros medios como el acuático o incluso volatizarse, también por procesos como deriva del viento y escorrentía superficial pueden llegar a medios acuáticos superficiales. (Martinez Vidal y col, 2004).

En nuestro país el uso de plaguicidas ha aumentado gradualmente, llegando a importar 27.454 ton de agroquímicos, de las cuales 6.427 ton corresponden a la región de O'Higgins, representando el 23,4%, además el año 2003 el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) autorizó un total de 854 plaguicidas agrícolas, esta cifra disminuyó a 830 para el año 2005. (INE 2005, Medio Ambiente Informe Anual).

En la sexta región del país (Región del General Libertador Bernardo O'Higgins) se centra gran parte de la industria agrícola, especialmente el subsector vitivinícola, el explosivo aumento que ha experimentado este sector conlleva un aumento en el uso de agroquímicos, es por esta razón que nace la preocupación por tener desempeños ambientales responsables de acuerdo a las nuevas tendencias y exigencias de los mercados internacionales.

1.2 Definición y clasificación de los plaguicidas

Plaguicidas o pesticida es una sustancia química que se usa principalmente para controlar, mitigar o eliminar cierta plaga o peste. En la actualidad es difícil mantener una actividad agrícola sin el uso fitosanitarios, ya que estos productos ayudan a elevar el rendimiento de la producción agrícola, el uso de estos compuestos data desde varias décadas, sin embargo en los últimos años ha surgido un concepto de manejo integrado de plagas, lo que obliga a los fabricantes de plaguicidas como a los productores agrícolas a conocer las propiedades de los agroquímicos utilizados como: modos de acción, sus residuos y su persistencia en el medio ambiente.

Los plaguicidas se pueden clasificar de diversas formas, ya sea por estructura y composición química, tipo de plaga que controle, modo de acción sobre la plaga. En este trabajo se desarrollara la clasificación correspondiente a su estructura o familia química (Bartual y col, 2002).

1.2.1 Organofosforados

Los plaguicidas organofosforados son moléculas orgánicas de síntesis que contienen fósforo, asociado con cuatro enlaces como se muestra en la Figura 1.

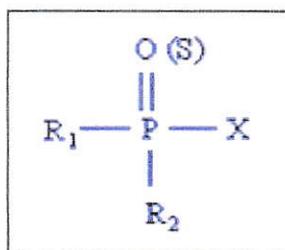


Figura 1. Estructura química general de plaguicidas órganos fosforados.

En la Figura 1 R_1 y R_2 pueden ser alquenos, alcoxi, alquil, aril o amida, y el grupo X es generalmente un grupo carboxilante, cianuro, tiocianato, fosfato, haluro, fenoxi o tiofenoxido.

Estos compuestos se usan principalmente como insecticidas, este uso se fortaleció después de la segunda guerra mundial, a partir de la década de los 50, y así los primeros plaguicidas organofosforados sintetizados fueron Paratión y Malatión, cuyo uso se potenció con la prohibición de los plaguicidas organoclorados (Wilkinson, 1976).

Esta familia de compuestos actúa principalmente como supresores del sistema nervioso central (SNC), mediante una fosforilación irreversible, lo que produce una inhibición de la acetilcolinesterasa (ACh - asa), que es una enzima esencial para el

sistema nervioso de los animales y el ser humano. La transmisión de los impulsos nerviosos a través de ciertas sinapsis, implica la liberación de un transmisor químico, la acetilcolina (ACh). El efecto estimulante sobre ACh es rápidamente anulada por la actividad de la ACh-asa. El efecto inhibitor de los organofosforados- ACh-asa produce una acumulación de los niveles de ACh, afectando el normal funcionamiento del impulso nervioso y alterándose finalmente la sinapsis, la peligrosidad de los compuestos organofosforados es que su efecto sobre el sistema nervioso central es igual en mamíferos e insectos, ya que este sistema es uno de los mas conservado durante el proceso de evolución.

1.2.2 Carbámicos

Los compuestos carbámicos son sustancias orgánicas de síntesis conformadas por un átomo de nitrógeno unido aun grupo lábil como se muestra en la Figura 2.

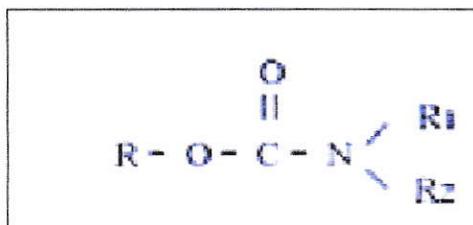


Figura 2. Estructura general de plaguicidas carbamatos

Estos compuestos se caracterizan por su aplicación como insecticidas y surgieron como alternativa al uso de plaguicidas organofosforados, al igual que en los organofosforados el mercado para los plaguicidas carbámicos aumento ampliamente en la década de los 50, uno de los primeros carbamatos sintetizados fue Aldicarb, que actualmente se encuentra dentro de la docena sucia. (Wilkinson, 1976), el modo en el cual actúan los compuestos carbámicos es suprimiendo la acetil colinesterasa de igual modo que hacen los plaguicidas organofosforados, la diferencia es el tipo de reacción, la cual se produce por una carbamilación reversible sobre la acetil colinesterasa, produciendo así una acumulación de acetilcolina, la reversibilidad de esta reacción hace posible identificar síntomas de envenenamiento y dan un intervalo de tiempo para tomar medidas, una de estas es que el complejo carbamilo-acetilcolinesterasa invalida la medición de la actividad de la colinesterasa en la sangre; además este complejo es responsable de un intervalo de tiempo entre los síntomas de envenenamiento y la dosis letal, que en el caso de los carbámicos es muy superior a la de los organofosforados. (OPS, 2006).

1.2.3 Aromáticos policlorados

Los aromáticos policlorados son compuestos orgánicos sintetizados, se obtienen de una serie de sustituciones electrófilas (halogenación aromáticas), estos compuestos clorados fueron ampliamente utilizados en los primeros años de consumo de plaguicidas.

La principal acción tóxica de los elementos aromáticos policlorados la ejercen sobre el sistema nervioso, interfiriendo con el flujo de cationes a través de membranas de las células nerviosas, aumentando la irritabilidad de las neuronas. Su modo de acción incluye la combinación de este con una molécula llamada glutatión dentro de las células de los hongos. Mientras estas se van adhiriendo, van quedando las enzimas dependientes del glutatión sin poder realizar su función. Una variada cantidad de enzimas que participan en la respiración celular, proceso que aporta energía a las células, son dependientes del glutatión. Por lo que los efectos tóxicos de estos compuestos se caracterizan por inhibir este proceso (Martínez, 2001).

Estos compuestos tienen un uso general como fungicidas, se caracterizan por su rápida acción letal sobre las plagas y su alta toxicidad.

1.2.4 Estrobilurinas

Las estrobilurinas empezaron a sintetizarse a partir desde 1996, su prolongado efecto residual puede producir efectos adversos en el medio ambiente ya que la vida media de estos compuestos es del orden de años. Estos compuestos son obtenidos de productos naturales, en esta rama se obtuvo un metabolito fúngico secundario aislado del hongo *Strobilurus tenacellus*, estos compuestos alelopáticos poseen actividad preventiva, curativa y erradicante así como un prolongado efecto residual.

El modo de acción sobre un sitio específico se basa en la inhibición de la respiración mitocondrial, del transporte de electrones, mediante este proceso se detienen

las reacciones de oxidación y a su vez deteniendo la producción de ATP que produce la muerte de la peste. En Nueva Zelanda se ha comprobado su eficacia contra variadas pestes y manchas foliares de los cereales (Beresford, 1999).

1.2.5 Piretroides

Los piretroides son un grupo de pesticidas artificiales desarrollados para controlar principalmente las poblaciones de insectos considerados plaga. Este grupo surgió como un intento por parte del hombre de imitar los efectos insecticidas de las piretrinas naturales obtenidas del crisantemo, que se venían usando desde 1850.

Los piretroides son compuestos tóxicos tanto para los insectos como para los peces, permanecen durante más tiempo en el medio ambiente que las piretrinas ya que la modificación química en su fórmula los hace más estables a la luz solar y el calor. Se hidrolizan por álcalis (solvente orgánico derivado del petróleo). Son relativamente biodegradables y no causan resistencia entre los insectos. Entran al ambiente principalmente debido a su uso como insecticidas, en el aire son degradados rápidamente en 1-2 días por la luz o por otros compuestos que se encuentran en la atmósfera. También pueden adsorbidos firmemente al suelo y ser degradados por microorganismos en el suelo y en el agua. Normalmente no pasan al agua subterránea.

Su acción es a nivel del sistema nervioso, generando una alteración de la transmisión del impulso nervioso, su efecto fundamental debe a una modificación en el canal del sodio de la membrana nerviosa, los piretroides prolongan la corriente que

fluye por los canales de sodio al hacer más lento o al impedir el cierre de los canales de sodio. (ATSDR, 2003a).

1.2.6 Derivados de la Atrazina

Son compuestos orgánicos clasificados como herbicidas ampliamente utilizados en forma preventiva y reactiva, su modo de acción se desarrolla inhibiendo la proteína plastoquinona, la cual es obligatoria en el fotosistema II, es hace que se inhiba el transporte de los electrones. Los derivados de la atrazina también se utilizan en muchos procesos industriales, incluyendo la producción de algunas tintas y explosivos. La Atrazina es uno de los herbicida más ampliamente utilizado en los sistemas de labranza.

Los derivados de la atrazina se aplican al suelo, permanecerán en el por días o meses, en pocas ocasiones permanecerán en el durante varios años. Sin embargo, en la mayoría de los casos, la Atrazina será degradada en el suelo durante el transcurso de una temporada de cultivo. Además de ser removida del suelo, la Atrazina es absorbida por las plantas que crecen en el suelo, y esta incorporación representa la primera etapa en la eliminación de las hierbas, también es movilizada desde el suelo hacia canales u otros cuerpos de agua en los que permanecerá por mucho tiempo debido a que la degradación de estas sustancias es lenta en agua superficiales y subterranas. Este es uno de los motivos por el cual la atrazina se encuentra frecuentemente en muestras de agua tomadas en pozos (ATSDR, 2003b).

1.3 Efectos medioambientales

La interacción y efecto que tenga un plaguicida sobre el medio ambiente dependerá tanto de sus propiedades físicas como químicas, de la toxicidad y concentración al momento de ser aplicado (Barriuso, 2000).

Una vez aplicados los plaguicidas empieza su interacción con los diferentes medios del ecosistema, los procesos seguidos dependerán no solo de las propiedades de los plaguicidas sino que también de las características propias del suelo y las condiciones físicas del sector, condiciones de viento, temperatura y humedad al momento de realizar la aplicación. Las propiedades del suelo influyen en: procesos de adsorción, transformaciones químicas y lixiviación, los cuales dependen de propiedades físicas y químicas del suelo tales como: pH, conductividad eléctrica, granulometría, contenidos de arcillas, materia orgánica, contenidos de sales solubles y microorganismos.

Después de la aplicación de los plaguicidas están afectos a los diversos procesos del medio ambiente, los que determinaran su destino final del plaguicida. Estos procesos movilizan los plaguicidas más allá de la matriz del suelo, un proceso de transporte puede ser llevado a cabo por la lixiviación de estos a través del suelo, debido a la deriva producida por el viento, procesos de escorrentía superficial dados por la pendiente del lugar de aplicación.

Uno de los principales destinos de estos procesos de transporte es el agua, tanto en los acuíferos subterráneos como los cursos de agua superficial, haciendo de esta

forma otro foco de contaminación por el uso de plaguicidas agrícolas (J. Martínez Vidal y col, 2004).

Según las condiciones de pH, conductividad eléctrica, oxígeno disuelto, demanda biológica de oxígeno (DBO) y sólidos disueltos del agua, los plaguicidas pueden sufrir reacciones químicas de hidrólisis, haciendo más difícil su detección, un ejemplo de esto son los compuestos aminados, la reacción de hidrólisis es la más común sustituyendo el grupo funcional como el amino ($R-NH_2$) por un grupo hidroxilo ($-OH$).

Dentro de las propiedades relevantes de los plaguicidas en su interacción con el medio ambiente destacan: persistencia, vida media, constante octanol- agua (K_{ow}), solubilidad y presión de vapor (Hidalgo C, 1999). En la Figura 3 se muestra la distribución de los plaguicidas desde el momento de la aplicación.

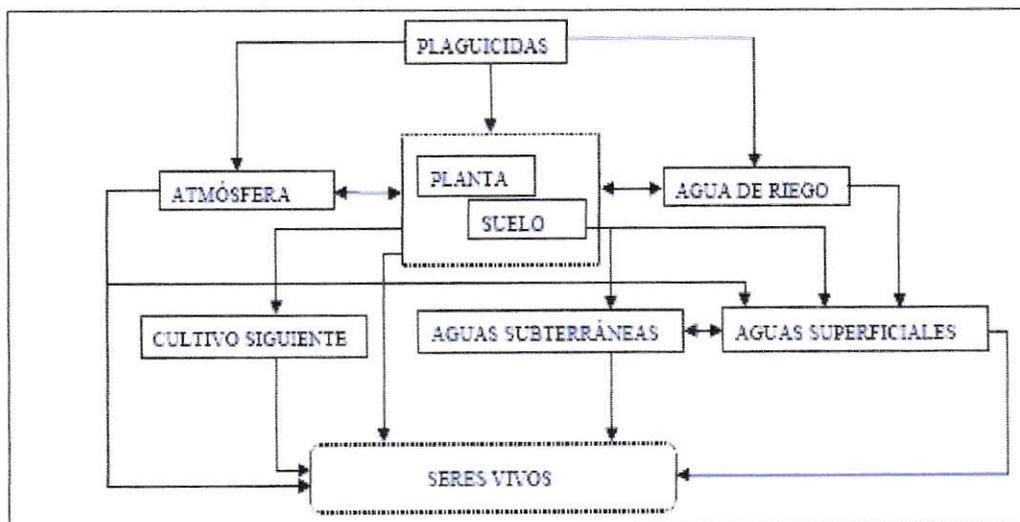


Figura 3. Esquema general de las vías de contaminación difusa por la aplicación de plaguicidas

1.4 Descripción de los plaguicidas en estudio

a. Diazinon

Diazinon es un insecticida organofosforado, su nombre químico es *O,O*-dietil *O*-2-isopropil-6-metilpirimidin-4-il fosforotioato, masa molar de $304,35 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Es usado para controlar insectos en el suelo, en plantas ornamentales y en cosechas de frutas y hortalizas, también es utilizado para el control de plagas del tipo doméstico, en la Figura 4 se muestra la estructura de la molécula.

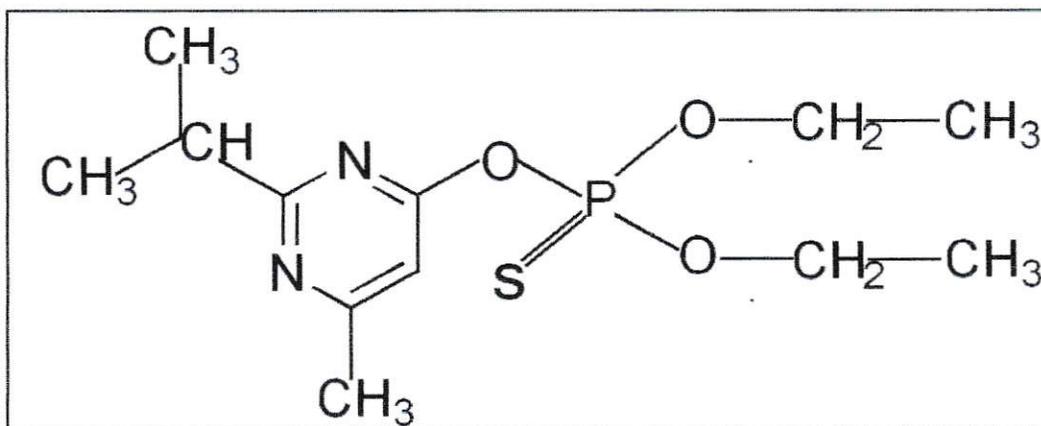


Figura 4. Estructura química de Diazinon $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_3\text{PS}$

Posee una movilidad moderada, baja persistencia en el suelo, puede lixiviar hasta los cursos de agua subterránea. En los cuerpos de agua es eliminado por reacciones químicas y biológicas. Su vida media en agua es entre 5 a 15 días, llegando incluso a mineralizarse en pocas semanas, su bioacumulación es baja dado que tiene una solubilidad de $40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y además los organismos acuáticos lo neutralizan rápidamente (ATSDR, 2008).

b. Sulfotep

Sulfotep es un acaricida organofosforado su nombre químico es ditiopirofosfato de O,O,O,O-tetraetilo con masa molar de $322,32 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

Controla los ácaros e insectos, se concentra principalmente en los organismos acuáticos. Dada su presión de vapor $0,105 \text{ mmHg}$ posee alta volatilidad, por lo cual se presta mayor atención en su aplicación, en otras especies no se presentan potenciales de bioacumulación considerables, ya que es soluble en agua con un valor de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. En la Figura 5 se muestra la estructura química de Sulfotep (Carreño, Planes, 2008).

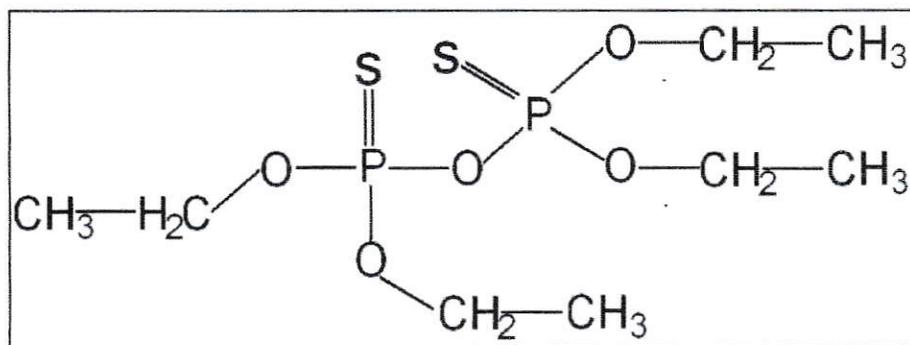


Figura 5. Estructura química de sulfotep $\text{C}_8\text{H}_{20}\text{O}_5\text{P}_2\text{S}_2$

c. Clorpirifos

El plaguicida clorpirifos es un compuesto organofosforado de nombre químico de O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato con una masa molar de 350,6 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Es un insecticida y acaricida organofosforado de amplio espectro utilizado en la agricultura en general. En la Figura 6 se muestra la estructura de clorpirifos.

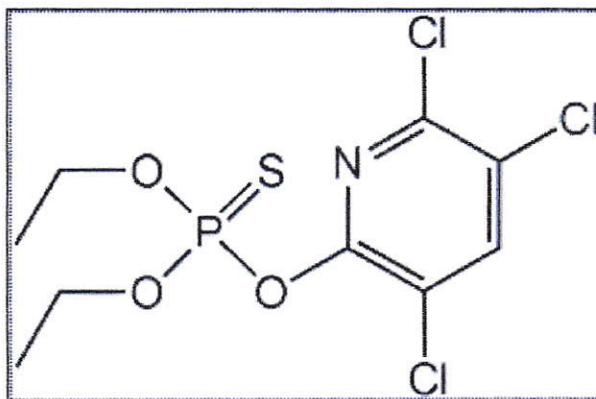


Figura 6. Estructura química de Clorpirifos $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$.

Este compuesto se adhiere fácilmente a las partículas del suelo dada su baja solubilidad en agua, $1,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, en base a esto se espera que tenga un alto potencial de bioacumulación. La degradación de este producto se produce tanto por procesos bióticos como abióticos, en ambos casos la mayor parte se degrada por hidrólisis, la vida media en agua es de 72 días. En el proceso de hidrólisis el enlace tioester se rompe y genera 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), este compuesto es su principal metabolito de degradación (ATSDR, 1997).

d. Azinfos metil

El compuesto *S*-(3,4-dihidro-4-oxobenzo[d]-[1,2,3]-triazin-3-ilmetil) *O,O*-dimetil fosforoditioato conocido como Azinfos metil que posee una masa molar de 317,33 g·mol⁻¹. Es un insecticida organofosforado que se adhiere fuertemente a las partículas de suelo, por lo que su movilidad y lixiviación es muy baja. Posee una solubilidad en agua de 20,9 mg·L⁻¹, en los cuerpos acuáticos superficiales se degrada con la actividad microbiana y los procesos de hidrólisis son importantes solo en medio alcalino con valores superiores a pH 11, su vida media estimada en agua es de solo 2 días, los principales productos de degradación son ácido antranílico y la benzamida, el potencial de bioacumulación es bajo y es difícil de encontrar en los medio acuáticos, en la Figura 7 se muestra la estructura química de Azinfos metil (Scout y Alex, 2008).

