



# **UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA

“Distribución de los compuestos orgánicos de estaño (OTC) en el estuario de Bahía Blanca”

PAMELA YANINA QUINTAS

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2016

## **PREFACIO**

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento Química de la Universidad Nacional del Sur y del Laboratorio de Química Marina del Instituto Argentino de Oceanografía (IADO), dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el período comprendido entre el 21 de Agosto de 2012 y el 05 de Agosto de 2016, bajo la dirección de los Dres. Jorge E. Marcovecchio (IADO-CONICET) y Mariano Garrido (INQUISUR-UNS-CONICET).

Lic. en Química,  
Pamela Yanina Quintas

05 de Agosto de 2016  
Departamento de Química  
Universidad Nacional del Sur



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el ...../...../....., mereciendo  
la calificación de ..... (.....)

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de Tesis *Jorge Marcovecchio* y *Mariano Garrido* por haberme acompañado, aconsejado y guiado durante el desarrollo de este trabajo. *Jorge*, gracias por abrirme las puertas del laboratorio y aceptarme en tu grupo de trabajo. *Mariano*, gracias por haber aceptado ser mi director de tesis y por tu activa participación. Gracias por tu paciencia, críticas, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta tesis que me hicieron crecer tanto en el aspecto laboral como personal.

A mi co-directora de beca *Mónica Álvarez* por su calidez humana, por su paciencia infinita, por su presencia constante durante el desarrollo de esta tesis, por guiarme, apoyarme e incentivar a perfeccionar mi formación. Gracias por darme ánimo, empuje y confianza cada vez que lo necesité. Gracias por los mates y charlas compartidas!

A *Claudia Domini "calita"* y a *Andrés Arias* quienes a pesar de no figurar oficialmente en mi formación me ayudaron desde los inicios de esta tesis. *Andrés*, gracias por tus consejos y por abrirme las puertas de tu grupo de trabajo. *Calita*, gracias tu paciencia, apoyo constante, consejos y por incentivar cada vez que lo necesité. Gracias por los mates y risas compartidas!

Al Instituto Argentino de Oceanografía (IADO) y su Director los Dr. Rubén José Lara y Vice-Director Eduardo Alberto Gómez, por abrirme las puertas de dicha institución para llevar a cabo las investigaciones pertinentes

Al *Departamento de Química (UNS)* y a la *Secretaría General de Postgrado y Educación Continua de la Universidad Nacional del Sur*, por aceptarme como alumna de postgrado.

A todo el *personal del Laboratorio de Química Marina*, porque todos de alguna u otra manera me han ayudado durante el desarrollo de esta tesis, especialmente: a *Javier Arlenghi* por la buena predisposición y desinteresada colaboración desde que ingresé al instituto. Gracias por las infinitas charlas y risas compartidas. *Carlita* y *Nati*, por sus consejos y palabras de aliento cada vez que lo necesité. *Sandra* y *Meli* por haber estado siempre dispuestas a ayudarme frente a cualquier inquietud.

A todo el *personal de apoyo del subsuelo*, mis vecinos de laboratorio, que hacían los días de trabajo más divertidos. Gracias *Carlitos*, "*Cacho*", "*Colo*", "*Vasquito*", *Juan*, *Eder* y "*Pingüino*" por los mates, consejos y charlas compartidas. Cómo los voy a extrañar!

A *Enio*, *Beto* y *Juan*, personal de la IADO IV, por su permanente ayuda en las campañas de muestreo.

Al *Dr. Walter Melo*, por brindarme desinteresadamente el mapa de la zona de estudio.

A todos los integrantes del *Área III del Departamento de Química*, especialmente a *Nati* por sus constantes palabras de aliento. A *Adriana*, *Anabela*, *Cintia* y *Alejandro* por las charlas, risas y almuerzos compartidos. A *Marquitos* y a *Caro* por las risas y anécdotas compartidas.

Al personal técnico del LIUC, *Magalí Belelli*, *Marcia Arroyo*, *Carlos Romano* y *Andrea Costantino* quienes siempre me recibieron cálidamente y me brindaron su ayuda cuando lo necesite. Y, muy especialmente a *Marcelo Pereyra* con quien también compartí horas de docencia, gracias por tu ayuda desinteresada.

Al personal de apoyo de PLAPIQUI *Clarisa Cicchelli* por facilitarme el uso del liofilizador y por su buena predisposición, ayuda y calidez al recibirme, y muy especialmente a *Federico Delucchi*, pionero de los OTC, quien sin conocerme me brindó sus consejos y ayuda a lo largo de esta tesis. Gracias por los mates y charlas compartidas!

A *Alejandra* y *Juan* (CERZOS), quienes me permitieron la utilización de una centrífuga y pusieron a mi disposición los tubos necesarios para su uso, lo que me permitió poder llevar adelante esta tesis.

A mi compañera "*Pitu*", junto a la que compartí largas horas de laboratorio con mates y música de por medio. Gracias por las aventuras compartidas en las campañas de muestreo.

A todos mis compañeros "de la biblio" con quienes un mate o una charla compartida hicieron que los días de lectura sean más divertidos.

A mis amigas, *Elle, Ana, Paula, Gaby y Meli*, quienes este trabajo me dio la posibilidad de conocer. Gracias por compartir el transcurso de esta tesis y ser un apoyo fundamental en todo este camino. Gracias por las infinitas charlas, levantadas de ánimo, complicidad, ayuda desinteresada y mates compartidos.

A mis amigas químicas, *Jessi, Romi, Vale C., Bel, Vale S. y Sole*, gracias por el apoyo brindado a lo largo de esta tesis.

A *Sabry, Mary y "la nana"*, amigas que la infancia me regaló. Gracias por ser parte de este camino tan importante para mí, por su aliento y compañía constante.

A mi *grupo Guía-Scout*, por ser un gran apoyo en estos años de tesis. A mi queridísimo *consejo Hornero* y a mis guías, pequeñas mujercitas que siempre me brindaron su amor y aportaron buenas cosas a mi vida.

A la "*Familia Mendocina*", quienes hicieron que el estar lejos de casa no sea tan difícil. Gracias por las miles de comidas, anécdotas y risas compartidas.

A mis suegros, *Carlitos y Patri*, por el aliento y el apoyo de siempre.

A mis *papás*, quienes con mucho esfuerzo me brindaron la posibilidad de estudiar, quienes siempre me incentivaron a seguir adelante y me enseñaron que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr los objetivos.

A mis hermanas, *Vero y Cyn*, por estar cerca aunque las distancias fueran grandes, por el apoyo incondicional, motivación y confianza en todos estos años.

Y muy especialmente a mi esposo, *Nahuel*, mi pilar principal. Gracias por tu apoyo constante y amor incondicional, por tu infinita paciencia y comprensión.

*A mi esposo, Nahuel*

## **RESUMEN**

Gracias a su acción como biocida, el tributilestaño (TBT) ha sido ampliamente utilizado en pinturas anti-incrustantes. Por un lado, su aplicación ha dado lugar a enormes ahorros para el sector del transporte marítimo; sin embargo, por otro, ha generado un grave problema para los ecosistemas marinos debido a su persistencia y toxicidad en el medio. Una vez liberado en el agua, el TBT puede sufrir, rápidamente, distintos procesos de adsorción/desorción y acumularse en el sedimento y la biota. Además, puede degradarse a di y monobutilestaño (DBT y MBT, respectivamente) a través de diversos procesos entre los que se destaca la biodegradación producida por ciertos microorganismos (bacterias, microalgas y hongos).

A causa de los daños que puede causar en el medio marino, diversos países han impuesto regulaciones para controlar el uso del TBT en la formulación de pinturas anti-incrustantes para embarcaciones. En Argentina, la institución que regula el transporte marítimo (Prefectura Naval Argentina) prohibió en 1998 el uso de pinturas anti-incrustantes a base de TBT en todos los tipos de buques (Ordenanza nº 4/98).