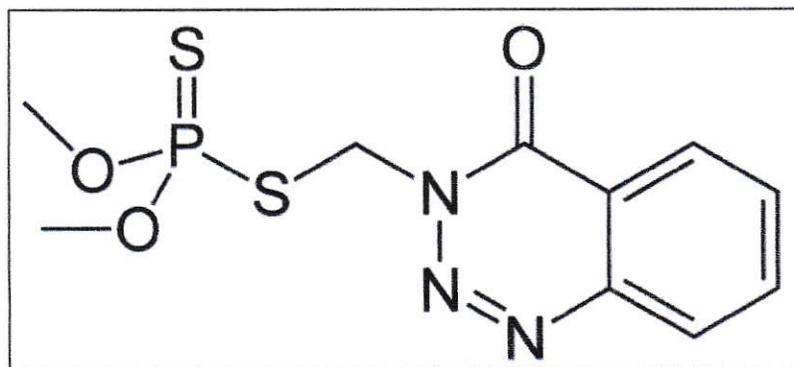


Figura 7. Estructura química de Azinfos metil C₁₀H₁₂N₃O₃PS₂

e. Carbaril

Metilcarbamato de 1-naftilo o Carbaril con un masa molar de $201,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Insecticida carbámico es ampliamente utilizado en el mundo, debido a su gran efectividad contra varias plagas que afectan a la agricultura en general, pero también afecta a diferentes tipos insectos beneficiosos y variadas especies de crustáceos, para los seres humanos es un compuesto carcinógeno. La estructura de este compuesto se muestra en la Figura 8 (Keigwin, 2003).

Carbaril presenta una vida media en agua de 2 días y es degradado por hidrólisis siendo su principal metabolito el 1-Naftol.

Este compuesto es insoluble en agua por lo cual se espera una alta bioacumulación debido a su liposolubilidad (Hidalgo, 1999).

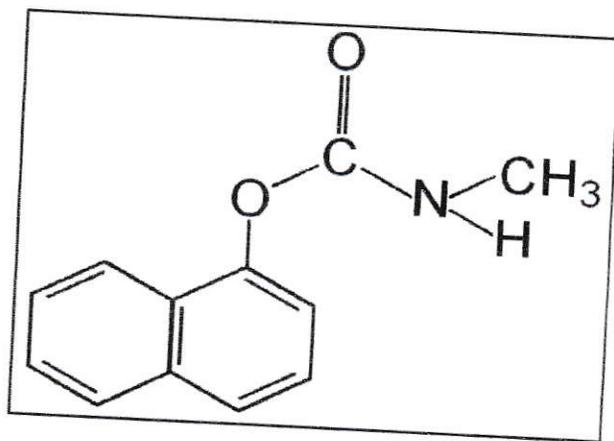


Figura 8. Estructura química de Carbaril $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_2$

f. Clorotalonil

Tetracloroisoflotalonitrilo es el nombre químico del producto clorotalonil su masa molar es de $265,89 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Es fungicida aromático policlorados, se utiliza en cultivos de hortalizas y también se aplica en otros cultivos agrícolas después del periodo de poda, para proteger los tejidos nobles que quedan expuestos. En los suelos presenta una movilidad baja o nula, tiene poca persistencia ya que es biodegradado en condiciones aerobias y anaerobias. En los sistemas acuáticos se puede adherir a las partículas de sedimento y a los sólidos suspendidos, su potencial de bioacumulación es principalmente bajo, pero en organismos acuáticos es alto, esto porque es muy poco soluble en agua con un valor de $0,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, y una vida media en este mismo medio de 38,1 días,. La estructura se muestra en la Figura 9 (Martínez, 2001).

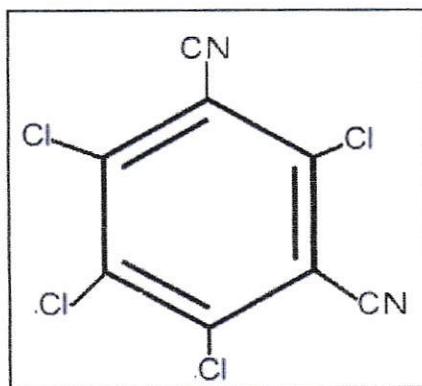


Figura 9. Estructura química de Clorotalonil $\text{C}_8\text{Cl}_4\text{N}_2$.

g. Azoxistrobin

Azoxistrobin es uno de los nombre del compuesto llamado Metil (E)-2{2-[6-(2-cianofenoxi)pirimidin-4-iloxi]fenil}-3- metoxiacrilato, con masa molar de 403.4 g·mol⁻¹. Su uso es como fungicida de la familia de las estrobilurinas que se aplica directamente al follaje, dada esta condición este plaguicida presenta una baja movilidad en los suelos. En los cuerpos acuáticos principalmente se adsorbe a los sedimentos y a los sólidos suspendidos, posee un bajo potencial de bioacumulación, en agua tiene una solubilidad de 6 mg·L⁻¹ y una vida media de 11 años.

En la Figura 10 se muestra la estructura química del compuesto (Oliva y col 2001).

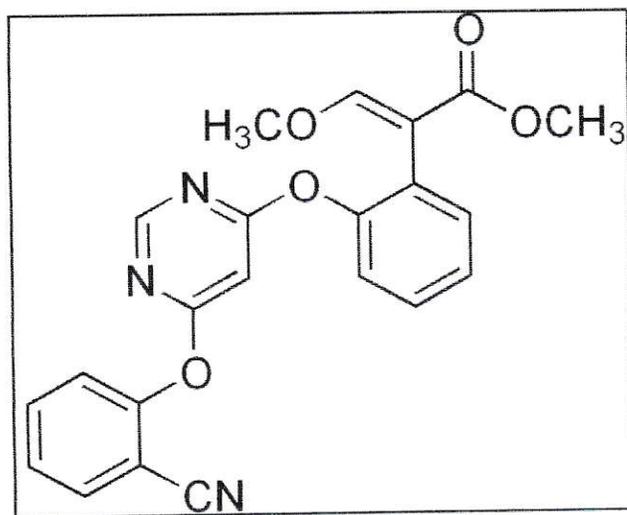


Figura 10. Estructura química de Azoxistrobin C₂₂H₁₇N₃O₅

h. Kresoxim metil

Kresoxim metil es un fungicida del tipo estrobilurinas, se nombra metil (E)-metoximino[α -(o-toliloxi)-o-tolil]acetato, masa molecular de $313,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Este compuesto se aplica directamente al follaje, tiene una baja movilidad en el suelo, no se espera que se volatilice desde los medios acuosos, medio en el cual es degradado rápidamente bajo condiciones aerobias teniendo una vida media de 1,2 días y solubilidad de $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, además se adsorbe rápidamente a las partículas de sólidos presentes en el agua, tiene un potencial de bioacumulación moderado. En la Figura 11 se muestra la estructura química de kresoxim metil (Oliva. 2001).

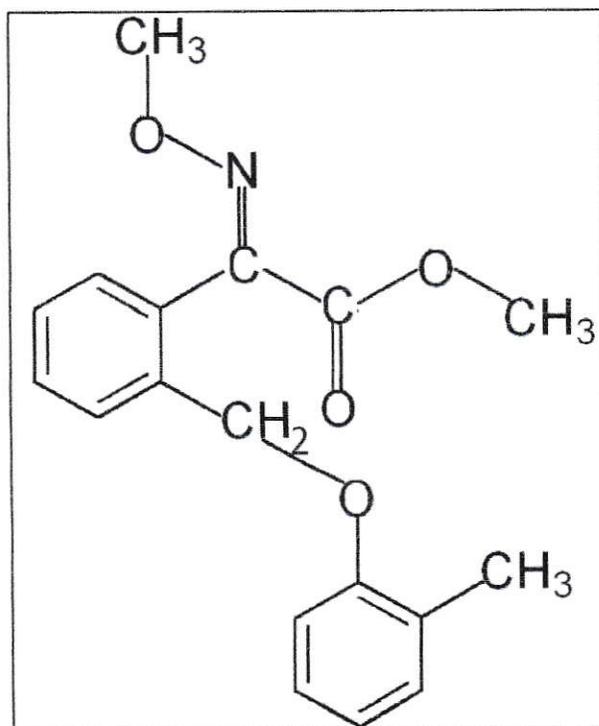


Figura 11. Estructura química de Kresoxim metil, $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{NO}_4$

1.5 Técnicas de análisis

1.5.1 Cromatografía

La cromatografía es un método de separación, se utiliza para la caracterización de mezclas complejas, la cual tiene aplicación en todas las ramas de la ciencia y la física. Es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes.

Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido gas, líquido o fluido supercrítico, moviliza a la muestra a través de una fase estacionaria que puede ser un sólido o un líquido. Los componentes de la mezcla interactúan en distinta forma con la fase estacionaria y la fase líquida. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y va permitiendo la separación. Una vez separados son llevadas al detector un medio líquido o gaseoso, generando una señal específica para que puede depender de la concentración y del tipo de compuesto llamada cromatograma (Skoog, Douglas. 1994).

1.5.2 Cromatografía de Gases (GC)

La cromatografía de gases es una técnica cromatográfica en la que la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de una fase móvil de gas inerte. A diferencia de los otros tipos de

cromatografía, la fase móvil no interactúa con las moléculas del analito; su única función es la de transportarlos a través de la columna. Los equipos de cromatografía constan de diversos componentes como el gas portador, el sistema de inyección de muestra, la columna (dentro de un horno), y el detector, esto se ilustra en la Figura 12. (Skoog Douglas A. 1994).

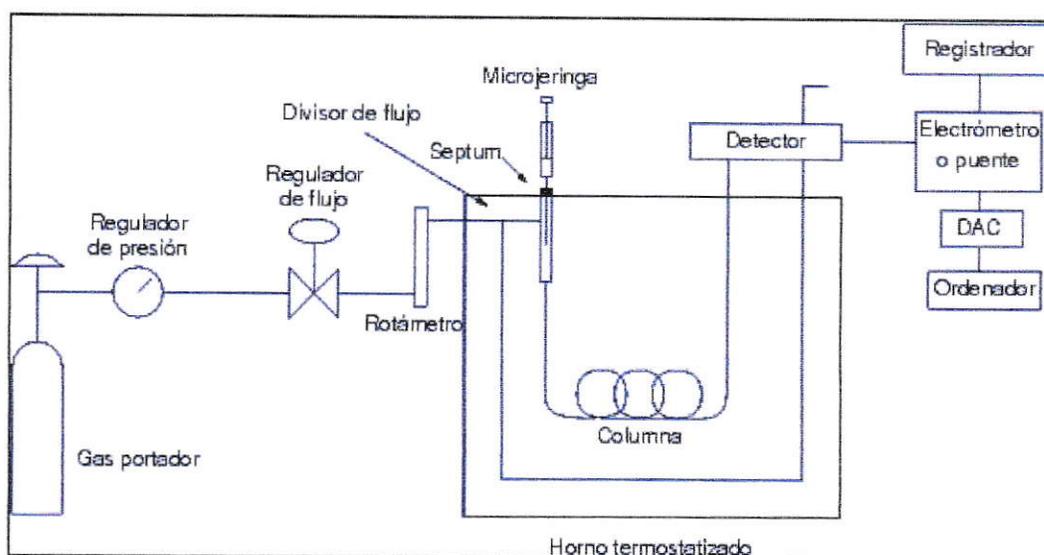


Figura 12. Esquema general del funcionamiento de Cromatografía de Gases

En este trabajo se utilizó un detector de captura de electrones (ECD) el que opera casi de la misma forma que un contador proporcional para la medida de radiación X. En este caso el efluente de la columna pasa sobre un emisor β , como níquel-63 o tritio (adsorbido sobre una lámina de platino o de titanio). Un electrón del emisor provoca la ionización del gas portador (con frecuencia se trata de nitrógeno) y la producción de una ráfaga de electrones. De este proceso de ionización, en ausencia de especies orgánicas,

resulta una corriente constante entre un par de electrodos. Sin embargo, la corriente disminuye en presencia de moléculas orgánicas con átomos electronegativos. La respuesta es poco lineal, a no ser que el potencial a través del detector se aplique en forma de impulsos (McNair y Miller, 1998).

El detector de captura de electrones es de respuesta selectiva, siendo muy sensible a las moléculas que contienen grupos funcionales electronegativos tales como halógenos, peróxidos, quinonas, y grupos nitro; en cambio, no es sensible a grupos funcionales como aminas, alcoholes e hidrocarburos. Una aplicación importante del detector de captura de electrones es la detección y determinación de insecticidas clorados.

Los detectores de captura de electrones son altamente sensibles y tienen la ventaja de no alterar la muestra de manera significativa (a diferencia del detector de llama). Por otra parte, su intervalo lineal de respuesta normalmente se limita a unos dos órdenes de magnitud (Skoog Douglas. 1994).

1.5.3 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica experimental que permite la medición de iones derivados de moléculas. El espectrómetro de masas es un instrumento que permite analizar con gran precisión la composición de diferentes elementos químicos e isótopos atómicos, separando los núcleos atómicos en función de su relación masa-carga (m/z). Se puede utilizar para identificar los diferentes elementos químicos que forman un compuesto, o para determinar el contenido isotópico de diferentes elementos en un mismo compuesto. (Bubbert, Jennet, 2002).

El acoplamiento de la técnica de espectrometría de masas a la cromatografía, no tan sólo sirve como detector sino que también para identificar compuestos desconocidos, cuantificar compuestos conocidos, y para elucidar la estructura y propiedades químicas de las moléculas. El detector registra la carga inducida o la corriente producida cuando un ión pasa cerca o golpea una superficie, en un instrumento la señal es producida en el detector durante la trayectoria del ión y producirá un espectro de masa, un archivo de m/z en el cual los iones están presentes. La identificación misma se produce por las diversas electrólisis que suceden en el proceso, en las cuales los espectros de masas generados son comparados con bases de datos compuestos puros en especies de bibliotecas de compuestos con sus respectivos espectros.

Los espectros se generan por la ionización que sufren los compuestos orgánicos al ser sometidos a un haz de energía superior a su potencial de ionización (Watson, 1997), en donde se produce el ión molecular M^{*+} debido a la pérdida de uno de los

electrones de valencia, y es este ión molecular es el que genera la masa molar del compuesto (Oriol, y Del Castillo 1998).

Luego de la etapa de ionización, sigue una de aceleración por campo eléctrico, donde una fracción de los iones moleculares, formados en la ionización los que poseen generalmente carga positiva única, se transforma en un flujo de iones que adquiere una velocidad producida por un campo magnético. Dado que la gran mayoría de las moléculas formadas son de carga positiva se puede lograr una dispersión efectiva de base a la relación fundamental en esta técnica de análisis masa/carga (m/z), provocada por lo que se define como un analizador de masas, que utiliza un campo eléctrico o magnético para afectar la trayectoria o la velocidad de las partículas cargadas de una cierta manera (Oriol y Del Castillo, 1998). La fuerza ejercida por los campos eléctricos y magnéticos es definida por la fuerza de Lorentz

$$\vec{F} = q(\vec{E} + \vec{v} \times \vec{B})$$

Donde E es la fuerza del campo eléctrico, B es la inducción del campo magnético, q es la carga de la partícula, v es su velocidad y \times simboliza el producto cruz o producto vectorial. Todos los analizadores totales utilizan las fuerzas de Lorentz de una manera u otra en la determinación de masa/carga, estática o dinámicamente. Los iones incorporan un campo magnético o campo eléctrico que dobla las trayectorias del ión dependientes en su masa y carga, desviando el traslado más rápido de iones más ligeros. Así, el analizador dirige las partículas al detector variando un campo eléctrico o magnético que se basa en el cociente masa/carga (m/z).

Cabe señalar que la espectrometría de masas es una herramienta eficiente para la comprobación de los analitos que se buscan en las muestras, pero este detector carece de alta sensibilidad comparado con otros detectores (Bubbert y Jennet, 2002).

1.5.4 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La Cromatografía líquida de HPLC (High performance liquid chromatography) es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. Dentro de la cromatografía existe dos tipos la cromatografía de fase normal y la de fase inversa (Abbott y Andrews, 1970)

1.5.4.1 Cromatografía líquida en fase normal

La cromatografía de fase normal (NP-HPLC) fue el primer tipo de sistema HPLC utilizado en el campo de la química, y se caracteriza por separar los compuestos en base a su polaridad. Esta técnica utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil apolar, y se utiliza cuando el compuesto de interés es bastante polar. El compuesto polar se asocia y es retenido por la fase estacionaria. La fuerza de adsorción aumenta a medida que aumenta la polaridad del compuesto y la interacción entre el compuesto polar y la fase estacionaria polar (en comparación a la fase móvil) aumenta el tiempo de retención (Abbott y Andrews, 1970).

La fuerza de interacción no sólo depende de los grupos funcionales del compuesto de interés, sino también en factores estéricos de forma que los isómeros estructurales a menudo se pueden diferenciar el uno del otro. La utilización de disolventes más polares en la fase móvil disminuye el tiempo de retención de los compuestos mientras que los disolventes más hidrofóbicos tienden a aumentar el tiempo de retención (Katime y col, 1998).

Dentro de los parámetros importantes de la cromatografía líquida están los valores de presión, rangos de caudales entre 0,1 y 10 mL·min⁻¹, la columna debe estar dentro de un horno para descartar variaciones de la viscosidad de los solventes producto de la temperatura.

1.5.4.2 Cromatografía líquida en fase inversa

La HPLC de fase inversa (RP-HPLC) consiste en una fase estacionaria apolar y una fase móvil de polaridad moderada. Una de las fases estacionarias más comunes de este tipo de cromatografía es la sílica tratada con RMe₂SiCl, donde la R es una cadena alquil tal como C₁₈H₃₇ ó C₈H₁₇. El tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente (Abbott y Andrews, 1970).

El tiempo de retención (t_r) aumenta con la adición de disolvente polar a la fase móvil y disminuye con la introducción de disolventes más hidrofóbicos. La cromatografía de fase inversa es tan utilizada que a menudo se lo denomina HPLC sin

ninguna especificación adicional. Esta técnica se basa en el principio de las interacciones hidrofóbicas que resultan de las fuerzas de repulsión entre un disolvente relativamente polar, un compuesto relativamente apolar, y una fase estacionaria apolar (Katime y col, 1998).

Las características del compuesto de interés juegan un papel muy importante en la retención. En general, un compuesto con una cadena alquil larga se asocia con un tiempo de retención mayor porque aumenta la hidrofobicidad de la molécula. Aun así, las moléculas muy grandes pueden ver reducida la interacción entre la superficie del compuesto y la fase estacionaria. El tiempo de retención aumenta con el área de superficie hidrofóbica que suele ser inversamente proporcional al tamaño del compuesto. Los compuestos ramificados suelen eluir más rápidamente que sus isómeros lineales puesto que la superficie total se ve reducida

Otra variable importante es el pH puesto que puede cambiar la hidrofobicidad del compuesto. Por este motivo, la mayoría de métodos utilizan un tampón como fosfato de sodio por controlar el valor del pH. Estos tampones controlan el pH, pero también neutralizan la carga o cualquiera resto de silica de la fase estacionaria que haya quedado expuesta y actúan como contra iones que neutralizan la carga del compuesto. El efecto de los tampones sobre la cromatografía puede variar, pero en general mejoran la separación cromatográfica (Abbott y Andrews, 1970).

1.5.5 Detector de fluorescencia

Este detector funciona por medio de un detector fotoeléctrico colocado de forma perpendicular al haz de excitación.

Para poder obtener una buena respuesta del detector de fluorescencia se debe tener un analito autofluorescente o derivatizar dicho compuesto para inducir una fluorescencia (Katime y col, 1998).

El análisis de estas muestras se produce por medio de una luz de excitación la cual no interfiere en la señal de respuesta, la respuesta que presenta el analito estimulado por dicha luz se conoce como luminiscencia que es la emisión de luz de una sustancia estimulada, esta emisión ocurre cuando la luz de excitación produce que los electrones del analito suban a un nivel energético mas alto, lo que produce la señal es la energía en forma de luz que la sustancia emite cuando el electrón excitado vuelve a su estado basal de energía (estado inicial). El proceso de fluorescencia se caracteriza si la emisión de energía por parte del analito se detiene cuando cesa la luz de excitación, en la Figura 13 se muestra un esquema general del proceso de fluorescencia (Acuña y col 2006).

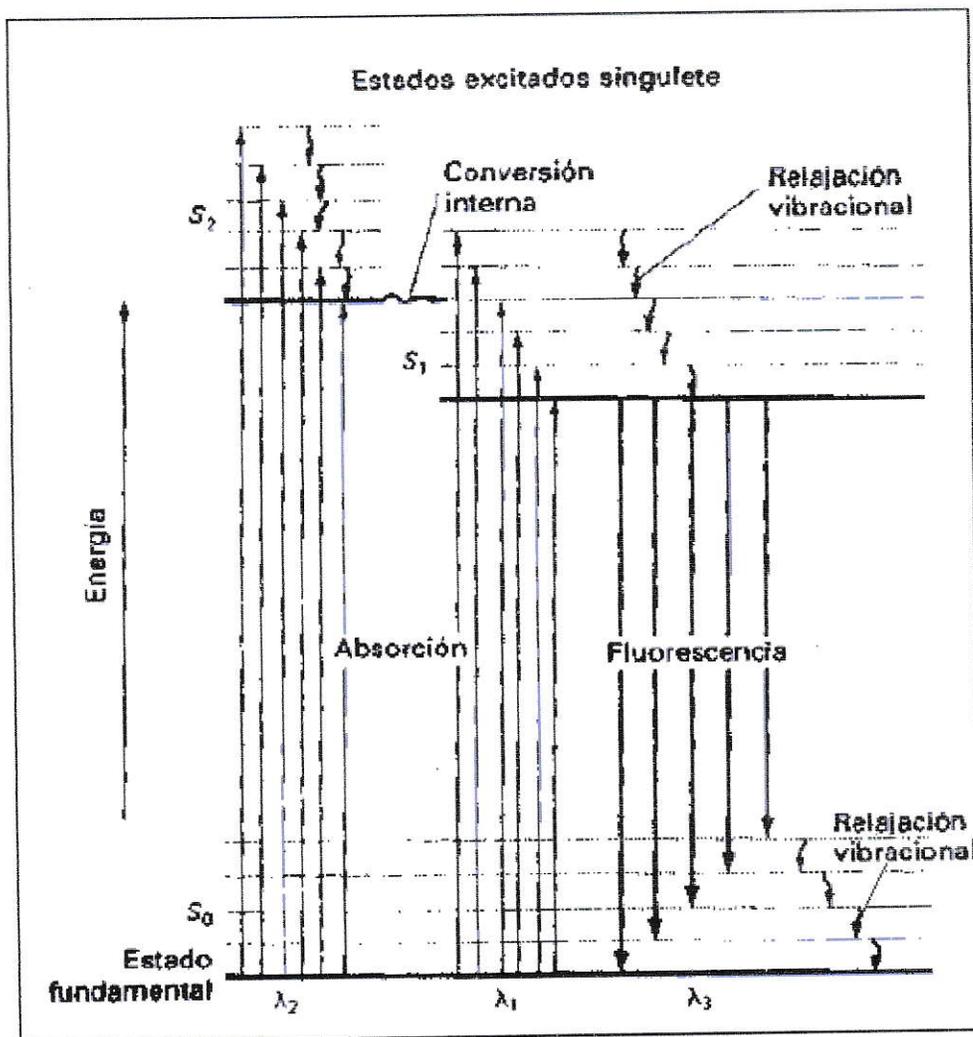


Figura 13. Esquema general del proceso de fluorescencia.

Dentro de este proceso encontramos la relajación vibracional entre los distintos niveles de energía vibracionales (Figura 13). Este proceso ocurre durante las colisiones entre moléculas excitadas y las moléculas del disolvente. Lo que ocurre es que el exceso de energía radiante se transfiere a las moléculas de disolvente, esta radiación que se produce durante la relajación vibracional es un proceso no radiante por lo que no influye

en la señal obtenida ni el proceso de análisis, además el proceso tiene un tiempo de vida media de 10^{-5} s (Acuña y col 2006)..

Los actuales detectores de fluorescencia funcionan con múltiples longitudes de ondas, de esta forma el detector de fluorescencia asegura máxima selectividad y sensibilidad para concentraciones bajas y también para la detección de impurezas. Estos detectores funcionan con longitudes de ondas entre 200 y 900 nm.

Algunas de las características deseables de un detector de fluorescencia son:

- a. Una cubeta de flujo, para producir una menor dispersión y pérdida de luz, menor volumen y un mayor camino óptico, con el fin de obtener una sensibilidad máxima
- b. Barrido tridimensional de espectros para un desarrollo de métodos y una optimización más rápida, y una identificación de picos mejorada.
- c. Una cubeta de flujo iluminada axialmente para mejorar la absorción de la luz y obtener una mayor sensibilidad.
- d. Funcionamiento con poco ruido, que reduce la pérdida de luz gracias a los dispositivos ópticos y la utilización de espejos, en lugar de lentes, para minimizar la dispersión
- e. Referencia de calibración con erbio integrado, que garantiza la exactitud de la longitud de onda

1.6 Técnicas de extracción

La extracción es un procedimiento que separa una sustancia de su matriz ya sea por procesos de lixiviación o sustancias inmiscibles, con distinto grado de solubilidad y que están en contacto a través de una interfase. La relación de las concentraciones de dicha sustancia en cada uno de los disolventes, a una temperatura determinada, es constante. Esta constante se denomina coeficiente de reparto y puede expresarse como:

$$K = \frac{[sustancia_1]}{[sustancia_2]}$$

Donde [sustancia₁] es la concentración de la sustancia que se pretende extraer, en el primer disolvente y, análogamente [sustancia₂] la concentración de la misma sustancia en el otro disolvente.

1.6.1 Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido es, junto a la destilación, la operación básica más importante en la separación de mezclas homogéneas líquidas. Consiste en separar una o varias sustancias disueltas en un disolvente mediante su transferencia a otro disolvente insoluble, o parcialmente insoluble, en el primero. La transferencia de materia se consigue mediante el contacto directo entre las dos fases líquidas. Una de las fases es dispersada en la otra para aumentar la superficie interfacial y aumentar el caudal de materia transferida (Universidad Autónoma de Madrid, 2006).

En un proceso de extracción líquido-líquido se denomina *liquido portador* a la disolución cuyos componentes se pretende separar (A+C), *disolvente* al liquido que se va a utilizar para separar el o los componentes deseados (B), *extracto* a la disolución con el soluto recuperado (A+B), y se denomina refinado al liquido o solución ya tratada por el proceso de extracción (C). En la Figura 14 se muestra un esquema simple del proceso de extracción.

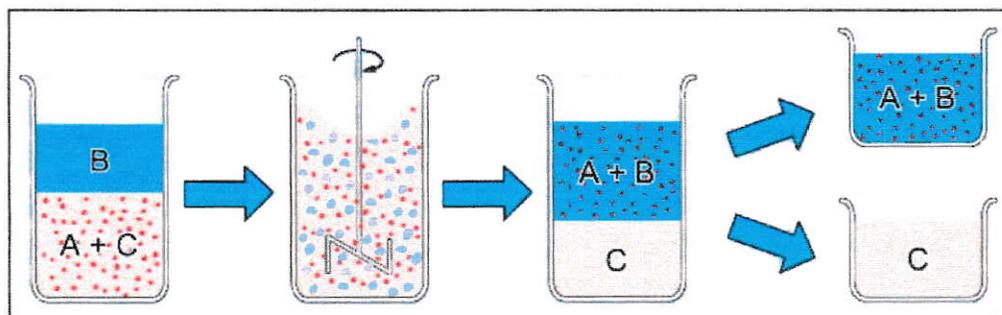


Figura 14. Esquema general del proceso de extracción líquido- líquido

En el proceso de extracción hay factores que se deben considerar, entre ellos la solubilidad del o los analitos en estudio en cada uno de los líquidos inmiscibles que participan del proceso de extracción, para esto es necesario conocer valores de solubilidad en agua de cada uno de los componentes y además una constante conocida como coeficiente de reparto (K_{ow}), que indica la relación de cómo se reparte una determinada sustancia entre dos sustancias inmiscibles, esta constante se obtiene al medir la cantidad de analito en que se disuelve en una fracción de octanol y la cantidad que se disuelve en agua estando los tres compuesto en contacto directo. A este estado o

interacción de los tres compuestos del proceso se llama equilibrio ternario. La constante se denomina K_{ow} cuando la distribución es entre octanol y agua (octanol/water), la forma general es K_d la cual tiene un valor para cada compuesto con el respectivo solvente orgánico utilizado (Henley. y Seader, 1988).

Como estos valores suelen ser altos para sustancias orgánicas se utiliza el valor del logaritmo de esta constante que también se denomina como P, el valor que se encuentra generalmente es el de Log P, mientras más grande sea este valor mas lipofílica será la sustancia. Para sustancias insolubles en agua este valor es indeterminado por razones matemáticas (Henley. y Seader, 1988).

HIPOTESIS

Dado el importante aumento de las actividades agrícolas en la VI Región del país, se espera encontrar residuos contaminantes de plaguicidas en aguas destinadas para el riego en un sector vitivinícola de la zona, tomando como límite el valor normado para Carbaril en la legislación chilena

II.- OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

- Desarrollar un método analítico para la detección y cuantificación de plaguicidas en aguas de riego, utilizando técnicas cromatográficas.

2.2 Objetivos específicos

1. Estudiar y optimizar un método de extracción líquido- líquido de plaguicidas en aguas de riego.
2. Optimización de la técnica analítica de cromatografía en la detección de plaguicidas. (GC-MS y HPLC con fluorescencia)
3. Estudiar y analizar los residuos de plaguicidas en aguas de riego

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Recolección de las muestras de aguas

Las muestras de agua que se utilizaron en este estudio fueron recolectadas en la localidad de Apalta, comuna Santa Cruz, VI región. Los cursos de agua estudiados corresponden a canales de riego de dos predios agrícolas dedicados a la producción de vides para la producción de vino, estos predios son: Viña Ventisquero (viña V) y Viña Neyen (viña N).

Las muestras de agua fueron tomadas en botellas de vidrio oscuras, las cuales fueron conservadas en contenedores fríos, manteniendo una temperatura promedio de inferior a 4 °C, las botellas en una primera instancia fueron ambientadas con el agua del canal a analizar.

Los sitios de muestreo escogidos en este estudio fueron los siguientes:

Ventisquero cero (V0): este sitio corresponde al punto referencia para esta viña, debido a la baja intervención agrícola del sector y además considerando la accesibilidad al punto de muestreo, Figura 15.



Figura 15. Ventisquero cero (V0), sitio de referencia

Ventisquero uno (V 1): en este punto el canal de riego acumula varios efluentes, los cuales provienen de otros predios agrícolas, la muestra se tomó antes de que el canal cruzará un camino, Figura 16.

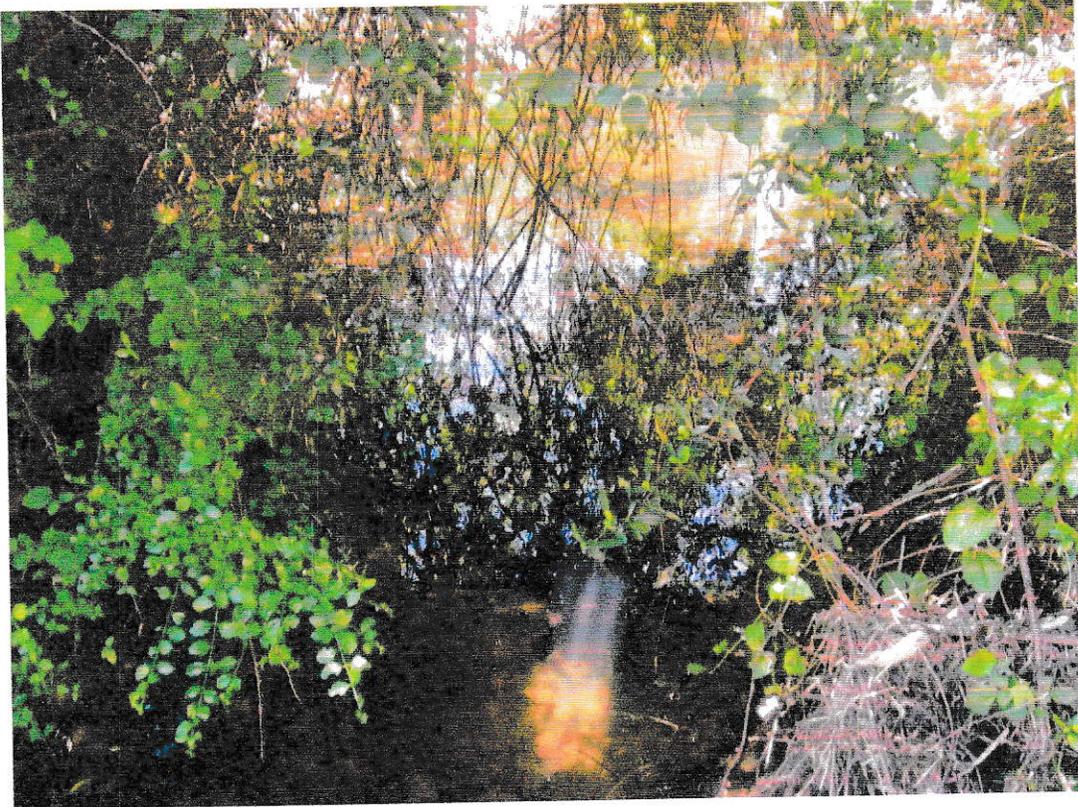


Figura 16. Ventisquero punto uno V 1

Neyen cero (N0): este lugar de muestreo se encuentra en la zona alta de la formación montañosa que rodea el sector, dadas estas condiciones la muestra de agua fue recogida por personal de la viña.

Neyen uno (N1): este canal se encuentra cercano a varias plantaciones de vides, en el canal se encuentra una especie de barrera vegetal y conformada principalmente por arbustos de tamaño mediano, Figura 17.



Figura 17. Sitio uno de viña Neven (N 1)

Neyen estanque (Ne): este lugar corresponde al estanque donde se acumula agua para el riego en los meses de primavera y verano, él estanque se encuentra en la estación de meteorología de la viña, las aguas de este estanque provienen principalmente del río Tinguiririca y de algunos canales que provienen de los cerros aledaños, Figura 18.



Figura 18. Estanque de Viña Neyen (N e)

Río Tinguiririca (RIO): el lugar se encuentra entre las dos estaciones DGA (Dirección General de Aguas) que se ubican en el río, este punto se eligió debido a que metros más abajo del cauce del río se encuentra una bomba extractora de agua la cual es utilizada para el riego, Figura 19.



Figura 19. Río Tinguiririca.

3.2 Lavado de material de vidrio

Para el análisis de plaguicidas se siguió el siguiente protocolo de lavado, según el procedimiento del Centro de Investigación en Contaminación Ambiental (CICA), Universidad de Costa Rica, 2006.

- a. Se preparó una solución de hidróxido de potasio etanolico al 5 %, la cual se obtiene disolviendo 50 g de hidróxido de potasio (KOH, Merck pa) en 1 L de etanol absoluto (C₂H₅OH).
- b. El material de vidrio se sumergió en la solución de KOH durante un periodo aproximado de dos horas.
- c. Después de este periodo el material es enjuagó con abundante agua potable, luego con agua desionizada tres veces, finalmente se enjuaga con acetona y se deja secar a temperatura ambiente.
- d. El material es tapado con papel de aluminio y es guardado para su utilización.

3.3 Plaguicidas en estudio

Para este estudio se utilizan los siguientes plaguicidas: Diazinon, Carbaril, Sulfotep, Clorpirifos, Clorotalonil, Azinfos metil, Azoxistrobin, Kresoxim metil, los plaguicidas son de una pureza aproximada del 98% entregada por el productor. Chemservice, US.

3.4 Preparación de los estándares

Los estándares sólidos Clorpirifos y Azinfos metil fueron disueltos en n-hexano (Merck suprasolv), Carbaril, Azoxistrobin, Clorpirifos, Clorotalonil, fueron disueltos en acetona (Merck suprasolv) debido a que estos son insolubles o muy poco solubles en n-hexano.

Los estándares líquidos Sulfotep y Diazinón venían en ampollas, las que fueron diluidas con acetona.

Para todos los plaguicidas se prepararon soluciones de $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, guardadas a menos de 5°C , de estas soluciones se prepararon otras de $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, y de estas se prepararon las respectivas curvas de calibración. Para el análisis cromatográfico se realizaron estándares múltiples (St), cuyas concentraciones se presentan en la Tabla 1

Tabla 1. Concentración de los estándares plaguicidas (St) utilizados en las curvas de calibración ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

Compuesto	St 1	St 2	St 3	St 4	St 5	St 6
Carbaril	0,01	0,05	0,07	0,1	0,5	1
Sulfotep	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7
Diazinon	0,03	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
Clorotalonil	0,01	0,02	0,05	0,1	0,15	0,2
Clorpirifos	0,01	0,02	0,05	0,1	0,15	0,2
Kresoxim metil	0,01	0,02	0,05	0,1	0,15	0,2
Azinfos metil	0,07	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Azoxistrobin	0,03	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4

3.5 Determinación de los tiempos de retención (t_r)

Se realizaron pruebas con los estándares de cada plaguicida en el cromatógrafo de gases usando una concentración de $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (GC Agilent 6890), usando un detector de captura de electrones (μECD , Electron Capture Detector) y para su comprobación con un detector de masas (Agilent 5975B), exceptuando Carbaril cuyo análisis se realizó en un cromatógrafo líquido (HPLC), debido a que este compuesto se degrada con la temperatura haciendo dificultoso su análisis en GC.

Para la determinación de los tiempos de retención de los diferentes plaguicidas en cromatografía de gases se utilizó el siguiente programa de análisis: temperatura de columna de 300 °C, cámara de inyección a 50 °C, El μ ECD tuvo una temperatura de 30°C y en el detector de masa el cuadrupolo a 150°C y la Fuente a 230°C. El flujo de gas helio utilizado como gas transportador, un volumen de inyección de 2 μ L con el sistema de *splitless*. Se utilizó un programa de temperaturas.

Se inyectaron concentraciones cercanas a 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ con las cuales se determinaron tiempos de retención. Para bajas concentraciones se verificaron los t_R y el decrecimiento de la señal cromatográfica.

Para el análisis en HPLC se utilizó un equipo de cromatografía líquida de flujo binario (Waters 1525) y un detector de fluorescencia (Waters 2425), la detección se realizó en fase inversa bajo las siguientes condiciones: Fase móvil compuesta por acetonitrilo y agua 60:40, un flujo de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, volumen de inyección de 50 μ L, una columna C-18 de 15 cm y diámetro nominal de 3,9 μm , la detección se realizó a las siguientes longitudes de onda: excitación 227 nm y emisión 335 nm (Hidalgo y col, 1999)

Para determinar el tiempo de retención se utilizó una concentración de 3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, con esta concentración se obtuvo una gran señal después de esto se inyectó un estándar de concentración menor 0,1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, luego se realizaron inyecciones consecutivas de aumentando la concentración del estándar verificando el incremento de la señal obtenida, así se pudo comprobar que el tiempo de retención para el método de análisis de carbaril.

3.6 Determinación de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC)

Para la de determinación de los límites de detección y cuantificación se realizaron mediciones en la parte inferior del rango lineal de la curva de calibración.

Para la determinación de los límites de detección y cuantificación se graficaron las concentraciones del analito versus la respuesta (área del pico) promedio y se determinó la ecuación de esta recta, obteniendo de ella una estimación de la respuesta del blanco: Y_{bl} , que corresponde al intercepto de la curva de la zona baja. Posteriormente se obtuvo una segunda curva, graficando concentración de analito versus desviación estándar de las respuestas, de la ecuación de esta recta se obtuvo una estimación de la desviación estándar del blanco: S_{bl} , cuyo valor corresponde al intercepto de esta segunda curva (Mennickent y col, 2000).