En este trabajo de Tesis se evaluó la presencia y distribución de los compuestos organoestánicos (OTC, por sus siglas en inglés) en distintas muestras del estuario de Bahía Blanca (sedimentos, agua, material particulado en suspensión (MPS) y moluscos bivalvos), teniendo en cuenta sitios fuertemente antropizados (por ej., zonas portuarias y cercanas a diques secos) y sitios libres de intervención (por ej., islotes de la reserva ambiental). El pretratamiento de las muestras de sedimento superficiales, MPS y moluscos bivalvos autóctonos (mejillín, *Brachidontes rodriguezii*), se llevó a cabo aplicando energía de ultrasonido en las etapas de extracción y derivatización. De esta manera, se logró disminuir considerablemente el tiempo de análisis, obteniendo mejores parámetros analíticos con respecto al método convencional (UNEP/IOC/IAEA, 1994). El tratamiento de las muestras de agua se llevó a cabo mediante una extracción líquido-líquido empleando hexano para extraer los analitos derivatizados. La determinación cuantitativa de los compuestos estudiados se realizó mediante cromatografía gaseosa acoplada a detector de masas (GC-MS).

Los resultados indican que todas las muestras y sitios evaluados han sido impactadas por la presencia de TBT, DBT y MBT. También, ha quedado demostrado, que en algunos casos existe una variabilidad estacional con respecto a las concentraciones de los OTC, y que la distribución de estos compuestos está influenciada por ciertas variables fisicoquímicas (salinidad, temperatura, turbidez y materia orgánica).

Se estima que, en general, el ingreso de TBT al estuario de Bahía Blanca es antiguo y se encuentra bajo un proceso de degradación general. Esta degradación,



parece ser acelerada por la presencia de una elevada concentración de biomasa fitoplanctónica, característica del área de estudio.

Por último, a lo largo del estuario parecen existir fuentes adicionales de DBT y MBT, más allá de la degradación natural a partir de TBT. Algunas posibles fuentes difusas de estos compuestos son las aguas residuales domésticas, lodos de depuradora, efluentes industriales (relacionados con la planta de PVC), así como también, la lixiviación de DBT y MBT de las cañerías de distribución de agua y de desagüe que están fabricadas de PVC.

## **ABSTRACT**

Organotin compounds, particularly tributyltin (TBT), have been widely used as antifouling paints for the hulls of different kind of boats. Using TBT has been financially advantageous for the seaborne trade. However, it has also generated a severe damage for the maritime ecosystem, mainly due to both its persistence and toxicity.

Once released into the water, the TBT may rapidly undergo adsorption/desorption processes and, then, accumulate within the sediments and biota. Also, this compound can be degraded to other less substituted organotin compounds, such as di- and monobutyltin (DBT and MBT, respectively) throughout different processes, being the biodegradation (by bacteria, microalgae and fungi) the most important one.

Several countries have enacted regulations to control and monitor the use of TBT in antifouling paints formulations in order to preserve the marine environment. Prefectura Naval Argentina, in 1998, banned the use TBT-based antifouling paints in all kind of boats (Ordinance nº 4/98).

This Thesis evaluates the presence and distribution of organotin compounds (OTC) in different samples (sediments, water, suspended particulate matter (SPM) and mussels) in the Bahía Blanca estuary. The sites studied have been either strongly affected by anthropogenic activities –such as ports and dry docks– or relatively free from human intervention (small islands in the natural reserve).

The OTC pretreatment of all surface sediment, SPM and mussel samples (*Brachidontes rodriguezii*) was performed by application of ultrasound in both extraction and derivatization steps. In this way, the time analysis was considerably reduced and the analytical performance was also improved respect to the conventional method (UNEP/IOC/IAEA, 1994). The pretreatment of water samples was carried out by liquid-liquid extraction with hexane. The OTC determination was conducted using gas chromatography coupled to mass detector (GC-MS).

The obtained results show that all the samples in all the studied sites have been impacted by the pollution of TBT, DBT and MBT. Also, a seasonal variability was observed in the OTC concentrations and the distribution of these compounds is affected by certain physicochemical variables such as salinity, temperature, turbidity and organic matter content.

The presence of TBT in the Bahía Blanca estuary could be considered, in a global way, as 'old' pollution. Moreover, this compound seems to be under a general degradation process, which could be accelerated by the presence of large amounts of phytoplanktonic biomass, typical of this area.

Finally, other additional sources of DBT and MBT seem to contribute to the total amount of these pollutants in the estuary, beyond the amounts derived of the TBT degradation. Sources such as domestic wastes, sewage sludges, industrial effluents (related to the PVC plant) and the lixiviation from water and drain pipes, could be pointed out as examples.

# **ÍNDICE**

PREFACIO.....	I
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	IX
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Generalidades de los compuestos orgánicos de estaño.....	1
1.1.1 Definición.....	1
1.1.2 Características de los compuestos orgánicos de estaño.....	1
1.1.3 Aplicaciones.....	3
1.1.3.1 Industria de PVC.....	5
1.1.3.2 Pinturas anti-incrustantes a base de TBT.....	6
1.1.4 Compuestos organoestánicos en sistemas ambientales.....	11
1.1.5 Toxicidad de los compuestos orgánicos de estaño.....	13
1.1.6 Legislación: breve reseña histórica.....	16
1.2 Metodologías analíticas para la determinación de compuestos organoestánicos: Aspectos Generales.....	19
1.2.1 Técnicas de extracción.....	19
1.2.1.1 Extracción asistida por ultrasonido.....	20
1.2.2 Técnicas de derivatización.....	22
1.2.3 Limpieza de la muestra.....	24
1.2.4 Técnicas analíticas.....	24
1.2.4.1 Cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas (CG- MS).....	26
1.3 Planteamiento de hipótesis y objetivos.....	28
1.3.1 Hipótesis de trabajo.....	28
1.3.2 Objetivos generales y específicos.....	28
1.3.2.1 Objetivos Generales.....	28
1.3.2.2 Objetivos Específicos.....	28
Capítulo 2: ÁREA DE ESTUDIO Y METODOLOGÍAS.....	30
2.1 Área de estudio.....	30
2.1.1 Definición de estuario.....	30
2.1.2 Estuario de Bahía Blanca.....	31

2.1.3 Especie propuesta como organismo centinela.....	35
2.2 Sitios de muestreo seleccionados.....	36
2.2.1 Obtención de muestras.....	39
• Sedimentos.....	40
• Mejillines.....	40
• Agua de mar y MPS.....	40
2.2.2 Determinación in situ de parámetros fisicoquímicos en el medio acuático.....	41
2.3 Estándares y Reactivos.....	41
2.4 Metodologías.....	42
2.4.1 Sedimento superficial.....	42
2.4.1.1 Extracción y preconcentración de los compuestos organoestánicos.....	42
2.4.1.1.1 Método convencional y modificaciones.....	42
2.4.1.1.2 Método asistido por ultrasonido.....	44
2.4.1.2 Determinación de los compuestos organoestánicos por GC-MS.....	45
2.4.1.3 Determinaciones complementarias.....	46
2.4.2 Mejillines <i>Brachidontes rodriguezii</i> .....	46
2.4.2.1 Extracción y preconcentración de los compuestos organoestánicos.....	46
2.4.2.2 Caracterización biológica de los organismos.....	47
2.4.3 Agua de mar superficial.....	47
2.4.3.1 Extracción y preconcentración de los compuestos organoestánicos.....	47
2.4.3.2 Determinación de la materia orgánica particulada.....	49
2.4.4 Material Particulado en suspensión (MPS).....	49
2.5 Análisis estadístico aplicado.....	49
CAPÍTULO 3: COMPUESTOS ORGANOESTÁNNICOS EN SEDIMENTOS SUPERFICIALES.....	52
3.1 Optimización de las etapas de extracción y derivatización asistida por ultrasonido.....	52
3.2 Parámetros analíticos de los métodos propuestos: UNEP modificado y US.....	53
3.3 Niveles de compuestos orgánicos de estaño en muestras de sedimentos superficiales.....	56
3.4 Índice de degradación de TBT.....	60
3.5 Características asociadas a la distribución de OTC en los sedimentos estudiados.....	61
3.6 Distribución de los compuestos orgánicos de estaño.....	66
3.6.1 Muestras de sedimento superficiales tomadas en 2013.....	66
3.6.2 Muestras de sedimento superficiales tomadas en 2014.....	71

---

CAPÍTULO 4: COMPUESTOS ORGANOESTÁNNICOS EN AGUA DE MAR Y EN MATERIAL PARTICULADO EN SUSPENSIÓN.....	76
4.1 Parámetros analíticos para la determinación de compuestos organoestánnicos en agua de mar.....	76
4.2 Niveles de compuestos orgánicos de estaño en muestras de agua de mar superficial.....	77
4.3 Niveles de compuestos orgánicos de estaño en muestras de material particulado en suspensión (MPS).....	80
4.4 Índice de degradación de TBT en las muestras de agua de mar y MPS.....	82
4.5 Características fisicoquímicas del medio.....	83
4.6 Distribución de los compuestos orgánicos de estaño.....	86
4.6.1 Muestras de agua de mar superficial.....	87
4.6.2 Muestras de MPS.....	91
CAPÍTULO 5: COMPUESTOS ORGANOESTÁNNICOS EN MEJILLINES.....	96
5.1 Optimización de la etapa de limpieza de los extractos.....	96
5.2 Parámetros analíticos de los métodos propuestos: UNEP modificado y US.....	97
5.3 Niveles de compuestos orgánicos de estaño en muestras de mejillines.....	100
5.4 Índice de degradación de TBT.....	103
5.5 Características de las muestras estudiadas.....	104
5.6 Distribución de los compuestos orgánicos de estaño en muestras de mejillines....	109
5.6.1 Muestras de mejillines <i>Brachidontes rodriguezii</i> tomadas en 2013.....	110
5.6.2 Muestras de mejillines <i>Brachidontes rodriguezii</i> tomadas en 2014.....	115
CAPÍTULO 6: COMPARACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE OTC EN LAS MUESTRAS ESTUDIADAS.....	120
6.1 Muestras de sedimento y mejillines tomadas en 2013 y 2014.....	120
6.2 Muestras tomadas en 2014.....	121
CONCLUSIONES.....	125
BIBLIOGRAFÍA.....	129

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.1-</b> Ejemplo de incrustaciones biológicas en los cascos de los barcos.....	7
<b>Figura 1.2- a:</b> Forma de actuación de los recubrimientos de “asociación libre”. <b>b:</b> Forma de actuación de los recubrimientos autopulimentantes.....	9
<b>Figura 1.3-</b> Posibles vías de degradación de TBT, DBT y MBT en el medio marino.....	13
<b>Figura 1.4-</b> Formación de burbujas ultrasónicas y su violenta implosión.....	21
<b>Figura 1.5-</b> Esquema de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (CG-MS).....	27
<b>Figura 2.1-</b> Ubicación del estuario de Bahía Blanca en la República Argentina, Provincia de Buenos Aires (izquierda) y mapa de la zona interna del estuario mostrando la localización de los sitios de muestreo. (Mapa gentileza del Dr. Walter Melo, IADO).....	33
<b>Figura 2.2-</b> Imágenes del mejillín <i>Brachidontes rodriguezii</i> .....	35
<b>Figura 2.3-</b> Fotografías de los sitios de muestreo en el estuario de Bahía Blanca.....	38
<b>Figura 2.4-</b> Representación esquemática del método convencional con las modificaciones aplicadas y el método asistido por US.....	43
<b>Figura 2.5-</b> Representación esquemática del método aplicado para la determinación de compuestos organoestánicos de interés en agua de mar.....	48
<b>Figura 2.6-</b> Despliegue por columna de un cubo de datos X de tres vías en una matriz de dos dimensiones.....	51
<b>Figura 3.1-</b> Gráfico de Pareto de los efectos normalizados en el diseño factorial 22 para DBT. La línea vertical representa el intervalo de confianza del 95% para un efecto significativo.....	52
<b>Figura 3.2-</b> Gráfico de interacción del tiempo de extracción vs el tiempo derivación para DBT.....	53
<b>Figura 3.3-</b> Patrón de contaminación basado en la concentración de TBT, de acuerdo a la clasificación de Dowson <i>et al.</i> , (1993).....	58
<b>Figura 3.4-</b> Distribución de OM% en sedimentos superficiales del estuario de Bahía Blanca.....	63
<b>Figura 3.5-</b> Variación temporal y espacial de ciertos parámetros fisicoquímicos- pH, temperatura y salinidad- a los largo de los dos años de muestreo.....	66
<b>Figura 3.6- a-c</b> Gráficos de <i>loadings</i> , <b>d-f</b> gráficos de <i>scores</i> para las muestras de sedimentos superficiales tomadas en 2013.....	70
<b>Figura 3.7- a-c</b> Gráficos de <i>loadings</i> , <b>d-f</b> gráficos de <i>scores</i> para las muestras de sedimentos superficiales tomadas en 2014.....	75

**Figura 4.1-** Suma de las concentraciones de los compuestos orgánicos de estaño (TBts) en muestras de sedimento y MPS tomadas en 2014, expresadas ng Sn por g<sup>-1</sup> .....82

**Figura 4.2-** Distribución de la turbidez en los sitios estudiados del estuario de Bahía Blanca, en 2014.....85

**Figura 4.3-** Distribución de MOP en los sitios estudiados del estuario de Bahía Blanca, en 2014.....86

**Figura 4.4- a-c** Gráficos de *loadings*, **d-f** gráficos de *scores* para las muestras agua de mar.....90

**Figura 4.5- a-c** Gráficos de *loadings*, **d-f** gráficos de *scores* para las muestras de MPS.....94

**Figura 5.1-** Patrón de contaminación basado en la concentración de TBT, de acuerdo a la clasificación de la Comisión OSPAR (OSPAR 2004).....102

**Figura 5.2-** Variación estacional del IC expresados como promedio teniendo en cuenta todos los sitios estudiados.....107

**Figura 5.3- a-c** Gráficos de *loadings*, **d-f** gráficos de *scores* para las muestras de mejillines *Brachidontes rodriguezii* tomadas en 2013.....114

**Figura 5.4- a-c** Gráficos de *loadings*, **d-f** gráficos de *scores* para las muestras de mejillines *Brachidontes rodriguezii* tomadas en 2014.....119

**Figura 6.1-** Concentraciones totales de cada OTC estudiado en las muestras de sedimento y mejillines en 2013 y 2014.....121

**Figura 6.2-** Distribución promedio de los OTC en las cuatro matrices estudiadas (sedimento, mejillines, agua de mar, MPS) en el estuario de Bahía Blanca, en 2014.....123