Los límites de detección y de cuantificación se calcularon mediante las ecuaciones: límite de detección = $\frac{y_{bl} + 3S_{bl}}{b}$; límite de cuantificación = $\frac{y_{bl} + 10S_{bl}}{b}$ donde "b" es la pendiente de la curva de calibración inicial (Proakis, y Manolakis, 1998)

3.7 Extracción líquido- líquido

3.7.1 Determinación de los porcentajes de recuperación

Para el proceso de extracción se tomó una alícuota de 245 mL de agua desionizada un embudo de separación, a esta alícuota se le agregó 5 mL de estándar de las diferentes concentraciones, a esta mezcla se le agregaron 50 mL de solvente orgánico, el solvente orgánico Diclorometano (CH_2Cl_2 Merck suprasolv) la mezcla se agitó durante un minuto, evacuando los gases durante el proceso de agitación, se esperó aproximadamente cinco minutos para lograr una separación óptima de las dos fases, luego la fase orgánica se hizo pasar por sulfato de sodio (Na_2SO_4 Merck pa) sobre un filtro, ésta se recolectó en un balón de 250 mL. Se realizaron tres extracciones consecutivas con 25 mL de diclorometano.

Luego de recolectar la totalidad de las fases orgánicas se le adicionó 1 mL de isooctano (Merck suprasolv) y, se llevó a casi sequedad en un rota vapor, con baño de agua a 30 °C, a continuación se transpararon las muestras a tubos d ensayo graduados lavando el balón con pequeñas cantidades de n-hexano para las muestras que se analizaron por cromatografía de gases, y metanol para las muestras que se analizaron por HPLC, llegando a un volumen no superior a los 7 mL. Los tubos de ensayos se llevaron un baño maría a 30 °C y se les paso nitrógeno gaseoso, esto con el fin de evaporar los restos de solvente orgánico, llegando a un volumen aproximado de 2 mL para luego ser trasvasijadas a matraces de aforo de 5 mL. Luego se colocan en los viales y se leen en los respectivos cromatógrafos.

3.7.2 Extracción de las muestras

De cada una de las muestras de agua a analizar, se tomaron cinco alícuotas de 250 mL, de estas tres se destinaron para el análisis por GC, y dos para HPLC, a cada alícuota se le agregaron 50 mL de diclorometano (CH_2Cl_2 Merck suprasolv) la mezcla se agitó durante un minuto, evacuando los gases durante el proceso de agitación, se esperó aproximadamente cinco minutos para lograr una separación óptima de las dos fases, luego la fase orgánica se hizo pasar por sulfato de sodio (Na_2SO_4 Merck pa) sobre un filtro, la fase orgánica se recolectó en un balón de 250 mL. Se realizaron tres extracciones consecutivas con 25 mL de diclorometano.

Después de recolectadas la totalidad de las fases orgánicas se le adicionó aproximadamente 1 mL de isooctano (Merck suprasolv) y, se llevó casi a sequedad en un rota vapor, con baño de agua a 30 °C, a continuación se realizó un lavado del balón con pequeñas cantidades de n-hexano para las muestras que se analizaron por cromatografía de gases, y metanol para las muestras que se analizaron por HPLC, los enjuagues se dejaron en tubos de ensayo graduados llegando a un volumen no superior a los 7 mL. Los tubos de ensayos se llevaron un baño maría a 30 °C y se les paso nitrógeno gaseoso, esto con el fin de evaporar los restos de solvente orgánico, las muestras se llevaron a un volumen aproximado de 2 mL para luego ser trasvasijadas a matraces de aforo de 5 mL, se guardaron en viales de vidrio y se inyectaron en el equipo.

IV.- RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Validación del método analítico

Para construir las curvas de calibración se realizaron como mínimo tres muestras estándar de las que cada una se midió tres veces a continuación en las siguientes tablas (Tablas de 2 a la 9) se presentan las áreas obtenidas para cada plaguicida en la construcción de su curva de calibración, donde A1,2,3 representan las áreas promedio de cada muestra de estándar de cada concentración, DESV es la desviación estándar de los promedios, CV corresponde coeficiente de variación que se obtiene al dividir el valor de la desviación estándar por el promedio respectivo, CV % corresponde al porcentaje de variación de cada estándar.

Tabla 2. Áreas asociadas a las concentraciones de Carbaril

Concentración (mg·L ⁻¹)	A1	A2	A3	Promedio	DESV	CV	CV %
0,01	18490	18220	18320	18343,3	136,5	0,007	0,7
0,05	84030	84690	81345	83355,0	1771,7	0,021	2,1
0,07	109550	104435	106290	106758,3	2589,5	0,024	2,4
0,1	140120	138660	143465	140748,3	2463,4	0,018	1,8
0,5	687010	669835	677200	678015,0	8616,5	0,013	1,3
1,0	1425120	1405080	1373700	1401300,0	25917,6	0,018	1,8

Tabla 3. Áreas asociadas a las concentraciones de Sulfotep

Concentración (mg·L ⁻¹)	A1	A2	A3	Promedio	DESV	CV	CV %
0,2	260450	272394	273447	268763,67	7219,1	0,027	2,7
0,3	313126	297248	305988	305454,00	7952,5	0,026	2,6
0,4	394445	397848	402525	398272,67	4056,7	0,010	1,0
0,5	454745	437506	454207	448819,33	9801,3	0,022	2,2
0,6	464958	477514	472852	471774,67	6346,9	0,013	1,3
0,7	504541	519332	534411	519428,00	14935,2	0,029	2,9

Tabla 4. Áreas asociadas a las concentraciones de Diazinon

Concentración (mg·L ⁻¹)	A1	A2	A3	Promedio	DESV	CV	CV %
0,03	111004	117726	124780	117836,67	6888,7	0,058	5,8
0,05	202429	206502	200625	203185,33	3010,6	0,015	1,5
0,1	401962	430518	367671	400050,33	31467,1	0,079	7,9
0,2	789534	833144	857015	826564,33	34218,3	0,042	4,1
0,3	1219235	1207224	1230891	1219116,67	11833,9	0,010	1,0
0,4	1577848	1624433	1553756	1585345,67	35930,1	0,023	2,3

Tabla 5. Áreas asociadas a las concentraciones de Clorotalonil

Concentración (mg·L ⁻¹)	A1	A2	A3	Promedio	DESV	CV	CV %
0,01	2014635	1931661	1939054	1961783	45919,9	0,023	2,3
0,02	4688205	4695884	4959752	4781280	154608,7	0,032	3,2
0,05	11308008	11412733	11729304	11483348	219345,6	0,019	1,9
0,1	25422510	25468813	25876019	25589114	249543,3	0,010	1,0
0,15	41495791	42062615	42062487	41873631	327219,0	0,008	0,8
0,2	60014328	61010833	60446030	60490397	499731,8	0,008	0,8

Tabla 6. Áreas asociadas a las concentraciones de Clorpirifos

Concentración (mg·L ⁻¹)	A1	A2	A3	Promedio	DESV	CV	CV %
0,01	1371544	1428939	1434127	1411537	34731,7	0,025	2,5
0,02	2903755	2943873	3040793	2962807	70453,7	0,024	2,4
0,05	7328261	7388437	7575283	7430660	128810,2	0,017	1,7
0,1	14326916	14458599	14644043	14476519	159321,2	0,011	1,1
0,15	21899163	22107110	22204679	22070317	156045,8	0,007	0,7
0,2	29909207	30349304	30126952	30128488	220052,5	0,007	0,7

Tabla 7. Áreas asociadas a las concentraciones de Kresoxim metil

Concentración (mg·L ⁻¹)	A1	A2	A3	Promedio	DESV	CV	CV %
0,01	619315	613736	643075	625375	15580,1	0,025	2,5
0,02	1360866	1372450	1408853	1380723	25040,4	0,018	1,8
0,05	3105347	3073814	3180328	3119830	54714,0	0,018	1,8
0,1	6112414	6219161	6252740	6194772	73273,3	0,012	1,2
0,15	9365748	9413837	9494644	9424743	65136,4	0,007	0,7
0,2	12834258	12993589	12749391	12859079	123976,8	0,010	1,0

Tabla 8. Áreas asociadas a las concentraciones de Azinfos metil

Concentración (mg•L ⁻¹)	A1	A2	A3	Promedio	DESV	CV	CV %
0,07	568639	537967	537600	548068,67	17815,4	0,033	3,3
0,1	547760	560909	641172	583280	50564,9	0,087	8,7
0,2	1770854	1797818	1874062	1814245	53529,0	0,030	3,0
0,3	3689864	3793419	3942897	3808727	127209,2	0,033	3,3
0,4	5591328	5733886	5823941	5716385	117289,9	0,021	2,1
0,5	8518246	8803106	8525258	8615537	162477,6	0,019	1,9

Tabla 9. Áreas asociadas a las concentraciones de Azoxistrobin

Concentración (mg•L ⁻¹)	A1	A2	A3	Promedio	DESV	CV	CV %
0,03	685464	717829	798980	734091	58479,1	0,080	8,0
0,05	1901064	1993410	2109210	2001228	104293,0	0,052	5,2
0,1	5706164	5822881	5715244	5748096	64924,4	0,011	1,1
0,2	16176712	16063281	16668576	16302856	321760,5	0,020	2,0
0,3	26150272	26090318	26293675	26178088	104493,2	0,040	0,4
0,4	37016218	37439312	37800954	37418828	392768,8	0,010	1,0

De las Tablas anteriores se observa que las áreas asociadas a cada plaguicida tienen reproducibilidad tanto de área como de tiempos de retención los que se entregan a continuación. Los valores obtenidos de (CV %) para todas las áreas encontradas son menor a un 10%, lo que entrega seguridad de las curva de calibración que se realizaran con ellos posteriormente.

4.2 Análisis químico (t_R)

Los trabajos con los estándares entregaron los tiempos de retención (TR) de cada compuesto en estudio los cuales se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Tiempos de retención de los plaguicidas estudiados.

Compuesto	t_R (min)	Compuesto	t_R (min)
Sulfotep	$9,23 \pm 0,06$	Kresoxim metil	$18,51 \pm 0,03$
Diazinon	$10,52 \pm 0,03$	Azinfos metil	$27,98 \pm 0,02$
Clorotalonil	$11,10 \pm 0,02$	Azoxistrobin	$44,80 \pm 0,02$
Clorpirifos	$13,64 \pm 0,01$	Carbaril	$2,46 \pm 0,04$

Para la obtención de estos tiempos de retención en primer lugar se inyectaron por separado cada compuestos y en concentraciones superiores a $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ obteniendo la comprobación por espectrometría de masas, las cuales se muestran mas adelante, de los tiempos obtenidos para los plaguicidas analizados por cromatografía de gases, se puede observar que las señales aparecen en tiempos en los cuales no interfieren con la señal de otro compuesto, existiendo entre cada señal mas de 1 minuto de diferencia, excepto para las señales de Diazinon y Clorotalonil, las cuales tienen aproximadamente medio minuto de diferencia. En la Figura 20 se muestra que las bases de los picos de las señales, para Diazinon y Clorotalonil, no se solapan entre si y que son completamente diferenciables.

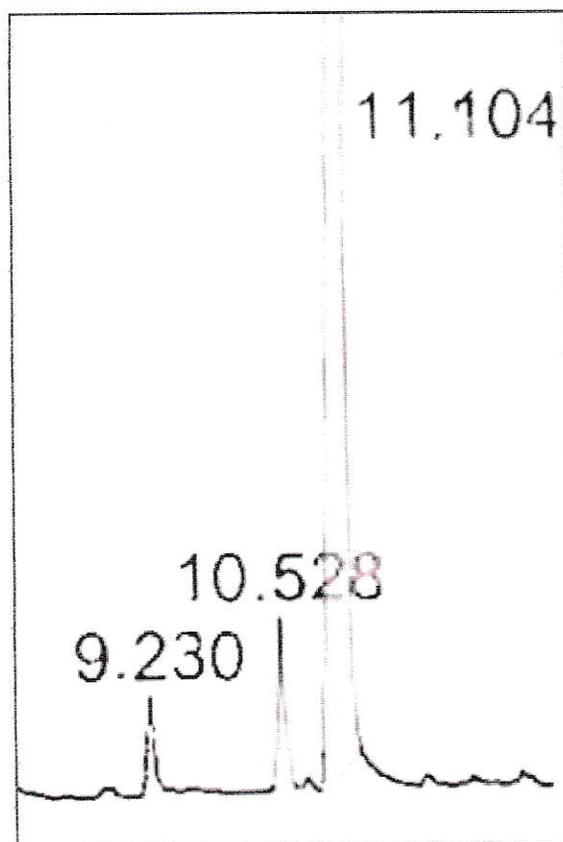


Figura 20. Amplificación de las señales de Sulfotep (9,230), Diazinon (10,528) y Clorotalonil (11,104)

Para la señal de Carbaril, la cual fue obtenida por cromatografía líquida de HPLC con detector de fluorescencia, se observó que la línea base del cromatograma no presenta señales que puedan influir con la señal de Carbaril, además la única señal observada aparte de la de Carbaril es una obtenida con un tiempo de 1 minuto, la cual no interfiere con la señal del analito en estudio, esto se expresa claramente en la Figura 21.

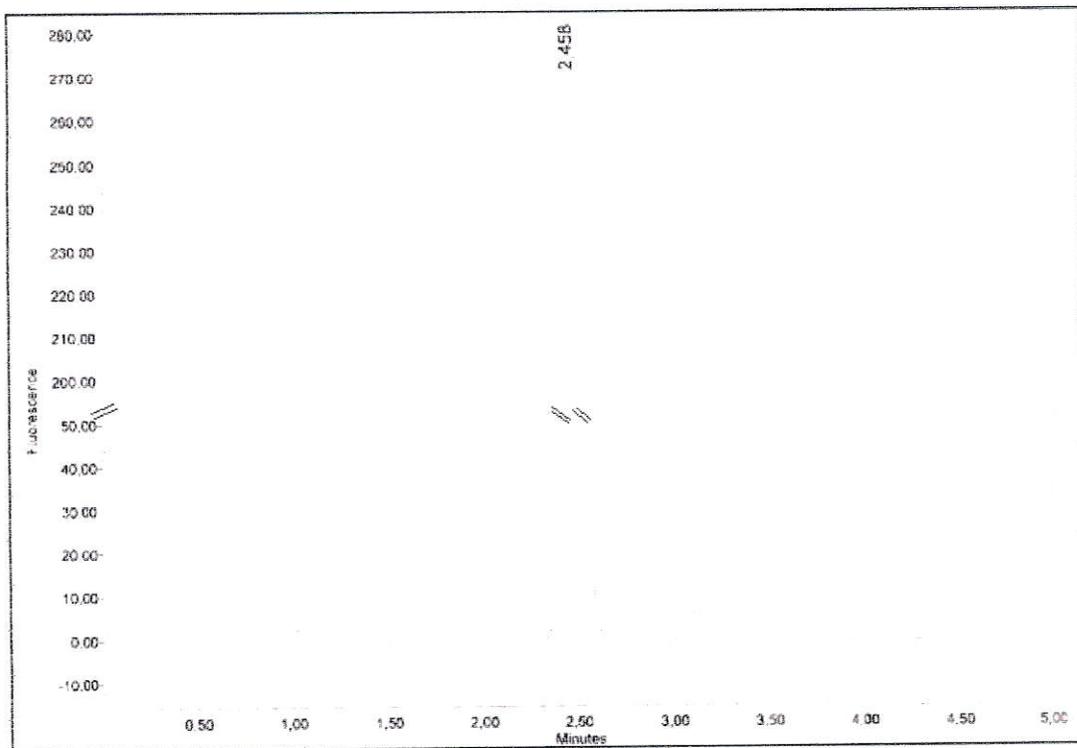


Figura 21. Amplificación cromatograma HPLC señal de carbaril

4.3 Curvas de calibración

De las concentraciones mostradas en la Tabla 2 se construyeron las curvas de calibración para cada plaguicida en estudio, los respectivos coeficientes de regresión lineal y sus ecuaciones asociada. Tabla 11.

Tabla 11. Ecuaciones y coeficientes de regresión de las respectivas curvas de calibración, de cada plaguicida.

Plaguicida	Ecuación	Coef de regresión
Carbaril	$y = 1 \cdot 10^6 x + 4905,8$	$R^2 = 0,9996$
Sulfotep	$y = 5 \cdot 10^5 x + 170293$	$R^2 = 0,9686$
Diazinon	$y = 4 \cdot 10^6 x + 6162,8$	$R^2 = 0,9994$
Clorotalonil	$y = 3 \cdot 10^8 x - 2 \cdot 10^6$	$R^2 = 0,9958$
Clorpirifos	$y = 1 \cdot 10^8 x - 151075$	$R^2 = 0,9995$
Kresoxim metil	$y = 6 \cdot 10^7 x - 24036$	$R^2 = 0,9994$
Azinfos metil	$y = 2 \cdot 10^7 x - 2 \cdot 10^6$	$R^2 = 0,9802$
Azoxistrobin	$y = 1 \cdot 10^8 x - 3 \cdot 10^6$	$R^2 = 0,9972$

En la Tabla 11 se muestran que para la mayoría de los plaguicidas analizados se obtuvieron buenas regresiones lineales, las cuales se reflejan en los valores de r^2 , el cual es el coeficiente de correlación lineal, estos valores deben fluctuar entre 0,995 y 1, las únicas excepciones en el desarrollo de este trabajo son las curvas de calibración para Sulfotep y Azinfos metil, cuyos valores son inferiores a los establecidos como buenos (Gallego, 1995) , para Sulfotep es 0.9686 y para Azinfos metil 0,9802, si bien estos

valores no son los óptimos se pueden considerar aptos para el análisis de muestras reales, la validación de estos datos se encuentran en el anexo A.

Otra observación relevante es que para compuestos como Clorpirifos, Clorotalonil, Kresoxim metil y Carbaril se detectan a concentraciones de 10 ppb, los cuales son muy buenos valores, considerando la legislación chilena, la cual acepta como valor máximo para aguas de riego concentraciones de 70 ppb (NCh n° 1333), este valor es referencial para Carbaril, ya que este es el único plaguicida normado para aguas de riego en nuestro país. Si consideramos la legislación ambiental de otros países u organizaciones internacionales como la Unión Europea que establece valores máximo para cada plaguicida individual de 0,1 ppb y como sumatoria de plaguicidas un valor de 0,5 ppb. (Real Decreto 140/2003)

A continuación se muestran dos ejemplos de los gráficos de las curvas de calibración, estos son para Carbaril desarrollado en HPLC (Figura 22), y Clorpirifos el cual fue desarrollado en cromatografía de gases (Figura 23).

a. Carbaril

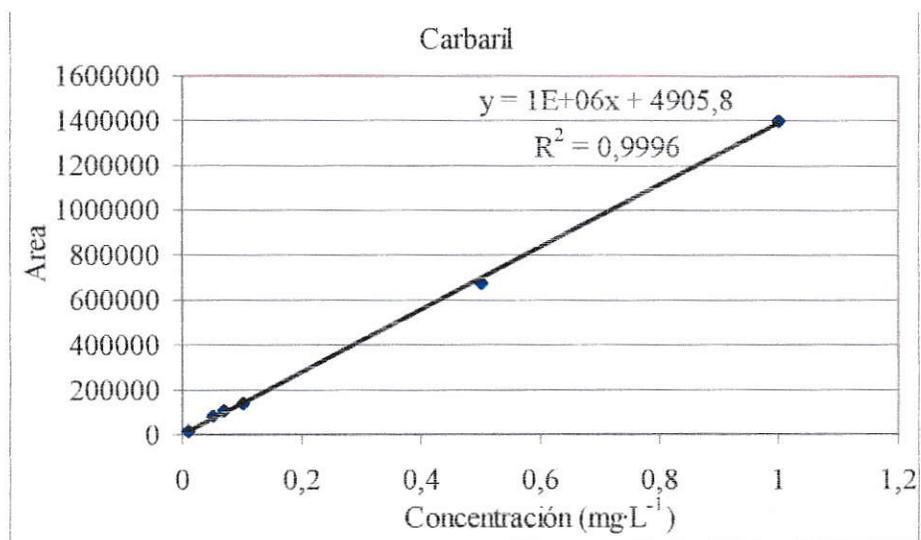


Figura 22. Curva de calibración para carbaril realizada en HPLC

b. Clorpirifos

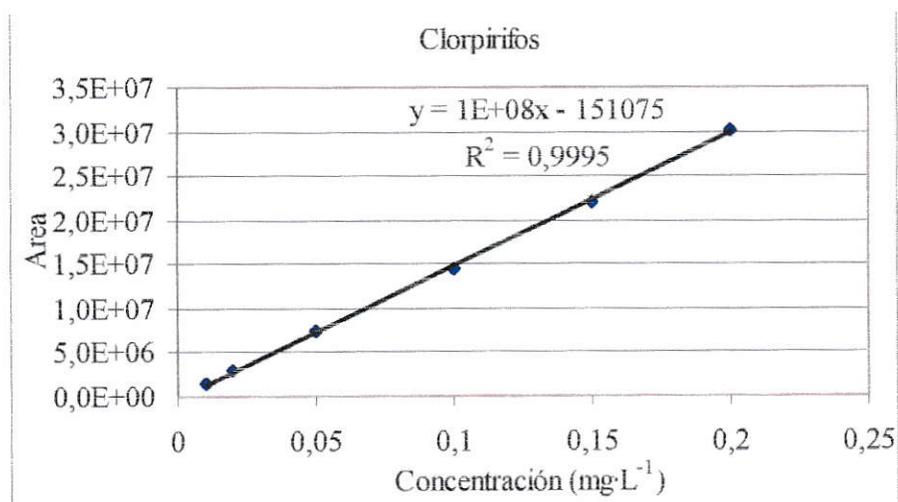


Figura 23. Curva de calibración de Clorpirifos realizada en Cromatógrafo de Gases

4.4 Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)

Para la obtención de estos resultados se realizó un gráfico de concentración versus área en la zona mas baja de la curva de calibración, y otro de concentración versus desviación estándar de las respuestas de cada concentración, en la Figura 24 se muestra un ejemplo utilizando los valores de Carbaril, la validación de los datos se encuentra en el anexo A., en la siguiente tabla (Tabla 12) se muestran los valores obtenidos.