## **ÍNDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.1-</b> Propiedades fisicoquímicas de los analitos estudiados (Basados en Hoch, 2001, Alonso Felipe, 2011 y Olushola Sunday et al., 2012).....	2
<b>Tabla 1.2-</b> Principales aplicaciones industriales de los compuestos organoestánicos estudiados (Basados en Hoch, 2001 y Carpinteiro Botana 2005).....	4
<b>Tabla 2.1-</b> Ubicación de los sitios de muestreo en el estuario de Bahía Blanca.....	36
<b>Tabla 2.2-</b> Fechas de las campañas realizadas en los sitios descritos del estuario de Bahía Blanca.....	39
<b>Tabla 2.3-</b> Niveles de factores y matriz de diseño factorial 2 <sup>2</sup> desarrollados para la optimización del método asistido por ultrasonido.....	45
<b>Tabla 2.4-</b> Iones característicos (m/z) y tiempos de retención de los compuestos de interés.....	46
<b>Tabla 3.1-</b> Cifras de mérito para la determinación de los compuestos orgánicos de estaño mediante GC-MS.....	54
<b>Tabla 3.2-</b> Concentración de los compuestos orgánicos de estaño de interés expresados como ng Sn g <sup>-1</sup> p.s. en el material de referencia PACS-2.....	55
<b>Tabla 3.3-</b> Valores de TBT y sus productos de degradación- DBT y MBT- en muestras de sedimento superficiales, tomadas en 2013, expresados en ng Sn g <sup>-1</sup> p.s.....	57
<b>Tabla 3.4-</b> Valores de TBT y sus productos de degradación- DBT y MBT- en muestras de sedimento superficiales, tomadas en 2014, expresados en ng Sn g <sup>-1</sup> p.s.....	59
<b>Tabla 3.5-</b> Análisis granulométrico de los sedimentos en cada sitio de muestreo. Los resultados se expresan en porcentajes.....	64
<b>Tabla 4.1-</b> Cifras de mérito para la determinación de los compuestos orgánicos de estaño mediante GC-MS.....	76
<b>Tabla 4.2-</b> Porcentajes de recuperación (%) y DER (%) obtenidos en muestras de agua de mar con agregados conocidos de MBT. DBT y TBT.....	77
<b>Tabla 4.3-</b> Valores de TBT y sus productos de degradación- DBT y MBT- en muestras de agua de mar tomadas en el estuario de Bahía Blanca, expresados en ng Sn g <sup>-1</sup> p.s.....	78
<b>Tabla 4.4-</b> Valores de TBT y sus productos de degradación- DBT y MBT- en muestras de MPS tomadas en el estuario de Bahía Blanca, expresados en ng Sn L <sup>-1</sup> .....	81
<b>Tabla 5.1-</b> Adsorbentes estudiados para llevar a cabo la limpieza de los extractos en las muestras de mejillines .....	97
<b>Tabla 5.2-</b> Cifras de mérito para la determinación de los compuestos orgánicos de estaño mediante GC-MS.....	98

**Tabla 5.3-** Porcentajes de recuperación (%) obtenidos en mejillines con agregados conocidos de MBT, DBT y TBT mediante la aplicación de ambos métodos.....99

**Tabla 5.4-** Valores de TBT y sus productos de degradación- DBT y MBT- en muestras de mejillines *Brachidontes rodriguezii*, tomadas en 2013, expresados en ng Sn g<sup>-1</sup> p.s.....101

**Tabla 5.5-** Valores de TBT y sus productos de degradación- DBT y MBT- en muestras de mejillines *Brachidontes rodriguezii*, tomadas en 2014, expresados en ng Sn g<sup>-1</sup> p.s.....103

**Tabla 5.6-** Valores de BAF calculados para los mejillines recolectados en el el Estuario de Bahía Blanca.....109

## Capítulo 1: INTRODUCCIÓN

### 1.1 Generalidades de los compuestos orgánicos de estaño

#### 1.1.1 Definición

Los compuestos orgánicos de estaño (OTC, por sus siglas en inglés), también llamados compuestos organoestánnicos o estannanos son compuestos químicos caracterizados por la presencia de uno o más enlaces covalentes entre átomos de carbono y estaño, donde este último se encuentra en su estado de oxidación +4.

Químicamente estos compuestos son representados mediante fórmulas del tipo  $R_nSnX_{4-n}$ , donde R es un grupo alquilo o arilo, X es una especie aniónica y “n” está comprendido entre 1 y 4 (Blunden & Evans, 1990). De acuerdo con el número de grupos orgánicos al que está enlazado el átomo de estaño, los OTC se agrupan en compuestos mono-, di-, tri- y tetra-sustituidos.

#### 1.1.2 Características de los compuestos orgánicos de estaño.

En general, las propiedades físicas y químicas de los OTC varían significativamente dependiendo de su estructura, principalmente del número de enlaces Sn-C y de la longitud de la cadena alquílica (Hoch, 2001). En la **Tabla 1.1** se muestra información sobre algunas propiedades fisicoquímicas de los compuestos organoestánnicos de interés.

Estos compuestos tienden a ser hidrófobos, su solubilidad en agua disminuye con el aumento en el número y longitud de los sustituyentes orgánicos pero también depende, en menor medida, de la especie aniónica (X). Otros factores que influyen en la solubilidad son: temperatura, salinidad, pH, fuerza iónica y presencia de partículas en suspensión (Rudel, 2003).

Existe una relación entre la estructura química de los compuestos organoestánnicos y sus propiedades de transporte, biodisponibilidad y toxicidad en el medio ambiente (de Carvalho Oliveira & Santelli, 2010). Estas propiedades pueden estar influenciadas por el contenido de materia orgánica del medio (Pinochet *et al.*, 2009; dos Santos *et al.*, 2010).

En general, el Sn en su forma inorgánica no es considerado tóxico, pero el patrón toxicológico de los compuestos organoestánnicos es muy complejo. El nivel de toxicidad está relacionado con la concentración, el tiempo de exposición, la biodisponibilidad, y la sensibilidad de la biota, entre otros factores. En general, la máxima actividad toxicológica y mayor estabilidad la presentan los compuestos tri-sustituidos, mientras que los mono-sustituidos son menos tóxicos y menos estables. Se cree que el aumento de la toxicidad

puede estar relacionado con la baja solubilidad en agua, ya que la hidrofobia es la principal característica de los compuestos organoestánicos, responsable de su bioconcentración (Fent, 2003).

Otra propiedad importante de estos compuestos es el coeficiente de partición octanol/agua ( $K_{ow}$ ), el cual suele presentarse como un logaritmo ( $\log K_{ow}$ ) y se determina en el laboratorio prescindiendo del empleo de organismos vivos. Es una medida de cómo se reparte una sustancia entre el agua y el octanol en función de la polaridad de la misma. Los OTC presentan valores altos de  $K_{ow}$ , por lo que tienen una alta afinidad por disolventes orgánicos y lípidos y, por tanto, son bioacumulados con mayor facilidad en la grasa de los organismos acuáticos. Se define el término bioacumulación como el proceso en el que un compuesto químico se desplaza del medio circundante (agua, sedimento, suelo o aire, etc.) al organismo por todas las rutas de exposición posibles (Environment Canada, 1995).

La capacidad de un compuesto para ser adsorbido por la materia orgánica y la arcilla presentes en los suelos o sedimentos se representa mediante el coeficiente de reparto agua/carbono orgánico ( $K_{oc}$ ). A este valor también se lo conoce como coeficiente de adsorción suelo/agua o coeficiente de adsorción. Los valores del  $K_{oc}$  van de 1 a 10.000.000. Un  $K_{oc}$  elevado indica que el OTC se fija con firmeza en la sedimento, por lo que poca cantidad del compuesto se transporta hacia las aguas superficiales.

**Tabla 1.1-** Propiedades fisicoquímicas de los analitos estudiados (Basados en Hoch, 2001; Alonso Felipe, 2011 y Olushola Sunday *et al.*, 2012).

Derivado	Formula Molecular	Punto de ebullición (°C)	Punto de fusión (°C)	Solubilidad (mg L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	Densidad (g cm <sup>3</sup> )	log Kow	Koc (L Kg <sup>-1</sup> carbono orgánico)
<b>Cloruro de tributilestaño (TBTCI)</b>	Bu <sub>3</sub> SnCl	172	-16	5–50	1,21	3,54	ND
<b>Dicloruro de dibutilestaño (DBTCI)</b>	Bu <sub>2</sub> SnCl <sub>2</sub>	135	39–41	4–92	ND	1,89	42,8
<b>Tricloruro de monobutilestaño (MBTCI)</b>	BuSnCl <sub>3</sub>	93	-63	ND	1,69	0,18	1,76

ND: No disponible

<sup>a</sup>Solubilidad en agua de mar

### 1.1.3 Aplicaciones

Los compuestos organoestánnicos tienen un origen antropogénico, excepto los derivados metilados, los cuales pueden generarse por procesos de biometilación en el medio (Guard *et al.*, 1981).

En 1849 Edward Frankland preparó el primer compuesto orgánico de estaño, diioduro de dietilestaño; mientras que el primer OTC utilizado comercialmente data de 1936, el cual fue empleado como estabilizante durante la síntesis de polímeros. Es así que, por casi 100 años, esta clase de compuestos no fueron utilizados, principalmente porque no existía una aplicación comercial (Champ & Seligman, 1996).

Esto cambió en 1940 cuando la industria plástica, particularmente la producción de cloruro de polivinilo (PVC) comenzó a expandirse (Blunden *et al.*, 1984). Los polímeros de PVC pierden estabilidad bajo la influencia del calor y la luz, dando lugar a la decoloración y fragilización de los mismos. Se encontró que por adición de derivados de mono y dialquilestaño se podía prevenir este tipo de inconveniente (Yngve, 1940).

Desde entonces, la producción y consumo de los compuestos organoestánnicos ha ido incrementándose considerablemente, debido principalmente al amplio número de aplicaciones industriales descubiertas para estos compuestos. Es así que el Sn presenta un mayor número de derivados organometálicos en uso comercial que cualquier otro elemento, debido a que dichos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y biológicas (Hoch, 2001).

Aproximadamente el 70 % de la producción mundial de compuestos organoestánnicos, principalmente monobutilestaño (MBT) y dibutilestaño (DBT), está dedicada a la estabilización térmica y ultravioleta en productos de PVC tanto rígidos (tuberías, paneles) como blandos (materiales para el revestimiento de paredes, cortinas, alfombras, suelos, juguetes) y en ciertas aplicaciones de revestimiento de cristales (Matthews, 1996).

El MBT y DBT también se emplean como catalizadores en la producción de espumas de poliuretano, siliconas y en otros procesos industriales. Este último además se utiliza en la industria avícola en forma de dilaurato de dibutilestaño como ingrediente activo del polistat, empleado como estimulante de crecimiento y para impedir la coccidiosis, una enfermedad producida por protozoarios en las aves.

Estas aplicaciones se resumen en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2-** Principales aplicaciones industriales de los compuestos organoestánicos estudiados (Basados en Hoch, 2001 y Carpinteiro Botana, 2005).

Analito	Aplicación	Función
<b>Tributilestano (TBT)</b>	Pintura Antiincrustante	Biocida
	Conservante de madera	Fungicida, insecticida
	Preservación de materiales: piedra y textiles	Fungicida, alguicida, bactericida
	Agroquímica	Fungicida, insecticida, acaricida
<b>Dibutilestano (DBT)</b>	Estabilización de PVC	Evita la degradación térmica y lumínica
	Producción de espumas de poliuretano	Catálisis homogénea
	Esterificación	Catálisis homogénea
	Avicultura	Desparasitador
<b>Monobutilestano (MBT)</b>	Estabilización de PVC	Evita la degradación térmica y lumínica
	Producción de espumas de poliuretano	Catálisis homogénea
	Esterificación	Catálisis homogénea
	Tratamiento de vidrio	Precursor de películas de óxidos de estaño (IV) en cristal

Las propiedades biocidas de los compuestos organoestánicos trisustituidos fueron descubiertas a fines de 1950 en el Instituto de Química Orgánica TNO, Utrecht, Holanda, (Kerk *et al.*, 1954). Su primera aplicación de importancia fue un año después, como ingrediente tóxico en conservantes de madera. El crecimiento en el consumo del tributilestano (TBT) se debió a su empleo como conservante de textiles, papel y cuero y, sobre todo, como aditivo en pinturas por su acción como biocida. Este compuesto orgánico de estaño también se ha utilizado como acaricida, molusquicida, nematicida, ovidicida, repelente de roedores y fungicida, en algunos productos como alfombras, textiles, y suelos de PVC (Allsopp *et al.*, 2000, 2001).

Los biocidas representan alrededor del 20% de la producción anual de los OTC (Bennett, 1996). Esta aplicación es probablemente la que libera un mayor número de compuestos organoestánicos al ambiente, debido a su introducción directa en el suelo, aire y agua.

### 1.1.3.1 Industria de PVC

El policloruro de vinilo (PVC) está compuesto por cloro en un 57 % y etileno en un 43%. Este compuesto surge a partir de la polimerización del monómero de cloroetileno (también conocido como cloruro de vinilo).

El PVC puro es un material poco conductor de la electricidad cuyas propiedades son la resistencia mecánica a la intemperie, al agua y a los productos químicos, aunque presenta tendencia a descomponerse, debido a la pérdida de cloruro de hidrógeno (HCl) como consecuencia del calentamiento (180-200 °C) o de la exposición prolongada a la luz. Los resultados son la decoloración y la fragilización. Según la Comisión de la Comunidad Europea (COM, 2000), estos inconvenientes pueden evitarse mediante la adición de estabilizadores los cuales, a menudo, están compuestos de sales de metales como plomo, bario, calcio o cadmio, o de compuestos organoestánnicos, más precisamente, mono y dibutil estaño. Estos compuestos orgánicos de estaño se añaden al PVC en una concentración de 5-20 g/Kg (Blunden & Chapman, 1986; Lawson, 1986).

La producción y utilización masiva del PVC comenzó en los años 50 y 60, aunque la primera producción industrial se produjo en los años 30. En 1950 producían PVC sólo cinco compañías norteamericanas. A finales de esta década se comenzó a producir PVC por suspensión en Argentina. Particularmente, en 1986 entra en funcionamiento una moderna planta de PVC (INDUPA) en el Polo Petroquímico de Bahía Blanca y finalmente, en el año 2000, se pone en marcha la ampliación de dicha fábrica de PVC (SOLVAY-INDUPA), con una capacidad de producción anual de 210.000 ton/año (Policloruro de vinilo, 2016).

A pesar de las amplias aplicaciones del PVC, el uso de aditivos en su fabricación ha generado preocupación en relación con la contaminación del ambiente y la salud humana, en parte debido a la lixiviación potencial de compuestos organoestánnicos hacia el medio circundante.

Se ha demostrado que la lixiviación de estos compuestos desde tuberías de PVC con una longitud de 46 metros conduce a una concentración de 35 mg Sn/m<sup>3</sup> en el agua después de su primer uso y una subsecuente liberación constante de 1 mg Sn/m<sup>3</sup> (Hoch, 2001). La tasa de liberación depende, entre otros factores, de la longitud de la cadena alquílica del estabilizador o las condiciones del medio de lixiviación (Wu *et al.*, 1989), pero también del tipo de material de PVC (Quevauviller *et al.*, 1991). Una variante de PVC, el policloruro de vinilo clorado (CPVC), se utiliza ampliamente para sistemas de distribución de agua a elevadas temperaturas. En experiencias de laboratorio, Forsyth & Jay (1997) demostraron que existen lixiviados de MBT y DBT en el agua de grifo desde tuberías de

CPVC. Otros estudios han demostrado que la lixiviación de compuestos organoestánicos desde PVC y materiales relacionados llevó a la contaminación de productos alimenticios, bebidas, agua potable, agua municipal y lodos de depuradora (Forsyth *et al.*, 1992, 1994; Fent, 1996a; Forsyth & Jay, 1997). Takahashi *et al.* (1999) analizaron varias muestras de productos plásticos ordinarios, comprados en un supermercado. En el 50% de las muestras de producto plástico (incluyendo papel de horno siliconado, guantes de poliuretano, esponjas lavavajillas, películas de celofán para productos alimenticios) se detectaron compuestos de butilestaño (Hoch, 2001).

El incremento en la producción y uso de PVC y su consecuente disposición dan lugar a la acumulación de derivados organoestánicos mono y di alquilados en el ambiente los que, a futuro, podrían afectar a los humanos y a la biota (Quevauviller *et al.*, 1991).