Tabla 12. Valores de límites de detección (LD) y cuantificación (LC).

Plaguicida	LD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LC ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Carbaril	3,1	3,5
Sulfotep	216,0	225,0
Diazinon	3,2	10,0
Clorotalonil	1,1	1,6
Clorpirifos	0,3	0,6
Kresoxim metil	2,5	3,0
Azinfos metil	9,0	9,1
Azoxistrobin	17,0	21,6

En la Tabla 12 se presentan los resultados obtenidos para los límites de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) para el método y las condiciones de los equipos cromatográficos utilizados. De esta Tabla observamos que los valores obtenidos son muy variables variando desde los $0,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para Clorpirifos, hasta los $216 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

para Sulfotep, la diferencia para estos valores se explican por la sensibilidad del detector utilizado, la estructura y composición molecular de cada compuesto, por ejemplo para el caso de clorpirifos es una molécula que cuenta con átomos electronegativos los cuales entregan muy buenos resultados analíticos con el detector utilizado (detector de captura de electrones), en el caso de Sulfotep es una molécula un poco mas simple, es lineal sin anillos aromáticos, un organofosforados que posee centros poco electronegativos, por lo cual entregara el detector es menos sensible para este compuesto.

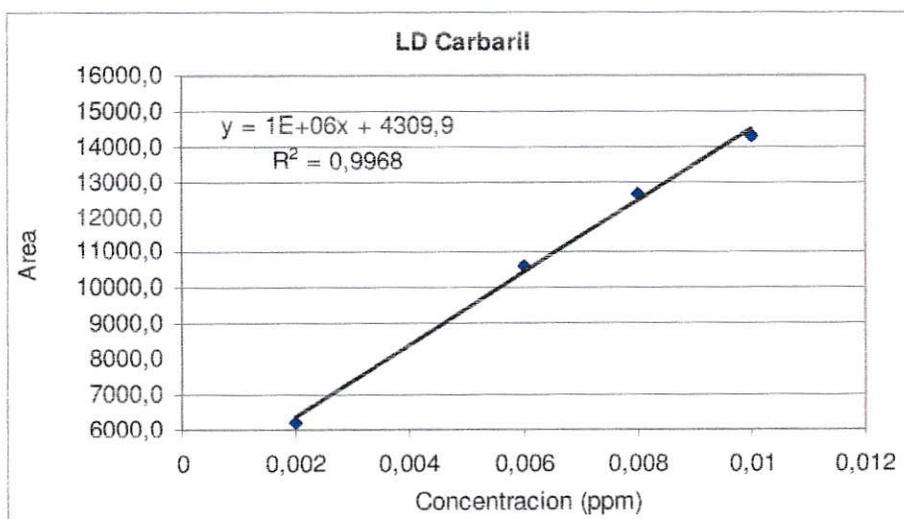


Figura 24. Gráfico de zona baja de la curva de calibración de carbaril.

De este gráfico obtenemos el valor de la señal del blanco (y_{bl}) la que corresponde al intercepto con el eje "y", este valor es 4309,9, además se realizo otra curva en la cual se grafico la desviación estándar asociada a cada señal obtenida para las

diferentes concentraciones utilizadas en el límite de detección, para el caso de carbaril la curva estimada fue, $y = 55988x - 10,57$, donde el intercepto de esta ecuación corresponde al valor de la desviación estándar del blanco (s_{bl}). Con estos antecedentes procede a realizar el cálculo de los límites de detección y cuantificación, con las siguientes ecuaciones

$$\text{Límite de detección} = \frac{y_{bl} + 3s_{bl}}{b}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{y_{bl} + 10s_{bl}}{b}$$

Donde b corresponde a la pendiente de la curva de calibración.

Los detalles de los cálculos se encuentran en el anexo B.

4.5 Porcentajes de recuperación del proceso de extracción

Para la determinación de la existencia de residuos de plaguicidas se realizó el proceso de extracción de los diferentes plaguicidas con las mismas concentraciones utilizadas para el desarrollo de las curvas de calibración, para poder determinar la eficiencia de recuperación para cada uno de ellos (Tabla 13).

Tabla 13. Porcentajes de recuperación obtenidos para los diferentes estándares utilizados.

Plaguicida	ST1 %	ST2 %	ST3 %	ST4 %	ST5 %	ST6 %
Carbaril	108	99	98	97	94	97
Sulfotep	122	114	88	81	86	88
Diazinon	121	91	82	84	85	87
Clorotalonil	100	81	83	87	81	81
Clorpirifos	115	88	81	86	82	81
Kresoxim metil	90	86	82	84	80	81
Azinfos metil	3096	896	589	472	128	127
Azoxistrobin	163	73	68	72	68	69

En la Tabla 13 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos para cada plaguicida, para la obtención de estos valores como mínimo se realizaron cinco repeticiones por cada estándar múltiple de plaguicida, dentro de los valores individuales obtenidos se observó que eran muy variables uno respecto de otro especialmente para

los casos de Kresoxim metil y Diazinon (Harris, 1994), uno de los casos de mayor análisis ya que se observa claramente que el método de extracción líquido- líquido en conjunto con el programa de análisis cromatográfico no entregan un buen resultado, es por esto que para este compuesto se puede recomendar otro tipo de extracción, como la de tipo SPE (Solid Phase Extraction) o encontrar otro programa de análisis en el equipo de cromatografía utilizado.

Dentro de todos los plaguicidas el que presenta el mayor y mas estable porcentaje de recuperación dentro del rango de concentración estudiado, es Carbaril, lo cual es esperable debido a que este compuesto es insoluble en agua, por lo cual se espera que el 100% del compuesto se distribuyera en la fase orgánica durante el proceso de extracción, para el valor del estándar uno (ST1) se obtuvo un valor superior al 100%, estos valores son esperables en el rango de las bajas concentraciones, estos resultados se encuentran dentro del rango de eficiencia sugerido por la EPA (Environmental Protection Agency de los Estados Unidos) para el análisis de plaguicidas en aguas (Barceló, 1993.).

El plaguicida que presenta uno de los menores porcentajes de recuperación es Azoxistrobin, si lo analizamos desde el valor de la solubilidad ($6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), vemos que este compuesto no es muy soluble, por lo cual debería tener un porcentaje de recuperación relativamente alto, el resultados se puede atribuir a perdidas por evaporación.

Para el resto de los plaguicidas se observa un comportamiento similar donde en promedio se obtuvo un valor cercano al 80, lo que se encuentra dentro de los valores estimados o esperados para este tipo de extracción

La validación de los datos utilizados y los ejemplos de cálculos se encuentran en los anexos A y B respectivamente.

4.6 Comprobación por espectroscopia de masas

A continuación se entregan los espectros de masas donde por comparación o porcentaje de coincidencia entregados por el equipo se verificaba que la señal cromatográfica en determinado tiempo correspondiese al compuesto esperado.

A continuación se muestran las imágenes de los espectros de cada compuesto analizado y sus respectivos espectros de referencia de la biblioteca de estándar del software.

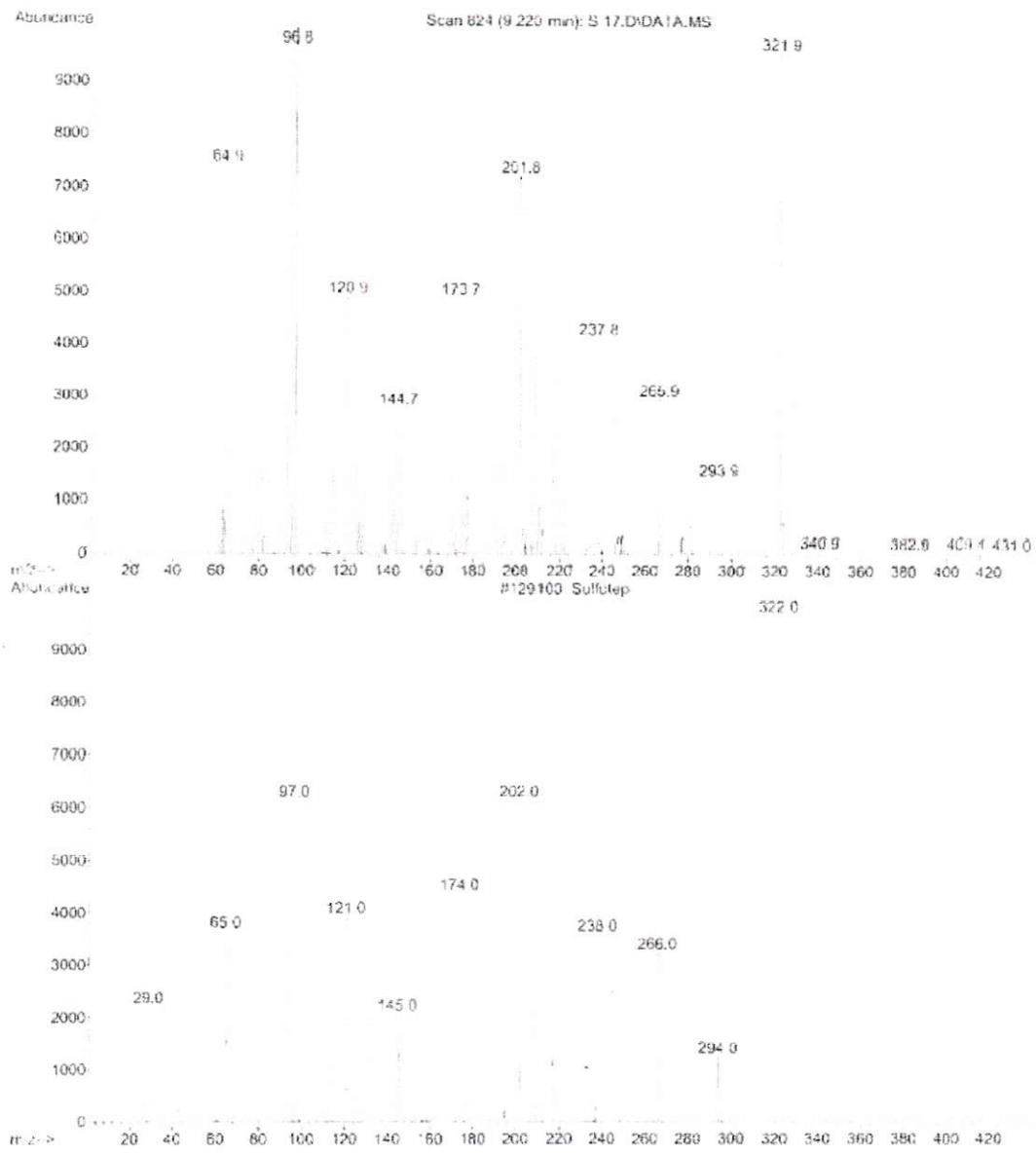


Figura 25. Espectro de comparación de señal obtenida a los 9,2 minutos con Sulfotep.

En la Figura 25 se observa que las masas con mayor abundancia como 65, 97, 121, 145, 174, 202, 238, 266, 294 y 322 se encuentran a los 9,2 minutos, lo que

comprueba que esta señal corresponde a Sulfotep, esta prueba se realizo con los estándares de mayor concentración.

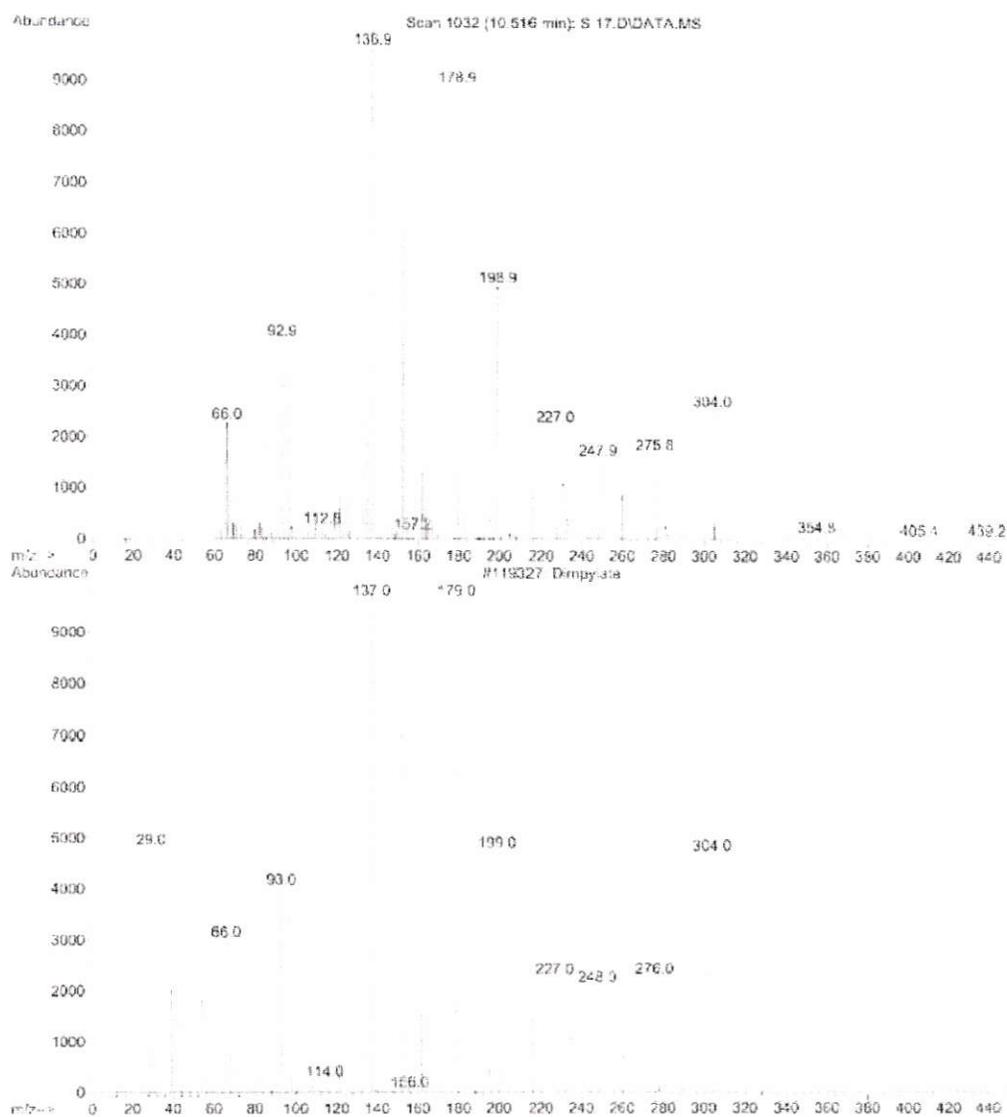


Figura 26. Espectro de comparación de señal obtenida a los 10,5 minutos para Diazinon (Dimipylate).

En la Figura 26 se ve las masas mas abundantes coinciden con las de la señal obtenida a los 10,5 minutos, la señal obtenida mostró una coincidencia del 99%.

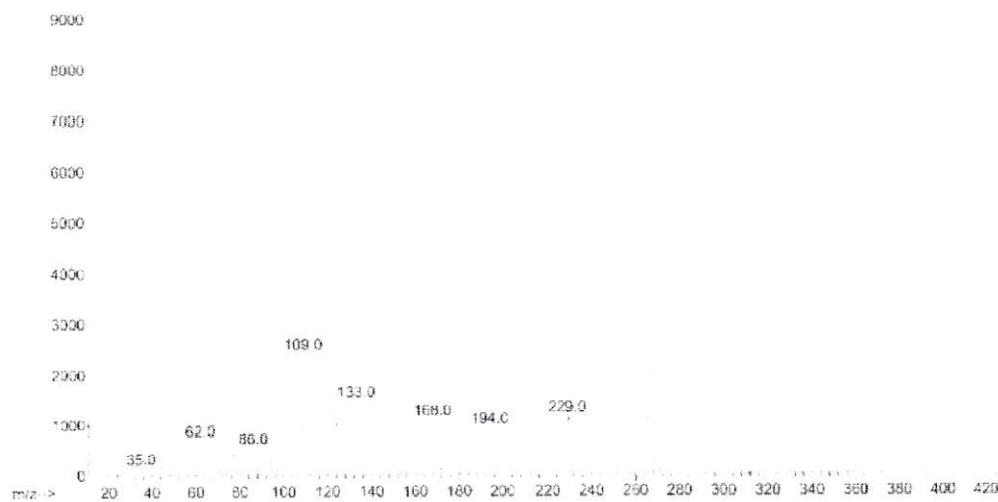
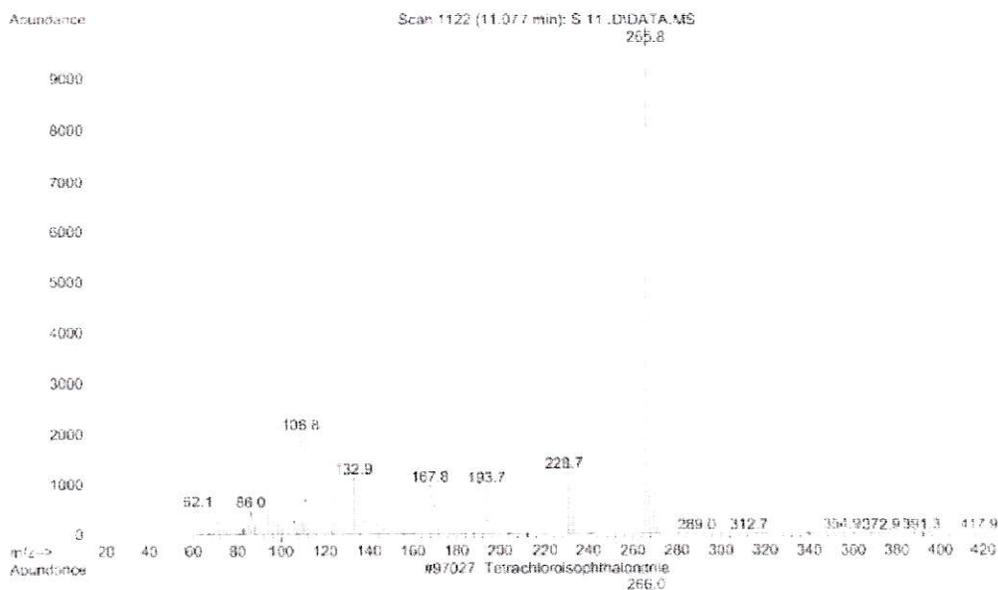


Figura 27. Espectro de comparación de señal obtenida a los 11,07 minutos para Clorotalonil (Tetrachloroisophthalonitrile).

En la Figura 27 se ve que la señal obtenida a los 11,07 minutos presenta la señal característica de Clorotalonil, la señal de 266 m/z, la cual es la más abundante, con una coincidencia del 99 %.