En virtud de la Directiva 2009/425/CE de la Unión Europea, la eliminación de ciertos compuestos orgánicos de estaño (incluyendo el DBT) está muy avanzada en productos de consumo (Sherman, 2011). El DBT, tiene una excelente estabilidad térmica y lumínica, junto con buena claridad que permiten la producción de accesorios coloreados, haciendo muy difícil su reemplazo. Sin embargo, existen posibles soluciones que incluyen otros compuestos orgánicos de estaño, como diferentes octil estaños. Se registra una creciente demanda de estos últimos compuestos ya que poseen un perfil ambiental mejorado y se ha demostrado que tienen una excelente estabilidad a la intemperie, buena transparencia, cumpliendo con las regulaciones de contacto con los alimentos y estabilización de calor a largo plazo.

### 1.1.3.2 Pinturas anti-incrustantes a base de TBT

Las pinturas antiincrustantes son recubrimientos que se aplican tanto en la carena de una embarcación, es decir, sobre la superficie del casco que queda sumergida como en cualquier otra estructura que se encuentre en contacto con el agua (plataformas petrolíferas, tuberías submarinas, compuertas de presas, instalaciones destinadas a acuicultura, entre otros).

Estos recubrimientos se aplican como sistema de protección para combatir la incrustación biológica (formación y asentamiento de material biológico, como ciertas bacterias, hongos, crustáceos y algas en una superficie expuesta al agua), y además como protección frente a la corrosión de tipo químico y biológico (**Figura 1.1**).





**Figura 1.1-** Ejemplo de incrustaciones biológicas en los cascos de los barcos.

En el caso de las embarcaciones, la existencia de incrustaciones en la carena provoca un incremento en la fricción con respecto al agua, dando como resultado la pérdida de velocidad y maniobrabilidad. Esto incrementa el costo/hora por exceso de consumo de combustible. Se estima que una capa de incrustaciones de una décima de milímetro puede aumentar la fricción hasta en un 15% con respecto a la de un barco limpio y esto se traduce en elevados gastos de combustible, incluso un 30% (Alonso Felipe, 2011). Las incrustaciones biológicas también pueden causar daños en la película de pintura, desencadenando problemas de corrosión de los sustratos metálicos (Eguía López, 2000; Chambers *et al.*, 2006)

La búsqueda de tecnologías para evitar las incrustaciones en barcos nació de la mano de la navegación por lo que encontramos antecedentes históricos (Pérez-Roa & Anderson, 2007). Los fenicios ya utilizaban barras de cobre en sus embarcaciones en el año 1200 a. C. porque observaron resultados de cierta eficacia en los cascos de sus barcos. De hecho, la colocación de placas de cobre protegiendo la carena de las embarcaciones fue el método más habitual y estandarizado por todos los constructores, hasta la llegada de la Revolución Industrial donde los buques de madera fueron reemplazados por hierro, el cual, cuando es puesto en conjunto con cobre en una solución salina (como es el caso del agua de mar), se disuelve. Como respuesta, comenzaron a desarrollarse las primeras pinturas anti-incrustantes, a base de cobre, arsénico o mercurio mezclados con linaza o resina.

En la década de 1960 se introdujeron compuestos organoestánnicos tales como el óxido de tributilestaño (TBTO) y el fluoruro de tributilestaño (TBTF) para cubrir el espectro de algunas especies sobre las cuales no tenía efecto el biocida principal (óxido cuproso), en especial las algas. De hecho, estas pinturas funcionaban muy bien y eran altamente

eficaces. Fueron muy utilizadas durante los '70, hasta comienzos de los años '80 cuando se descubrió que el TBT era altamente nocivo para el ambiente.

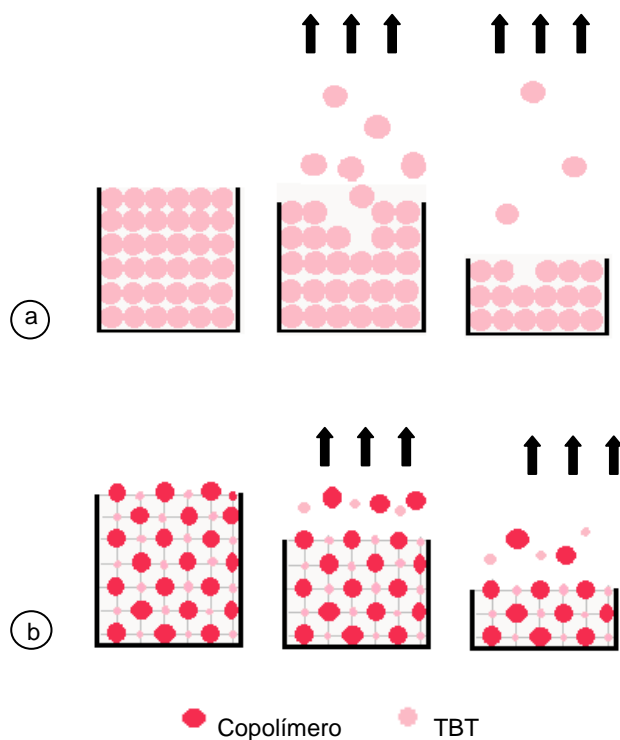
Las pinturas antiincrustantes basadas en TBT, se componen de un material formador de película con un ingrediente biocida (TBT) y un pigmento. Funciona por desprendimiento de pequeñas cantidades de biocida desde la pintura hacia el agua que está en contacto con ella, formando una película delgada de TBT altamente concentrada alrededor de la estructura de la embarcación.

En las primeras pinturas antiincrustantes a base de compuestos organoestánicos, el biocida se mezclaba físicamente en la pintura y era liberado al medio acuático por difusión (**Figura 1.2a**), destruyendo así los crustáceos y demás organismos marinos que se hubiesen fijado al buque. Sin embargo, la tasa de desprendimiento del biocida en estas pinturas de "asociación libre" era incontrolada, siendo lo habitual que fuera inicialmente rápida y disminuyera a lo largo del tiempo. Una de las razones para la disminución de la velocidad de desprendimiento era que los microcanales en la superficie de la pintura podían ser obstruidos, por ejemplo por aragonitas. El período de efectividad de estas películas era entre 18 y 24 meses.

A finales de la década de los sesenta se produjo un particular avance en las pinturas anti-incrustantes con la elaboración de las llamadas pinturas de copolímeros "autopulimentantes", en las que existe un enlace químico entre los compuestos de organoestaño y la base del polímero.

El índice de lixiviación de dichas pinturas está controlado, ya que el biocida se desprende cuando el agua de mar reacciona con la capa superficial de la pintura. Una vez agotada la capa superficial, la reacción para desprender el biocida comienza de nuevo en la capa subyacente y continua de esta forma la protección anti-incrustante (**Figura 1.2b**). De este modo, el índice de lixiviación es el mismo a lo largo de toda la vida de la pintura, con lo cual los buques podrían llegar a estar hasta 60 meses sin volver a pintar el casco, cosa que no había sido posible anteriormente.

La unión del TBT al polímero por medio de un grupo éster es inestable en condiciones alcalinas. El agua de mar (cuyo pH es alrededor de 8,2) hidroliza la unión éster, provocando la liberación del biocida y dando lugar a una lixiviación constante y más o menos lenta. Por otro lado, el polímero se vuelve hidrofílico, de manera que se va desprendiendo al medio marino (Caprari, 2006).



**Figura 1.2- a:** Forma de actuación de los recubrimientos de “asociación libre”. **b:** Forma de actuación de los recubrimientos autopulimentantes.

El cloruro de tributilestaño formado, es deletéreo para los organismos que se incrustan en el barco pero también para bivalvos para los cuales no está dirigido (Harrison & de Mora, 1996). Este inconveniente originó problemas graves para los ecosistemas marinos, incluso a concentraciones muy bajas (Szpunara *et al.*, 1996; Hoch, 2001), generando la necesidad de establecer una regulación en el uso de TBT. En muchos países se prohibió su utilización en pequeños barcos desde mediados de 1980. En Argentina, desde el 2008 se prohibió el uso de las pinturas anti-incrustantes a base de TBT.

A partir de entonces, el cobre tiende a convertirse en el biocida anti-incrustante predominante, pero su uso está bajo escrutinio en varios países y tiene un futuro incierto. A pesar de la alta toxicidad del cobre para muchos organismos marinos, como mencionamos anteriormente, algunos grupos de algas son tolerantes (Foster, 1977; Reed & Moffat, 1983). Por tanto, la mayoría de las pinturas a base de cobre están fortificadas con biocidas para aumentar su rendimiento. (Nichols, 1988; Young *et al.*, 1979).

Aproximadamente 18 biocidas están actualmente en uso en todo el mundo (Dafforn *et al.*, 2011) incluyendo clorotalonil, diclofluanida, *N-tert*-butyl-*N*-cyclopropyl-6-(methylsulfanyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine (Irgarol 1051), 2,3,5,6-tetracloro-4-sulforonyl

piridina (TCMS piridina), 2(tiocianometilitio)-benzotiazol (TCMTB), diurón, 4,5-dichloro-2-octyl-isothiazolone (DCOIT), piritiona de zinc y cobre (zinc y cobre Omadine) y etilen bis-ditiocarbamato de zinc (zineb) (Boxall *et al.*, 2000; Thomas, 2001, 2009; Voulvoulis *et al.*, 1999). Estos son a menudo herbicidas (por ejemplo, Irgarol 1051 y diurón) que tienen efectos negativos sobre la tasa de crecimiento de organismos fotosintéticos (Voulvoulis *et al.*, 1999).

Dada la creciente demanda de pinturas ambientalmente aceptables, están siendo estudiados nuevos enfoques en tecnologías no tóxicas o que no impliquen la disolución de elementos nocivos, aunque hasta el momento no existe solución alguna comparable con la eficacia de las pinturas con TBT (Alonso Felipe, 2011). Si bien se han estado desarrollando varias alternativas, una opción basada en el mismo principio de acción de los recubrimientos hasta ahora usados es la de utilizar pinturas biodegradables (Pérez-Roa & Anderson, 2007) que se disuelvan lentamente, de manera que los organismos que se adhieran simplemente se “caigan” de la embarcación al no tener donde aferrarse.

También se han evaluado sistemas eléctricos y electromagnéticos, donde mediante el uso de impulsos eléctricos se crea una diferencia de potencial entre el casco del barco y el mar que hace que se produzca un proceso químico que previene la formación de incrustaciones. Esta tecnología es muy efectiva pero extremadamente cara y podría facilitar la corrosión.

Además, encontramos las pinturas antiadherentes, conocidas como *fouling-release* que se basan en polisiloxanos o polialcoholes fluorados con pigmentos de teflón y no emplean biocidas. En vez de estar diseñados para prevenir adhesión, hacen que esta no sea tan firme, de manera que la limpieza sea más sencilla y menos dañina para el barco y el ambiente.

Otra línea de investigación se relaciona con la identificación y extracción de productos naturales en organismos capaces de permanecer “limpios”, como ciertas hojas, plantas acuáticas como los nenúfares, esponjas, corales, algas y algunos moluscos. Hay ciertos compuestos contenidos en la savia, hojas y tallos de los vegetales que les confieren propiedades defensivas, por lo que no son atacados por insectos. Entre ellos se encuentran algunas plantas con alto contenido de tanino como el quebracho colorado (*Schiropsis* sp.), la mimosa (*Mimosa* sp.) y el castaño (*Castanea sativa*, *Aesculus* sp.) u otras de contenido medio, como la planta de tara (*Caesalpinia tintoria*). Estas se emplean en forma natural o en forma de sales metálicas.

También han sido estudiados los fluoropolímeros funcionales, cuya ventaja es que se pueden combinar o mezclar con otras resinas, tales como las epoxídicas,

poliuretánicas y uretánicas, para dar compuestos del tipo del teflón. El inconveniente que presentan es que deben lavarse en forma periódica.

Por último, recientemente se están considerando sistemas basados en tecnología de ultrasonidos con emisores ubicados a lo largo del casco del barco que perturban la adhesión.

#### 1.1.4 Compuestos organoestánnicos en sistemas ambientales

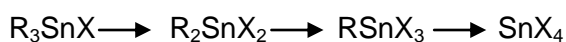
Si bien el estaño no es considerado un metal peligroso para la salud o el ambiente, sus compuestos orgánicos pueden ser altamente tóxicos, aún a muy bajas concentraciones y dependiendo del grupo orgánico al que esté unido (Chagot *et al.*, 1990).

El butil y metil estaño se introducen en el medio acuático y terrestre como resultado de su lixiviación de los materiales poliméricos en los que se emplean como aditivos y catalizadores durante su síntesis (Forsyth & Jay, 1997; Becker *et al.*, 1997).

Cabe destacar, como se mencionó anteriormente, que los OTC utilizados como biocidas suponen la mayor contribución a la contaminación del ambiente, debido a su introducción directa en el mismo. Particularmente, el TBT, debido a su amplia aplicación industrial, se ha descrito como la sustancia más tóxica que jamás se haya introducido de forma deliberada en el medio marino (Evans *et al.*, 1995).

Si bien como biocida era necesario que el TBT fuese tóxico para poder destruir los organismos que se fijasen en la carena de los buques, el principal problema fue su persistencia en el medio. Este biocida se acumula en los sedimentos, en particular en áreas con mucho movimiento de embarcaciones y áreas de bajo intercambio de agua, como los puertos (Alonso Felipe, 2011).

La degradación de los compuestos organoestánnicos en el medio ambiente se ha definido como una pérdida progresiva de grupos orgánicos desde el catión Sn.



La degradación puede ser causada tanto por la influencia de la radiación, como por factores químicos y/o biológicos (**Figura 1.3**). La fotólisis por radiación solar parece ser la ruta más rápida de degradación en los niveles de agua superiores, pero no es importante en el agua a mayor profundidad, sedimentos o suelos (Hoch, 2001).

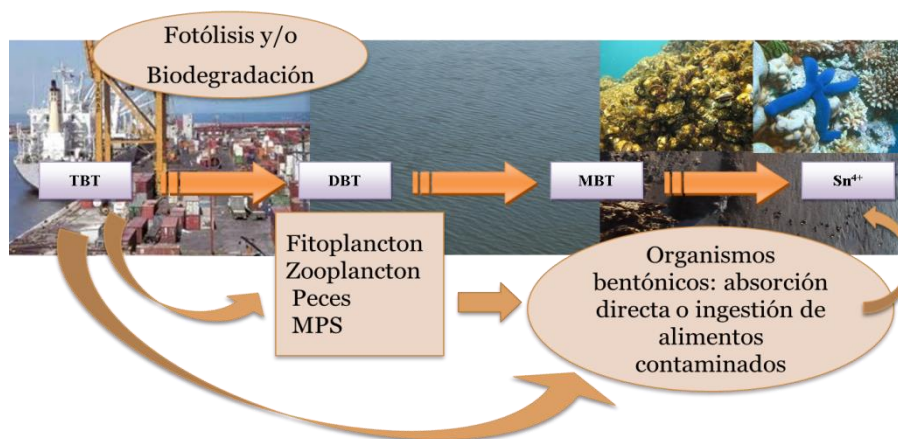
La degradación de OTC también puede ocurrir como resultado de un ataque electrofílico o nucleofílico al enlace Sn-C. Por ejemplo; ácidos minerales, ácidos

carboxílicos y alquilmetales son agentes que pueden romper heterolíticamente el enlace mencionado.