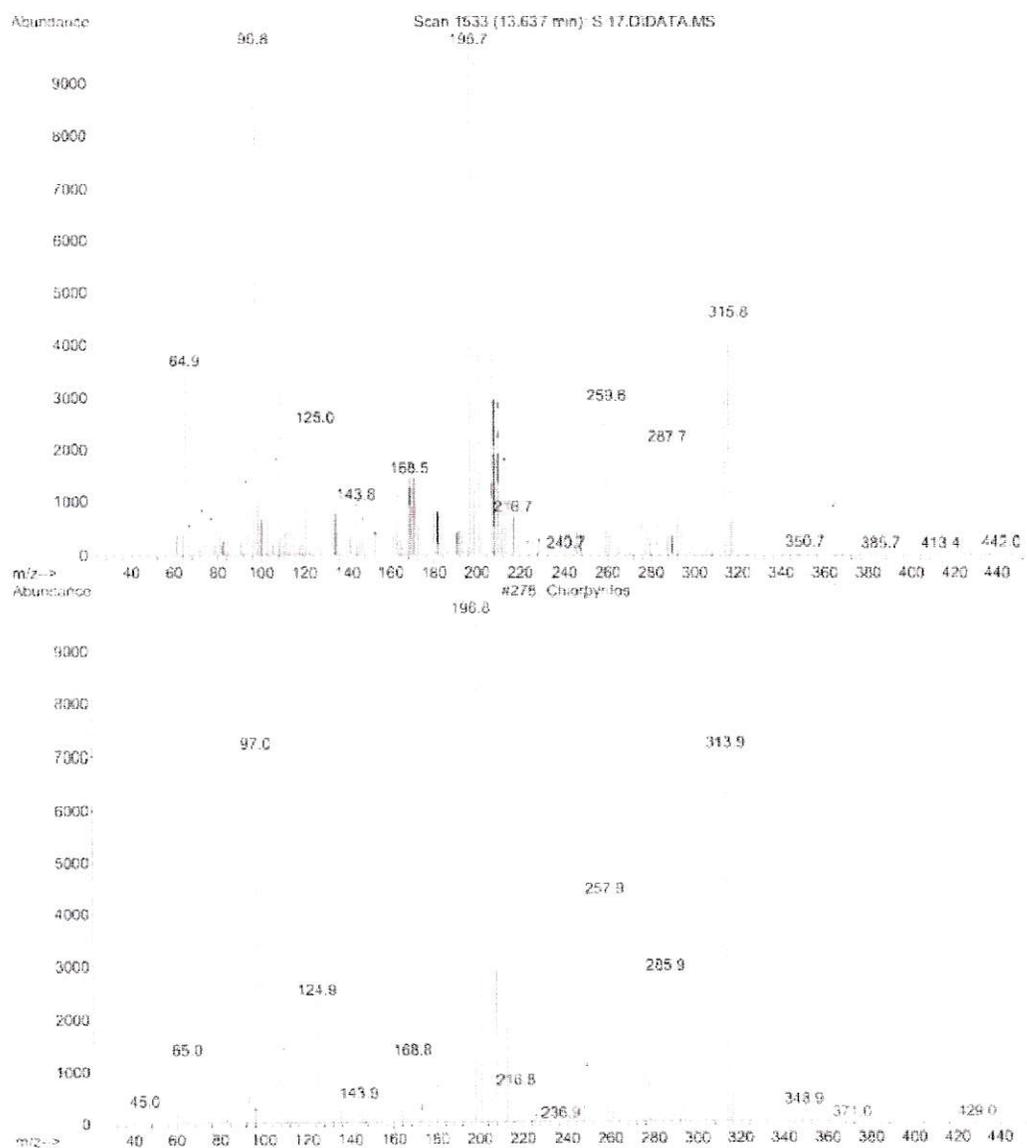


Figura 28. Espectro de comparación de señal obtenida a los 13,6 minutos para Clorpirifos.

En la Figura 28 se observaron que las tres principales masas de Clorpirifos 97, 196,8, 313, 9 coinciden con las de la señal obtenida a los 13,6 minutos en un 98 %.

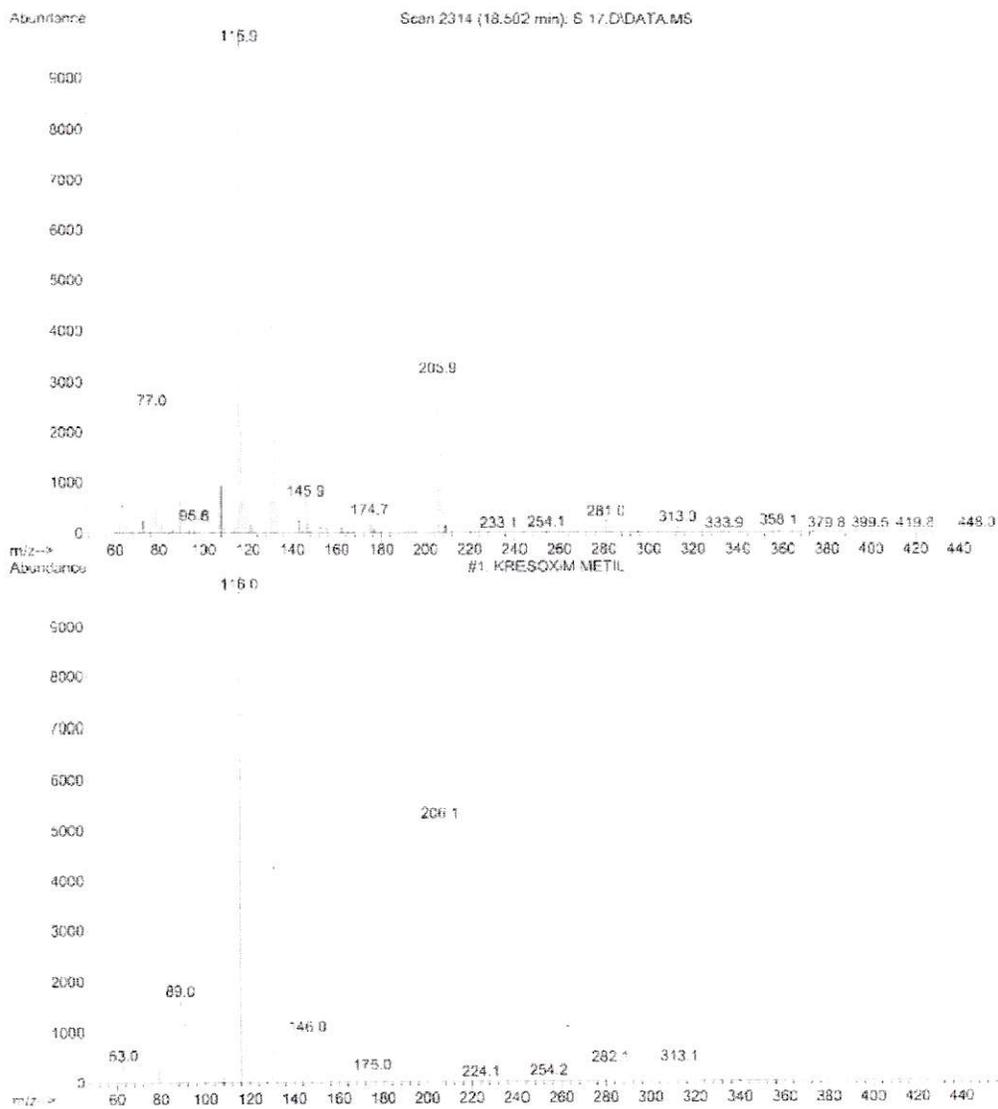


Figura 29. Espectro de comparación de señal obtenida a los 18,5 minutos para Kresoxim Metil.

En la Figura 29 las masas características de Kresoxim metil mostraron una coincidencia del 98 % con la señal obtenida a los 18,5 minutos.

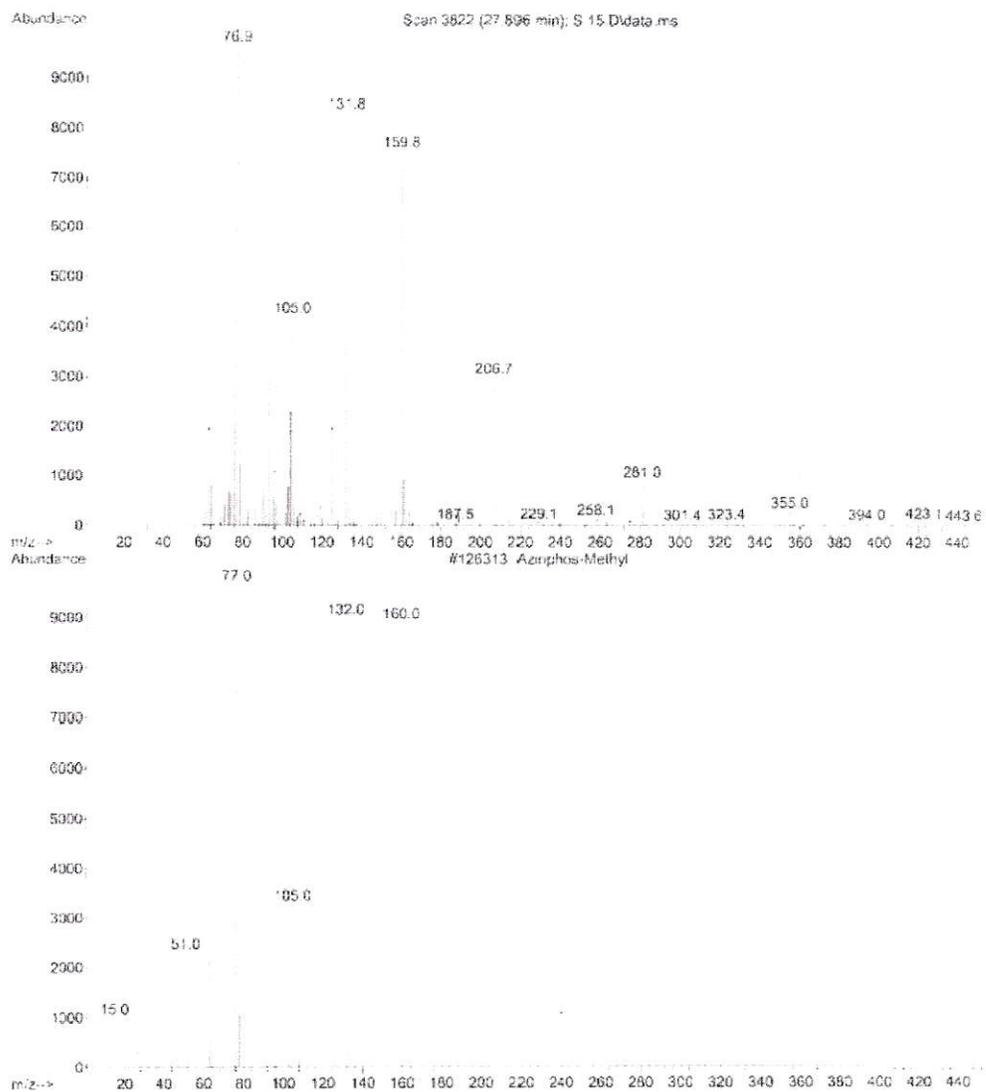


Figura 30. Espectro de comparación de señal obtenida a los 27,9 minutos para Azinfos Metil.

En la Figura 30 las señales características para Azinfos metil 77, 132 y 160 m/z son obtenidas para la señal de 27,9 minutos con un coincidencia del 97 %.

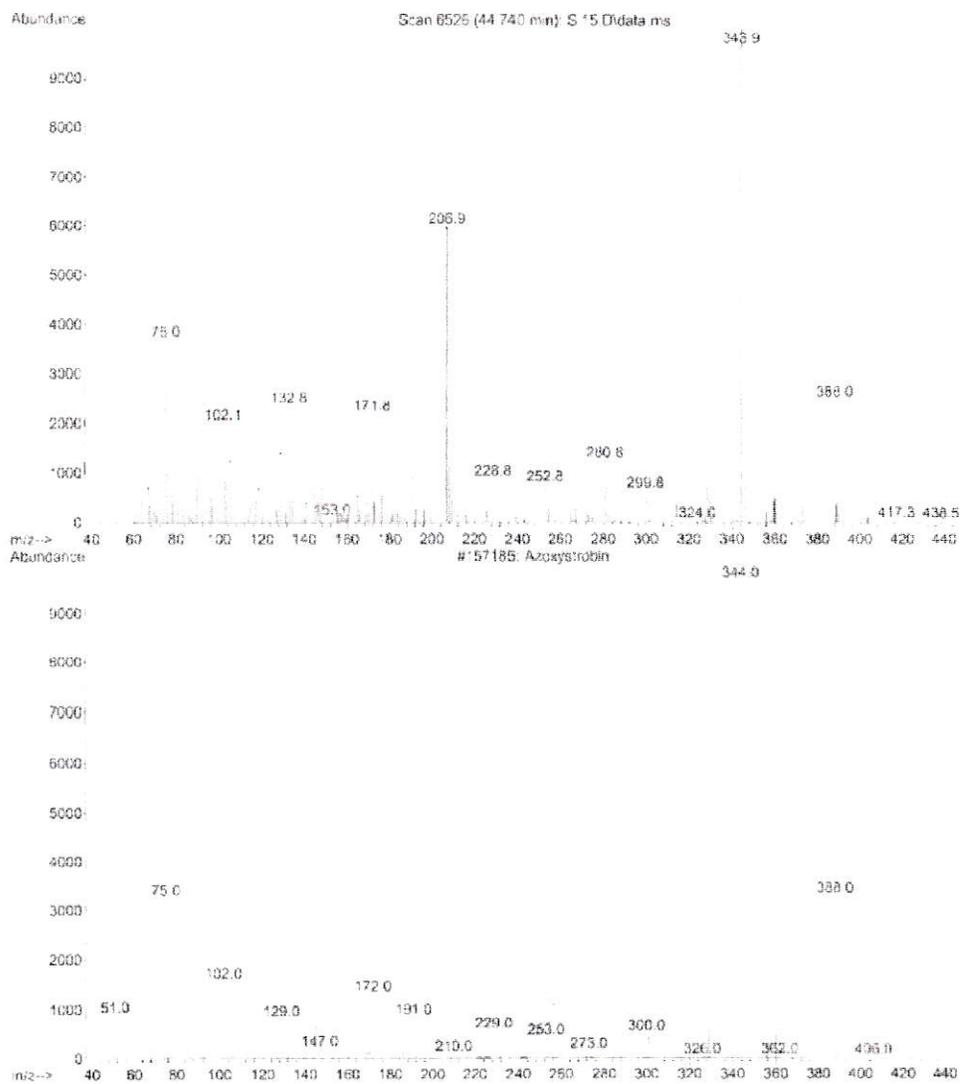


Figura 31. Espectro de comparación de señal obtenida a los 44,7 minutos para Azoxistrobin.

En la Figura 31 las señales características para Azoxistrobin son 344 y 366 m/z coinciden con las de la señal obtenida a los 44,7 minutos.

En las Figuras anteriores se pudo comprobar que los tiempos de retención determinados para cada compuesto corresponde a cada analito en estudio, los porcentajes de coincidencia presentados fueron entregados por el software del equipo de cromatografía de gases.

4.7 Resultados muestras de agua

A continuación se muestran los resultados de las muestras de agua tomadas en las viñas de la sexta región del país.

4.7.1 Resultados *In-situ*

En la Tabla 14 se muestran los resultados obtenidos en para las muestras de aguas, estos resultados fueron obtenidos en la primera campaña de muestreo, los parámetros considerados fueron pH, conductividad eléctrica y temperatura, además la georeferenciación de los sitios de muestreo.

Tabla 14. Valores *In-situ* para los sitios de muestreo, realizados en la primera campaña.

Sitios	T (°C)	pH	CE ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	GPS
V0	12	7,33	83,4	34°36,212min S 71°14,688min W
V1	12	7,54	88,9	34°36,697min S 71°15,030min W
N0	-	-	-	-
N1	16	6,71	122,7	34°37,286min S 71°13,707min W
Ne	21	7,55	282	34°37,514min S 71°13,888min W
RIO	18	7,88	212	34°38,393min S 71°15,111min W

Al analizar los resultados obtenidos podemos observar que las temperaturas más bajas corresponden a sitios donde el curso de agua se encontraban protegidos por una densa vegetación y árboles, a diferencia del río Tinguiririca y el estanque los cuales están expuestos al sol, la temperatura mas alta es la del estanque, se debe a que el sitio no cuenta con árboles y es un cuerpo de agua estancado.

Los valores de pH son muy similares entre si, mostrando solo pequeñas variaciones. La conductividad eléctrica muestra más variaciones, el agua del estanque y el río Tinguiririca muestran los valores mas elevados de conductividad, lo cual se explica por el alto nivel de sedimentos y la turbiedad del agua, las aguas de estos cuerpos eran de color café, mientras que para el resto de las muestras el agua era transparente y sus conductividades son menores.

Los valores de pH para cada sitio de muestreo se encuentran dentro de los valores exigidos por la norma chilena para agua de riego (NCh nº 1.333).

4.7.2 Resultados análisis por Cromatografía de gases

A continuación se muestran los resultados de los análisis cromatográficos de los extractos obtenidos en el proceso de extracción líquido-líquido, los resultados fueron conseguidos con un mínimo de tres repeticiones, y cuando algún resultado no era satisfactorio o el promedio de los análisis presentaba un coeficiente de variación superior al 10% se realizaban dos repeticiones más, en la Tabla 15 se muestran los resultados de análisis cromatográfico en términos de concentraciones en ppb ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Tabla 15. Concentraciones obtenidas para los extractos de la primera campaña de muestreo, concentraciones en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Plaguicida	V 0	V 1	N 0	N 1	N E	RIO
Sulfotep	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Diazinon	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clorotalonil	ND	ND	ND	8,67	ND	ND
Clorpirifos	ND	1,22	ND	ND	5,63	1,45
Kresoxim metil	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Azinfos metil	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Azoxistrobin	ND	33,1	ND	ND	ND	ND

ND: No detectado

En la Tabla 15 anterior se muestran los resultados obtenidos para el primer muestreo de aguas realizado el 21 de Octubre del 2008, donde se observa que los sitios de muestreo V1 entrega señales para Clorpirifos y Azoxistrobin, N1 presenta señal solo para Clorotalonil, NE y el río Tinguiririca (RIO) presentan señal para Clorpirifos, cabe señalar que estas concentraciones son las obtenidas para los extractos concentrados, en la Tabla 16 se muestran los valores reales para cada sitio de muestreo.

Tabla 16. Concentraciones reales o obtenidas para las muestras de agua de la primera campaña, analizadas por cromatografía de gases $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Plaguicida	V 0	V 1	N 0	N 1	N E	RIO
Sulfotep	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Diazinon	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Clorotalonil	ND	ND	ND	173,4	ND	ND
Clorpirifos	ND	21,2	ND	ND	97,4	25,2
Kresoxim metil	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Azinfos metil	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Azoxistrobin	ND	404,9	ND	ND	ND	ND

En la Tabla 16 se muestran los valores obtenidos para los plaguicidas encontrados en las muestras de agua, estos valores fueron obtenidos calculando la concentración de muestra realizada, vale decir la muestra se concentro desde 250 mL hasta 5 mL, esto quiere decir que la muestra se concentro 50 veces, además se consideraron los respectivos porcentajes de recuperación para cada plaguicida.

Para los sitios ventisquero cero y neyen cero como era de esperar no se encontró señal alguna para plaguicidas, estos sitios cumplieron con el objetivo de ser sitios de referencia ya que su ubicación se emplaza en las zonas más altas y menos intervenidas de cada viña.

En la segunda campaña de muestreo se tomaron muestras para los sitios V0 y Ne, los otros sitios dentro de las viñas no se tomó muestra de agua debido a que los canales se encontraban secos, para el río Tinguiririca no se tomó segunda muestra

debido a que la variación temporal se estimó como mínima, en la Tabla 17 se muestran los resultados para el segundo muestreo realizado el 14 de Diciembre de 2008.

Tabla 17. Concentraciones obtenidas para los extractos de la segunda campaña de muestreo, concentraciones en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Plaguicida	V 0	N E
Sulfotep	ND	ND
Diazinon	ND	ND
Clorotalonil	ND	ND
Clorpirifos	ND	9,48
Kresoxim metil	ND	ND
Azinfos metil	ND	ND
Azoxistrobin	ND	ND

En la Tabla 17 se muestran los valores obtenidos para las muestras de los sitios de de toma de muestra, el único sitio que muestra señal es Ne, el cual nuevamente presentó señal para Clorpirifos, donde la respuesta del extracto concentrado entregó una señal de $9,48 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, en la Tabla 18 se señalan los resultados reales.

Tabla 18. Concentraciones reales obtenidas para las muestras de agua de la segunda campaña, analizadas por cromatografía de gases en $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Plaguicida	V 0	N E
Sulfotep	ND	ND
Diazinon	ND	ND
Clorotalonil	ND	ND
Clorpirifos	ND	164,96
Kresoxim metil	ND	ND
Azinfos metil	ND	ND
Azoxistrobin	ND	ND

Al comparar los resultados obtenidos para el análisis de Ne entre la primera y segunda campaña se observa que la concentración para Clorpirifos aumento de 97,4 a $164,96 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, lo que representa un aumento de un 69%, aumento que se puede explicar por el proceso físico de evaporación, el cual se observo en terreno ya que el nivel del agua del estanque bajo entre la primera y la segunda campaña, además la muestra de diciembre del agua del estanque tenia mayor contenido de sedimento disuelto, es decir tenia una mayor turbidez, y se asocia que los las moléculas de plaguicidas se adhieren a los sedimentos.

4.7.3 Resultados análisis por Cromatografía de HPLC

En esta sección se detallan los valores obtenidos para el análisis de las extracciones de las muestras de agua por cromatografía líquida, el análisis por esta técnica pretende buscar residuos de Carbaril en las muestras de agua, para el análisis de este compuesto se realizaron tres repeticiones por cada sitio de muestreo, las extracciones se realizaron en el laboratorio de suelos de CCHEN, y se transportaron congeladas al laboratorio de química orgánica y cromatografía de la Universidad de Chile, donde se analizaron por HPLC con detector de fluorescencia. A continuación en la Tabla 19 se muestran los resultados obtenidos para el análisis cromatográficos

Tabla 19. Concentraciones obtenidas para los extractos analizados por HPLC, $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Plaguicida	V0	V1	N0	N1	NE	RIO
Carbaril	ND	ND	ND	ND	ND	10,33

En la Tabla 19 se puede apreciar que el único sitio que presenta señal para Carbaril es el río Tinguiririca, donde el extracto concentrado muestra una señal que corresponde a $10,33 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, los otros sitios en los que se muestreó agua no presentaron señales para Carbaril. En la Tabla 20 se presenta el valor real que presenta el agua del río Tinguiririca para la muestra de agua que se tomó el 21 de Octubre de 2008.

Tabla 20. Concentraciones reales obtenidas para las muestras de agua, analizadas por cromatografía líquida (HPLC).

Plaguicida	V 0 (ppt)	V 1 (ppt)	N 0 (ppt)	N 1 (ppt)	N E (ppt)	RIO (ppt)
Carbaril	ND	ND	ND	ND	ND	191,3

De la Tabla 20 podemos observar que la presencia de Carbaril en el río no supera los valores establecidos por la normativa chilena (Nch N° 1.333), la cual establece como valor máximo de $70 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para Carbaril en cuerpos de agua destinados para el riego.

V.- DISCUSIÓN GENERAL

Durante del desarrollo de este trabajo se pudo observar la eficiencia de la extracción líquido- líquido para gran parte de los plaguicidas analizados, así también una desventaja de esta al observarse el caso de Azinfos metil para el cual no se obtienen porcentajes de recuperación aceptables.

Dentro del análisis de las muestras de agua se identificó Clorpirifos y Carbaril en el río Tinguiririca. El origen de estos compuestos se puede asociar a dos principales fuentes. Los residuos de los plaguicidas estén adheridos en los sedimentos y se liberen poco a poco ya que la concentración de estos compuestos es muy baja, la otra posible fuente a la cual se puede atribuir estas concentraciones es provengan de aplicaciones realizadas en predios agrícolas río arriba del punto de muestreo, ya que se desconoce que tipo de plaguicidas se utilizan en los otros predios que se encuentra aledaños a la cuenca del río.

En los análisis del agua del estanque de Neyen se encontró Clorpirifos, el origen de este compuesto se puede atribuir básicamente al agua del río, como se mencionó con anterioridad el estanque se alimenta principalmente con agua del río, esto indica una consistencia en los resultados obtenidos tanto para el río como para el estanque, sin embargo en el estanque no se encontró residuo de Carbaril, esto se puede explicar puesto que no se sabe en que fecha se extrajo el agua del río para llenar este estanque, y

los residuos de carbaril se pudieron depositar después de la fecha de llenado del estanque.

Para la muestra de N1 se detectó la presencia del fungicida Clorotalonil, su origen se puede atribuir a efectos de escorrentía superficial ya que este plaguicida se aplica en los cortes de poda al momento de podar, por esto es probable que por procesos de escorrentía superficial este fungicida pueda llegar al canal de riego, otros medios de llegada son poco probables ya que este canal a lo largo de su trayecto está rodeado de una barrera de arbustos pequeños y árboles.

De los sitios analizados en ventisquero, VI se detectó residuos de Clorpirifos y Azoxistrobin, de estos plaguicidas el que se utilizó en este sitio fue Azoxistrobin, esta información fue entregada directamente por personal de la viña, el medio de transporte hacia el curso de agua se puede explicar por escorrentía superficial, ya que este fungicida se aplica directo al follaje, la otra vía de propagación hacia el curso de agua se puede atribuir a la deriva producida por el viento al momento de aplicar el plaguicida. Para el caso de Clorpirifos en la viña informaron que en el periodo de análisis de agua no se utilizó este plaguicida, su origen se puede asociar a uno de los cursos de agua que alimenta este canal, ya que como se explicó en la descripción del sitio de toma de muestras, este canal se compone de la confluencia de varios canales de riego los cuales pasan por otros predios de los cuales no se maneja la información de que plaguicidas utilizaron en el periodo de análisis.

De los resultados obtenidos y basándose en la norma chilena para agua de riego (Nch N° 1.333) se puede decir que el agua analizada cumple cabalmente con los parámetros de concentración máxima de plaguicidas utilizando Carbaril como referencia, ya que es el único plaguicida explícitamente normado en la legislación, con un valor máximo de concentración de $70 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, los resultados de las muestras de agua son del orden de $10^{-3} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, es decir la norma establece concentraciones máximas del orden de los $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y la muestran poseen concentraciones que están en los $10^{-3} \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, con estos argumentos se puede decir los métodos de aplicación de plaguicidas utilizados en las viña son correctos ya que la cantidades de plaguicidas en las muestras de aguas están bajo la norma.

Si nos basamos es normas internacionales que establecen valores mas estrictos como el real decreto español que establece para un plaguicida individual una concentración máxima de $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y para concentración totales $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, en el estanque encontramos resultados bajo esta norma en cambio las otras muestras están sobre $0,1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, en este sentido se debe trabajar en mejorar los sistemas de aplicación o realizar estudio mas exhaustivos de todo el medio que compone el curso de agua para descubrir si los residuos de plaguicidas encontrados son provenientes del agua o están adheridos a los sedimentos.

VI.- CONCLUSIONES

- El programa de condiciones utilizado para el análisis en cromatografía de gases muestra una alta eficiencia en la detección y separación de las señales analizadas.
- Se comprobó la eficiencia del detector de captura de electrones (μ ECD) para el análisis de los plaguicidas en estudio, especialmente para los que poseen átomos electronegativos.
- El detector de espectroscopía de masas cumplió la función de comprobar los tiempos de retención asociados a cada uno de los 7 plaguicidas finalmente estudiados por cromatografía de gases.
- El análisis de Carbaril fue más eficiente por HPLC que por GC, comprobando las limitaciones presentadas por la estructura molecular de Carbaril y su degradación con la temperatura.
- Para el análisis de Carbaril en HPLC se obtuvo las condiciones necesarias para obtener una señal óptima tanto en forma como en un tiempo apropiado, utilizando la eficiencia y alta sensibilidad proporcionada por el detector de fluorescencia.
- El método de extracción líquido- líquido utilizado mostró porcentajes de recuperación aceptables para la gran mayoría de los plaguicidas utilizados.

- La eficiencia de los programas de análisis desarrollados, basados en los resultados obtenidos, demuestran que el método de análisis es confiable para muestra de agua.
- Para Azinfos metil se debe buscar un método de extracción en fase sólida para obtener resultados óptimos ya que el proceso de extracción líquido- líquido utilizado presentó interferencias en el tiempo en que se presenta la señal de este compuesto.
- Los límites de detección indican que el protocolo de análisis es capaz de detectar pequeñas cantidades de muestras, siendo en orden decreciente Sulfotep > Azoxistrobin > Azinfos metil > Diazinon > Carbaril > Kresoxim metil > Clorotalonil > Clorpirifos.
- Los valores de límites de cuantificación prueban la capacidad del protocolo de análisis utilizado en este estudio, siendo en orden decreciente Sulfotep > Azoxistrobin > Diazinon > Azinfos metil > Carbaril > Kresoxim metil > Clorotalonil > Clorpirifos.
- En el análisis de muestras de aguas de los sitios en estudio se encontraron diversas señales para, Clorpirifos, Carbaril, Clorotalonil y Azoxistrobin.
- El sitio V0 no presentó señales para pesticida alguno, en ambas campañas de muestreo, por lo que este punto cumple con la característica de sitio referencial para la viña.

- En V1 se detectó Clorpirifos y Azoxistrobin, siendo mayor Azoxistrobin que Clorpirifos.
- N0 no presentó señales para los plaguicidas en estudio, justificando su selección como punto de referencia de esta viña.
- N1, se detectó Clorotalonil en la primera campaña de muestreo.
- En Ne se encontró Clorpirifos en ambas campañas.
- Para el río Tinguiririca se encontró Carbaril y Clorpirifos.
- Las aguas analizadas en este estudio no superan la norma de calidad de aguas para riego contenida en la Nch 13.333, considerando como base las concentraciones establecidas para Carbaril.

VII.- BIBLIOGRAFIA

- Abbott David y Andrews Rs. 1970. Introducción A La Cromatografía. Editorial: Alambra. Segunda edición, cap 1,17-26.
- Acuña, J., Elgueta 2006. Luminiscencia Ciencia ahora rev nº 17, artículo 14, Universidad de Concepción
- ATSDR.1997. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. Reseña Toxicológica del Clorpirifos. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., Servicio de Salud Pública. http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts84.html
- ATSDR. 2003a. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, Reseña Toxicológica de las Piretrinas y los Piretroides departamento de salud y servicios humanos de EEUU, Atlanta. http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts155.html
- ATSDR. 2003b. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, Reseña Toxicológica de Atrazina y sus derivados. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., Servicio de Salud Pública. http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs153.html

- ATSDR. 2008. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, Reseña Toxicológica del Diazinón. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE.UU., Servicio de Salud Pública. http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs86.pdf
- Barceló, D. 1993. Environmental protection agency and other methods for the determination of priority pesticides and their transformation products in water. Journal of Chromatography. 643, 117-143.
- Barriuso E. 2000. Contaminaciones con plaguicidas utilizados en agricultura: el comportamiento de los pesticidas en el suelo como base para la interpretación y la previsión de los riesgos de contaminación. XVII Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo, Mar del Plata.
- Bartual, J. 2002. Informes toxicología, "Pesticidas: clasificación y riesgos principales", centro de investigación y asistencia técnica – Barcelona. <http://www.estrucplan.com.ar/Producciones/Entrega.asp?identrega=336>
- Beresford, R. Brown., Follas, G. y G. Hagerty. 1999. Strategies to avoid resistance development to strobilurin and related fungicides in New Zealand. Proc. 52nd N. Z. Plant Protection Conf.:179-181.
- Bubbert, H. y H. Jennet. "Surface & thin films Analysis". Wiley-vch. 2002. paginas.titulo.

- Carreño, J. M., Planes, S. 2008. Plagas del campo. 13ª edición 2008, Editorial Aedos, pag 627- 628..
- Estrada, M. 1998. Uso Moderado de Plaguicidas en México. Memorias, Ciclo de conferencias "Hacia una renovación ambiental en México". Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México.
- Gallego A, 1995. Análisis de datos estadísticos, Universidad de Cordoba. Servicio de Publicaciones, 112-113
- Harris H, 1994, Extracciones y separaciones líquido- líquido, editorial Reverte S.A., 472 -475)
- Henley, E.J. y Seader, J.D. 1998. Operaciones de separación por etapas de equilibrio en Ingeniería Química. Reverté, Barcelona 214- 220.
- Hidalgo, C.1999. Simplificación del tratamiento de muestra en el análisis de residuos de herbicidas en aguas mediante aplicación de las técnicas cromatograficas acopladas LC-LC y SPE-LC. Tesis Doctoral Universitat Jaume·I, Departamet de Ciències Experimentals Química Analítica. 213 -.224
- Instituto Nacional de Estadísticas (INE). 2005. Informe Anual Medio Ambiente 2005, periodo de información 2001- 2005, 102 -178.
- Katime, I., Katime, O., Katime, D. 1998. Cromatografía líquida: Teoría y aplicaciones. Editorial Universidad de Guadalajara, México. 35- 49

- Keigwin, R.P, 2003. Carbaryl ired facts. EPA. Paginas.3- 7; 12- 45
- Loewy, R.M. 2000. Plaguicidas en aguas subterráneas del Alto Valle de Río Negro y Neuquen. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional del Comahue, Argentina
- Martínez M., L. 2001. Evaluación del Riesgo Carcinogénico de las Sustancias. Parte 2. Ejemplos de Valoraciones de Resultados experimentales. Anuario Toxicología. 17- 24.
- Martínez V., J., González R., M., Belmonte V., A., Garrido F., A. 2004. Estudio de la contaminación por pesticidas en aguas ambientales de la provincia de Almería. Ecosistemas, septiembre-diciembre. Vol. XII:3. Asociación Española de Ecología Terrestre Alicante, España. 30-38.
- McNair, H y Miller, J.M. 1998. Basic gas chromatography, techniques in analytical chemistry, Jhon Wiley and sons Inc, 29- 52, 101- 123.
- Mennickent, S.; Vega, M.; Godoy, C.G. y Yates, T. desarrollo de un método por cromatografía en capa fina instrumental para análisis cuantitativo de acido acetilsalicílico. Soc. Chilena de Química 2000, vol.45, n.4, 615-620.
- Miller, GT. 2004. Sustaining the Herat. 6th edition. Thompson Learning, Inc. Pacific Grove, California. Capítulo 9, Páginas 211-216.

- Oliva O. J. 2001. Incidencia de residuos de Azoxistrobin, Kresoxim metil y Quinoxifen sobre la población de distintas especies de Saccharomyces, Viticultura enología profesional, N° 77: 101-106.
- OPS, Organización Panamericana de salud. 2006. Insecticidas n-metil carbámicos capítulo 2, paginas 12- 16.
- Oriol, J.O., Del Castillo, B. 1998. Técnicas Instrumentales en Farmacia y Ciencias de la Salud. Barcelona
- Proakis, J. G. y Manolakis, D. G. 1998. Tratamiento digital de señales. Principios, algoritmos y aplicaciones. Hertfordshire: PRENTICE HALL International (UK). 21- 23.
- Scott, A. 2008. Europe rejects Appeal for use of Azinphos-methyl pesticide. <http://www.britannica.com/bps/additionalcontent/18/33909215/Europe-Rejects-Appeal-for-Use-of-Azinphosmethyl-Pesticide>
- Skoog, D.A. y Leary, J.J. 1994. Análisis Instrumental. Madrid: McGraw-Hill. p. 84-481.
- Universidad Autónoma de Madrid. 2006. Extracción líquido- líquido. Area ingeniería química. http://www.cibernetia.com/tesis_es/ciencias_tecnologicas/ingenieria_y_tecnologia_quimicas/procesos_quimicos/7.

- Universidad de Granada.1997. Seminario de fluorescencia departamento de química.
<http://www.ugr.es/~decacien/Planes/Quimica/Plan%201997/temarios/671111d-archivos/fundamentos/seminario%203.pdf>
- Watson, J.T. 1997. Introduction to mass spectrometry. 3° ed, Lippin cott-Raven, New York . 21- 27.
- Wilkinson and Baker, S. 1976. The Effects of Pesticides on Human Health, p 51-94.

ANEXOS

ANEXO A

1. Reproducibilidad de los datos utilizados en el cálculo de límite de detección (LD) y cuantificación (LC).

Para el desarrollo experimental del cálculo de límite de detección se realizaron muestras de estándares con tres repeticiones para cada concentración. En las tablas siguientes (Tabla 21 a 28), se presentan las áreas obtenidas para cada plaguicida en la construcción de la curva de calibración, donde:

A1, A2, A3, son las áreas promedio obtenidas de la integración en el cromatógrafo, para cada punto de la curva de calibración..

DESV, es la desviación estándar de los promedios.

CV, corresponde coeficiente de variación que se obtiene al dividir el valor de la desviación estándar por el promedio respectivo.

CV %, corresponde al porcentaje de variación de cada estándar.

Tabla 21. Reproducibilidad de los datos utilizados en la construcción de la curva de LD para Carbaril

Concentración (mg•L-1)	A1	A2	A3	Promedio	DESV	CV	CV %
0,012	17390	16580	17175	17048,3	419,6	0,025	2,5
0,010	14640	13625	14720	14328,3	610,4	0,043	4,3
0,008	12340	12765	12835	12646,7	267,9	0,021	2,1
0,006	10975	10110	10800	10628,3	457,3	0,043	4,3
0,002	6230	6170	6280	6226,7	55,1	0,009	0,9

Tabla 22. Reproducibilidad de los datos utilizados en la construcción de la curva de LD para Sulfotep

Concentración (mg•L-1)	A1	A2	A3	Promedio	DESV	CV	CV %
0,1	167510	171227	168911	169216,00	1877,18	0,011	1,11
0,2	260450	272394	273447	268763,67	7219,07	0,026	2,69
0,25	323999	329302	327519	326940,00	2698,50	0,083	0,83
0,35	403589	378126	374461	385392,00	15865,25	0,041	4,12
0,4	394445	397848	402525	398272,67	4056,71	0,010	1,02

Tabla 23. Reproducibilidad de los datos utilizados en la construcción de la curva de LD para Diazinon

Concentración (mg•L-1)	A1	A2	A3	Promedio	DESV	CV	CV %
0,015	52307	57957	49595	53286,33	4266,16	0,080	8,01
0,03	111004	117726	124780	117836,67	6888,67	0,058	5,85
0,04	167180	179598	188182	178320,00	10559,16	0,059	5,92
0,05	202429	206502	200625	203185,33	3010,62	0,014	1,48
0,1	401962	430518	367671	400050,33	31467,08	0,078	7,87

Tabla 24. Reproducibilidad de los datos utilizados en la construcción de la curva de LD para Clorotalonil

Concentración (mg•L-1)	A1	A2	A3	Promedio	DESV	CV	CV %
0,005	1065726	1132537	1106320	1101527,67	33662,33	0,030	3,06
0,01	2014635	1931661	1939054	1961783,33	45919,91	0,023	2,34
0,015	2942772	3067125	3049692	3019863,00	67329,37	0,022	2,23
0,02	4688205	4695884	4959752	4781280,33	154608,68	0,032	3,23
0,025	5465458	5187299	5173555	5275437,33	164706,15	0,031	3,12
0,05	11308008	11412733	11729304	11483348,33	219345,56	0,019	1,91

Tabla 25. Reproducibilidad de los datos utilizados en la construcción de la curva de LD para Clorpirifos

Concentración (mg•L-1)	A1	A2	A3	Promedio	DESV	CV	CV %
0,005	781124	805470	804556	797050,00	13799,89	0,017	1,73
0,01	1371544	1428939	1434127	1411536,67	34731,67	0,024	2,46
0,015	2316711	2365435	2380423	2354189,67	33311,38	0,014	1,41
0,02	2903755	2943873	3040793	2962807,00	70453,71	0,023	2,38
0,05	7328261	7388437	7575283	7430660,33	128810,23	0,017	1,73

Tabla 26. Reproducibilidad de los datos utilizados en la construcción de la curva de LD para Kresoxim metil

Concentración (mg•L-1)	A1	A2	A3	Promedio	DESV	CV	CV %
0,005	582626	584992	572726	580114,67	6507,21	0,011	1,12
0,01	619315	613736	643075	625375,33	15580,11	0,024	2,49
0,015	887845	901000	936019	908288,00	24900,20	0,027	2,74
0,02	1360866	1372450	1408853	1380723,00	25040,37	0,018	1,81
0,025	1739775	1703809	1738142	1727242,00	20309,99	0,011	1,18
0,05	3105347	3073814	3180328	3119829,67	54713,97	0,017	1,75

Tabla 27. Reproducibilidad de los datos utilizados en la construcción de la curva de LD para Azinfos metil

Concentración (mg•L-1)	A1	A2	A3	Promedio	DESV	CV	CV %
0,04	201031	208999	187365	199131,67	10941,35	0,054	5,49
0,07	568639	537967	537600	548068,67	17815,38	0,032	3,25
0,08	624012	608051	628004	620062,58	10557,9	0,017	1,70
0,15	1417086	1305973	1224770	1315943,00	96544,87	0,073	7,34
0,2	1770854	1797818	1874062	1814244,67	53528,96	0,029	2,95

Tabla 28. Reproducibilidad de los datos utilizados en la construcción de la curva de LD para Azoxistrobin

Concentración (mg•L-1)	A1	A2	A3	Promedio	DESV	CV	CV %
0,03	685464	717829	798980	734091,00	58479,14	0,079	7,97
0,04	1484631	1412016	1388841	1428496,00	49976,23	0,035	3,50
0,05	1901064	1993410	2109210	2001228,00	104293,00	0,052	5,21
0,07	4299446	3937117	3865850	3901483,50	50393,38	0,012	1,29
0,1	5706164	5822881	5715244	5748096,33	64924,35	0,011	1,13

2. Reproducibilidad de los datos utilizados en el cálculo de los porcentajes de recuperación de los estándares.

Para la determinación de los porcentajes de recuperación se realizaron cuatro muestras estándares en matriz agua de las cuales se obtuvieron tres medidas de cada una.

En las Tablas 29 a 36 se presentan las áreas obtenidas para cada plaguicida en la construcción de su curva de calibración, donde:

A_1, A_2, A_3 , representa las áreas promedio de cada punto de la curva de calibración.

DESV, es la desviación estándar de los promedios.

CV, corresponde coeficiente de variación que se obtiene al dividir el valor de la desviación estándar por el promedio respectivo.

CV %, corresponde al porcentaje de variación de cada estándar.

Tabla 29. Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de los porcentajes de recuperación de Carbaril

Concentración (mg•L-1)	A1	A2	A3	A4	Promedio	DESV	CV	CV %
0,01	25600	21685	22100	21560	22971,3	1907,42	0,083	8,30
0,05	70090	69410	73230	68865	70398,7	1783,68	0,025	2,53
0,07	108950	100530	106780	101120	104142,5	4691,65	0,045	4,51
0,1	137450	139450	129700	135690	134833,3	3497,82	0,025	2,59
0,5	657350	620530	640350	628750	636136,7	13468,03	0,021	2,12

Tabla 30. Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de los porcentajes de recuperación de Sulfotep

Concentración (mg•L-1)	A1	A2	A3	A4	Promedio	DESV	CV	CV %
0,2	308170	316295	308017	302926	308852,0	4780,7	0,015	1,5
0,3	304700	331623	302388	306085	311199,0	9846,5	0,032	3,2
0,4	358587	359663	339595	308941	341696,5	24647,6	0,072	7,2
0,5	373479	371047	393728	405061	385828,8	19184,9	0,050	5,0
0,6	437335	434998	427639	454246	438554,5	3377,1	0,008	0,8
0,7	435226	458857	498849	496122	472263,5	35669,3	0,076	7,6

Tabla 31. Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de los porcentajes de recuperación de Diazinon

Concentración (mg•L-1)	A1	A2	A3	A4	Promedio	DESV	CV	CV %
0,03	151659	161890	145183	166216	156237,0	760,1	0,05	5,0
0,05	291705	322664	263369	276617	288588,8	26298,4	0,091	9,1
0,1	428940	429564	442594	451725	438205,8	12662,5	0,029	2,9
0,2	676072	686419	759193	749087	717692,8	51544,2	0,072	7,2
0,3	628275	601097	631613	632799	623446,0	12388,5	0,020	2,0
0,4	877332	871624	882287	890593	880459,0	8039,0	0,009	0,9

Tabla 32. Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de los porcentajes de recuperación de Clorotalonil

Concentración (mg•L-1)	A1	A2	A3	A4	Promedio	DESV	CV	CV %
0,02	3997225	3949090	3992290	4012835	3987860,0	20792,5	0,005	0,5
0,05	10584350	10061228	9804979	9039608	9872541,3	1343853,3	0,136	13,6
0,1	19051507	19100733	18386640	18146637	18671379,3	572389,9	0,031	3,1
0,15	21391671	21907002	20383878	19890453	20893251,0	1069266,4	0,051	5,1
0,2	29974825	29557541	30925888	30624412	30270666,5	713447,4	0,024	2,4

Tabla 33. Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de los porcentajes de recuperación de Clorpirifos

Concentración (mg•L-1)	A1	A2	A3	A4	Promedio	DESV	CV	CV %
0,01	1316611	1368839	1245939	1253845	1296308,5	65642,8	0,051	5,1
0,02	2817460	2843613	2598866	2621235	2720293,5	155907,1	0,057	5,7
0,05	6366609	6296104	5999509	6019674	6170474,0	227522,2	0,037	3,7
0,1	9953175	9908143	11066045	11106490	10508463,3	817138,6	0,078	7,8
0,15	12562368	12326701	12818290	13056389	12690937,0	348465,8	0,027	2,7
0,2	16990780	16980990	17778671	17793765	17386051,5	565920,9	0,033	3,3

Tabla 34. Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de los porcentajes de recuperación de Kresoxim metil

Concentración (mg•L-1)	A1	A2	A3	A4	Promedio	DESV	CV	CV %
0,01	499187	499543	425061	471690	473870,3	36055,0	0,076	7,6
0,02	1481093	1551480	1328796	1393440	1438702,3	109720,7	0,076	7,6
0,05	2819401	2777240	2467454	2488042	2638034,3	226679,0	0,086	8,6
0,1	5467757	5523603	5117969	5158088	5316854,3	252897,8	0,048	4,8
0,15	4203087	4199257	4568613	4561935,0	4381553,5	255098,0	0,058	5,8
0,2	6606016	6787212	7015294	6931033	6834888,8	195550,0	0,029	2,9

Tabla 35. Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de los porcentajes de recuperación de Azinfos metil

Concentración (mg•L-1)	A1	A2	A3	A4	Promedio	DESV	CV	CV %
0,07	11768981	11930742	134016113	134401962	73029449,5	70644309,7	0,967	96,7
0,1	8422032	9002525	11019841	11873142	10079385,0	1633857,2	0,162	16,2
0,2	6666083	7197894	8694972	8164428	7680844,3	917476,6	0,119	11,9
0,3	8368010	8400984	12716073	12520538	10501401,3	2445730,6	0,233	23,3
0,4	187872713	191989759	365407917	379888988	281289844,3	105670725,9	0,376	37,6
0,5	225706564	250146097	166145178	125254111	191812987,5	56687584,4	0,296	29,6

Tabla 36. Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de los porcentajes de recuperación de Azoxistrobin

Concentración (mg•L-1)	A1	A2	A3	A4	Promedio	DESV	CV	CV %
0,03	318479	329032	356090	372077	343919,5	28516,2	0,083	8,3
0,05	1944292	1989092	1804049	1868361	1901448,5	92268,2	0,049	4,9
0,1	4009304	4174148	4621888	4606919	4353064,8	369588,8	0,085	8,5
0,2	11343114	11498205	12738896	12650049	12057566,0	900721,8	0,075	7,5
0,3	9470137	9403104	9827428	9988980	9672412,3	333459,9	0,034	3,4
0,4	15745881	15174455	15562641	15945994	15607242,8	207995,1	0,013	1,3

3. Reproducibilidad de los datos utilizados en el cálculo de las concentraciones en los extractos de las muestras de aguas del estudio.

Para la determinación de las concentraciones de las muestras que arrojaron señales en los tiempos asociados a los plaguicidas se realizaron tres repeticiones las cuales fueron medidas tres veces.

En las tablas 37 a 41 se presentan las áreas obtenidas para cada plaguicida en la construcción de su curva de calibración, donde:

A1, A2, A3, representa las áreas promedio de cada muestra de estándar de cada concentración.

DESV, es la desviación estándar de los promedios.

CV, corresponde coeficiente de variación que se obtiene al dividir el valor de la desviación estándar por el promedio respectivo.

CV %, corresponde al porcentaje de variación de cada estándar.

Tabla 37. Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de la concentración de los plaguicidas encontrados en V 1

V1	A1	A2	A3	Promedio	DESV	CV	CV %
Clorpirifos	33573	30248	32349	32057	1682	0,052	5,2
Azoxistrobin	61691	63487	62376	62518	906	0,014	1,4

Tabla 38. Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de la concentración de los plaguicidas encontrados en N 1

N1	A1	A2	A3	Promedio	DESV	CV	CV %
Clorotalonil	159170	152845	162710	158242	4998	0,032	3,2

Tabla 39 Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de la concentración de los plaguicidas encontrados en N e (1º campaña)

Ne	A1	A2	A3	Promedio	DESV	CV	CV %
Clorpirifos	681624	662478	731729	691944	35760	0,052	5,2

Tabla 40. Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de la concentración de los plaguicidas encontrados en N e (2º campaña).

Ne	A1	A2	A3	Promedio	DESV	CV	CV %
Clorpirifos	1195791	1127375	1184594	1169253	36697	0,031	3,1

Tabla 41. Reproducibilidad de los datos utilizados en la determinación de la concentración de los plaguicidas encontrados en Río Tinguirica

V1	A1	A2	A3	Promedio	DESV	CV	CV %
Clorpirifos	62557	67501	68177	66078	3068	0,046	4,6
Carbaril	18497	19973	19187	19219	739	0,038	3,8

ANEXO B

1. Cálculo de los límites de detección (LD) y cuantificación (LC).

Tabla 42. Regresiones lineales para la determinación de los límites de detección y cuantificación.

Plaguicidas	Regresiones de LD	Regresión desviación estándar
Carbaril	$y = 1 \cdot 10^6 x + 4309,9$	$Y = 40172x + 10,57$
Sulfotep	$y = 771468 x + 109135$	$Y = 21673x + 708,48$
Diazinon	$y = 4 \cdot 10^6 x + 1011,1$	$Y = 322787x - 3932,6$
Clorotalonil	$y = 2 \cdot 10^8 x - 258720$	$Y = 4 \cdot 10^6 x + 23577$
Clorpirifos	$y = 1 \cdot 10^8 x + 30005$	$Y = 3E+06x + 5926,4$
Kresoxim metil	$y = 6 \cdot 10^7 x + 147920$	$Y = 977717x + 4139,5$
Azinfos metil	$y = 1 \cdot 10^7 x - 178302$	$Y = 425230x - 8047,2$
Azoxistrobin	$y = 7 \cdot 10^7 x - 1492422,3$	$Y = 12918x + 66362$

a.-Carbaril

$$\text{Limite de detección} = \frac{4309,9 + 3 \cdot 10,57}{1386761,02} = 0,0031 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} = 3,1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$\text{Limite de cuantificación} = \frac{4309,9 + 10 \cdot 10,57}{1386761,02} = 0,0035 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} = 3,5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

b.-Sulfotep

$$\text{Limite de detección} = \frac{109135 + 3 \cdot 708,5}{515094}$$

$$\text{Limite de detección} = 0,216 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} = 216 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$$

$$\text{Limite de cuantificación} = \frac{109135 + 10 \cdot 708,5}{515094}$$

$$\text{Limite de cuantificación} = 0,225 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} = 225 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$$

c.-Diazinon

$$\text{Limite de detección} = \frac{1011,1 + 3 \cdot 3932,6}{4032439,63}$$

$$\text{Limite de detección} = 0,0032 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} = 3,2 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$$

$$\text{Limite de cuantificación} = \frac{1011,1 + 10 \cdot 3932,6}{4032439,63}$$

$$\text{Limite de cuantificación} = 0,0100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} = 10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$$

Clorotalonil

$$\text{Limite de detección} = \frac{258720 + 3 \cdot 23577}{303832157,0}$$

$$\text{Limite de detección} = 0,0011 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} = 1,1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$$

$$\text{Limite de cuantificación} = \frac{258720 + 10 \cdot 23577}{303832157,0}$$

$$\text{Limite de cuantificación} = 0,0016 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} = 1,6 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$$

Clorpirifos

$$\text{Limite de detección} = \frac{30005 + 3 \cdot 5926,4}{149786377,24}$$

$$\text{Limite de detección} = 0,00032 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} = 0,32 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$$

$$\text{Limite de cuantificación} = \frac{30005 + 10 \cdot 5926,4}{149786377,24}$$

$$\text{Limite de cuantificación} = 0,0006 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} = 0,60 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$$

Kresoxim metil

$$\text{Limite de detección} = \frac{147920 + 3 \cdot 4139,5}{63676864,73}$$

$$\text{Limite de detección} = 0,0025 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} = 2,5 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$$

$$\text{Limite de cuantificación} = \frac{147920 + 10 \cdot 4139,5}{63676864,73}$$

$$\text{Limite de cuantificación} = 0,0030 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} = 3,0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$$

Azinfos metil

$$\text{Limite de detección} = \frac{178302 + 3 \cdot 8047}{19966653,0}$$

$$\text{Limite de detección} = 0,009 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} = 9,0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$$

$$\text{Limite de cuantificación} = \frac{178302 + 10 \cdot 8047}{19966653,0}$$

$$\text{Limite de cuantificación} = 0,0091 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} = 9,1 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$$

Azoxistrobin

$$\text{Limite de detección} = \frac{1492422,26 + 3 \cdot 66362}{99719714,59}$$

$$\text{Limite de detección} = 0,017 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} = 17,0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$$

$$\text{Limite de cuantificación} = \frac{1492422,26 + 10 \cdot 66362}{99719714,59}$$

$$\text{Limite de cuantificación} = 0,0216 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} = 21,6 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$$

2. Determinación de los porcentajes de recuperación de los estándares utilizados en las curvas de calibración

Tabla 43. Áreas promedio de las extracciones, para la determinación de los porcentajes de recuperación para cada compuesto en estudio.

Plaguicidas	ST 1	ST 2	ST 3	ST 4	ST 5	ST 6
Carbaril	19823	82522	104623	136525	637334	1359261
Sulfotep	308852	311199	341696,5	385828,8	438554	472263
Diazinon	156237	288588	438205,8	717692,8	623446	880459
Clorotalonil	1961983	3987860	9872541	18671379	20893251	30270666
Clorpirifos	1296308	2720293	6170474	10508463	12690937	17386051
Kresoxim metil	473870	1438702	2638034	5316854	4381553	6834888
Azinfos metil	73029449	10079385	7680844	10501401	281289844	191812987
Azoxistrobin	343919	1901448	4353064	12057566	9672412	15607242

Tabla 44. Áreas promedio de los estándares de cada plaguicidas para comparación con los datos extraídos

Plaguicida	ST 1	ST 2	ST 3	ST 4	ST 5	ST 6
Carbaril	18355	83355	106758	140748	678015	1401300
Sulfotep	268763	305454	398272	448819	471774	519428
Diazinon	117836	203185	400050	826564	1219116	1585345
Clorotalonil	1961783	4781280	11483348	25589114	41873631	60490397
Clorpirifos	1411536	2962807	7430660	14476519	22070317	30128487
Kresoxim metil	625375	1380723	3119829	6194771	9424743	12859079
Azinfos metil	548068	583280	1814244	3808726	5716385	8615536
Azoxistrobin	734091	2001228	5748096	16302856	26178088	37418828

Ejemplo de cálculo realizado para Carbaril.

Se toma el valor promedio del estándar extraído, y se divide por el valor del estándar sin extraer y se multiplica por 100 y se obtiene el porcentaje, para el ST1.

$$R(\%) = \frac{19823}{18355} \cdot 100 = 108\%$$

3. Determinación de las concentraciones de plaguicidas en las muestras de agua área de estudio.

Para calcular las concentraciones se toman las regresiones lineales de los compuestos encontrados para cada área informadas en la tabla 3, luego se considera la concentración que se realizó es decir 50 veces (250/5) y luego el porcentaje de recuperación correspondiente.

Tabla 45. Áreas promedio obtenidas para los compuestos encontrados en V 1

V1	Área
Clorpirifos	32057
Azoxistrobin	62518

Regresión de Clorpirifos (CLP), $y = 1 \cdot 10^8 x - 151075 = 149786377,24x - 151075$

Regresión de Azoxistrobin (AZX), $y = 1 \cdot 10^8 x - 3 \cdot 10^6 = 99719714,59x - 3219017,29$

$$[CLP] = \frac{32057 + 151075}{149786377,24} = 0,0012 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1} = 1,22 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$[CLP] = \frac{1,22 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 5 \text{mL}}{250 \text{mL}} = 0,0244 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$[CLP] = \frac{0,0244 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 100}{115} = 0,0212 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} = 21,2 \eta\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

Se utiliza el porcentaje de recuperación de la zona baja de la curva de linealidad.

$$[AZX] = \frac{62518 + 3219017,29}{99719714,59} = 0,0330 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1} = 33,0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$[AZX] = \frac{33,0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 5 \text{mL}}{250 \text{mL}} = 0,660 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$[AZX] = \frac{0,660 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 100}{163} = 0,4049 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} = 404,9 \eta\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

Se utiliza el porcentaje de recuperación de la zona baja de la curva de linealidad.

Tabla 46. Áreas promedio obtenidas para los compuestos encontrados en N 1

N1	Área
Clorotalonil	158242

Regresión Clorotalonil (CLT), $y = 3 \cdot 10^8 x - 2 \cdot 10^6 = 303832157,0x - 2475248,2$

$$[CLT] = \frac{158242 + 2475248,2}{303832157} = 0,00087 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1} = 8,67 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$[CLT] = \frac{8,67 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 5 \text{mL}}{250 \text{mL}} = 0,1734 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$[CLT] = \frac{0,1734 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 100}{100} = 0,1734 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} = 173,4 \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$$

Tabla 47. Áreas promedio obtenidas para los compuestos encontrados en Ne, ambas campañas.

Ne	Área
Clorpirifos 1° campaña	691944
Clorpirifos 2° campaña	1169253

$$[CLP1^{\circ}] = \frac{691944 + 151075}{149786377,24} = 0,0056 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1} = 5,63 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$[CLP1^{\circ}] = \frac{5,63 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 5 \text{mL}}{250 \text{mL}} = 0,1126 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$[CLP1^{\circ}] = \frac{0,1126 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 100}{115} = 0,0974 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} = 97,4 \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$$

2° campaña

$$[CLP2^{\circ}] = \frac{1169253 + 151075}{149786377,24} = 0,0095 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1} = 9,48 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$[CLP2^{\circ}] = \frac{9,48 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 5 \text{mL}}{250 \text{mL}} = 0,1896 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$[CLP2^{\circ}] = \frac{0,1896 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 100}{115} = 0,16496 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} = 164,96 \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$$

Se utiliza el porcentaje de recuperación de la zona baja de la curva de linealidad.

Tabla 48. Áreas promedio obtenidas para los compuestos encontrados en río Tinguiririca

RIO	Área
Clorpirifos	66078
Carbaril	19219

Regresión Carbaril (CARB), $y = 1 \cdot 10^6 x + 4905,8 = 1386761,02x + 4905,85$

$$[CLP] = \frac{66078 + 151075}{149786377,24} = 0,00145 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1} = 1,45 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$[CLP] = \frac{1,45 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 5 \text{mL}}{250 \text{mL}} = 0,0290 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$[CLP] = \frac{0,0290 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 100}{115} = 0,0252 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} = 25,2 \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$$

Se utiliza el porcentaje de recuperación de la zona baja de la curva de linealidad.

$$[CARB] = \frac{19219 - 4905,85}{1386761,02} = 0,0103 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1} = 10,33 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$[CARB] = \frac{10,33 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 5 \text{ mL}}{250 \text{ mL}} = 0,2066 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$$

$$[CARB] = \frac{0,2066 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot 100}{108} = 0,1913 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} = 191,3 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$$

Se utiliza el porcentaje de recuperación de la zona baja de la curva de linealidad.