Algunas bacterias (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* C, *Alcaligenes faecalis*) y especies de microalgas (*Skeletonem costatum*, *Chlorella vulgaris* y *Chlorella sp*) son capaces de degradar TBT y otros compuestos organoestánicos bajo ciertas condiciones en diferentes compartimentos ambientales (Reader & Pelletier, 1992; Tsang *et al.*, 1999, Barnes *et al.*, 1973). Estos estudios demostraron que las microalgas y bacterias pueden jugar un rol importante en la biodegradación de TBT en sistemas acuáticos, pero sólo un limitado número de microorganismos han sido identificados hasta ahora y se sabe poco acerca de las condiciones ambientales necesarias para este tipo de procesos de degradación (Herzke *et al.*, 2007). Se ha establecido que la degradación bioquímica debido a la actividad microbiana (es decir, actividad de las bacterias, algas y hongos) es más rápida en la columna de agua en comparación con los sedimentos. Esto resulta de la mayor intensidad de luz y una mejor oxigenación de la columna de agua (Ayanda *et al.*, 2012).

El TBT, en sistemas acuáticos, favorecido por su hidrofobia y su carga positiva, es adsorbido rápidamente sobre la fracción arcillosa del material particulado en suspensión, y absorbido por las algas (Luan *et al.*, 2006) y zooplancton (Hu *et al.*, 2006; Michaud & Pelletier, 2006). De esta forma, el TBT puede ser retirado rápidamente de la columna de agua para acumularse en el sedimento y la biota, que actúan de esta manera como trampas para estos contaminantes tóxicos. Estos procesos (adsorción y absorción) son un importante mecanismo de control sobre la distribución y el destino de los compuestos organoestánicos en el ambiente (Hoch, 2001). Los parámetros más importantes para controlar el comportamiento de adsorción de los OTC son: tipos de cationes intercambiables, pH, salinidad, composición química y mineralógica del material adsorbente (Batley, 1996; Weidenhaupt *et al.*, 1997).

Gracias a su carácter lipofílico, los compuestos orgánicos de estaño (principalmente TBT) tienen fácil acceso a las diferentes partes de las cadenas tróficas y al medio circundante (agua, sedimento, suelo) (Herzke *et al.*, 2007). Los OTC presentes en los sedimentos están disponible para organismos que se alimentan por filtración, como las ostras, las vieiras o los mejillones, y pueden entrar en la cadena alimentaria a través de esta vía (Herzke *et al.*, 2007).



**Figura 1.3-** Posibles vías de degradación de TBT, DBT y MBT en el medio marino.

Algunos estudios demostraron que los bivalvos marinos son capaces de acumular cantidades significativas de TBT (más de  $5 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Los crustáceos y peces acumulan menos cantidades de estos contaminantes porque poseen un sistema enzimático eficiente para degradar los OTC en el organismo (Laughlin *et al.*, 1986).

En el sedimento, el TBT puede persistir durante años (incluso décadas) representando un depósito de este contaminante que puede constituir un riesgo ecotoxicológico elevado y persistente a largo plazo (Alzieu, 2003). En los sedimentos anóxicos, el TBT presenta una vida media estimada de 8 a 20 años, mientras que en agua, la vida media de este compuesto puede ser desde días hasta semanas, decreciendo con la temperatura y actividad biológica del medio. Se estima que el TBT podría alcanzar los 15 días, mientras que DBT sólo alcanzaría los 10 días (Ranke & Jastorff, 2000). La persistencia de los OTC en los ecosistemas es función de mecanismos de remoción físicos (adsorción de sólidos en suspensión y sedimentos), químicos (degradación química y fotoquímica) y biológicos (absorción y degradación biológica) (Hoch, 2001).

### 1.1.5 Toxicidad de los compuestos orgánicos de estaño

Entre los compuestos organoestánicos, el monobutilestaño es considerado el menos dañino ya que no hay suficientes datos toxicológicos disponibles que indiquen una toxicidad significativa, tanto en humanos como en el ambiente terrestre y marino. Algunos estudios demostraron que ratones tratados con una dosis alta de tricloruro de monobutilestaño ( $4.000 \text{ mg/kg}$ ) desarrollaron hemorragias en el tracto digestivo (Herzke *et al.*, 2007).

El dibutilestaño es considerablemente más tóxico que el derivado mono-sustituido con dosis letales agudas alrededor de 50 mg kg<sup>-1</sup>. Los signos de envenenamiento incluyen daños en el hígado e inflamación en el conducto biliar. El DBT tiene un efecto selectivo en el timo, seguido de un agotamiento de linfocitos, indicando la supresión del sistema inmune. De hecho, el DBT es considerado principalmente como un compuesto potencialmente inmunotóxico. Los efectos tóxicos de los diorganoestánicos, son probablemente debidos a su capacidad para penetrar las membranas celulares, interferir con el mecanismo de transferencia de electrones de la célula e interactuar con los complejos respiratorios mitocondriales (Fent, 1996b; Harrison & de Mora, 1996; Nesci *et al.*, 2011). El DBT, puede impedir el consumo de oxígeno en las mitocondrias actuando sobre el metabolismo celular e inhibiendo la síntesis de adenosina trifosfato (ATP), ocasionando de esta forma, la liberación de citocromo C (apoptosis) (Nishikimi *et al.*, 2001).

La Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades de Estados Unidos (ATSDR) ha evaluado niveles de exposición que presenten un riesgo mínimo para los seres humanos (MRL) para DBT de 0,005 mg/kg/día, en base al nivel de mínimo efecto tóxico observable (LOAEL) de 5 mg/kg/día para los efectos inmunológicos en ratas (Herzke *et al.*, 2007).

Los efectos ocasionados por TBT son más conocidos y estudiados. Los primeros efectos dañinos sobre organismos no integrantes de las incrustaciones biológicas fueron evidenciados en la Bahía de Arcachon (Francia) donde se reportaron los problemas más agudos por contaminación con TBT, a finales de la década de 1970 (Alzieu, 2000a). De 1975 a 1982, la producción de ostras se vio gravemente afectada como consecuencia de problemas de retraso en el crecimiento, seguido por ausencia total de reproducción y graves deformaciones en las valvas de los ejemplares adultos, que los hacían no aptos para el consumo (Alzieu, 1991). His & Robert (1985) demostraron que la ausencia de larvas no se debió a problemas de fecundidad de la ostra madre, sino que se debía a la concentración de TBT en las aguas de la bahía.

La inhibición de los mecanismos de transporte transmembrana, incluidas las bombas iónicas, es uno de los principales efectos de los compuestos organoestánicos (Pagliarani *et al.*, 2010). Varios estudios realizados en mamíferos y diversos animales acuáticos, demuestran que el tributil y el trifenilestaño (TPT) interfieren con la homeostasis hidromineral, afectando el metabolismo de los glucocorticoides y modificando la permeabilidad de la membrana e inhibiendo la Na-K-ATPasa (Vasic *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2012).



La contaminación de los sistemas acuáticos por TBT y TPT, puede provocar malformaciones en ostras inhibiendo su calcificación (Alzieu, 2000b), esterilidad en neogasterópodos y gasterópodos (Gibbs *et al.*, 1991), retardo en el crecimiento en mejillones (Salazar & Salazar, 1991, 1996) y disfunción inmunológica en peces (Suzuki *et al.*, 1992). Aún en concentraciones del orden de los nanomoles ( $1-2 \text{ ng L}^{-1}$ ), el TBT puede causar envenenamiento agudo y crónico en muchos organismos acuáticos tales como algas, zooplancton, moluscos y algunos peces en estadíos larvales, incluso en zonas alejadas de los focos emisión (Gibbs *et al.*, 1986).

Según la Organización Mundial de la Salud (WHO 1990), las concentraciones letales se encuentran en el intervalo de  $0,04$  a  $16 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  para exposiciones a corto plazo, dependiendo de la especie. Asimismo, numerosos trabajos han reportado los efectos nocivos del TBT sobre diversas especies acuáticas de gran interés económico-comercial, en especial sobre gasterópodos y moluscos (Bao *et al.*, 2011). Trabajos posteriores han confirmado su bioacumulación en la cadena trófica (Harino *et al.*, 2007).

En cuanto a los efectos endocrinos de los compuestos de TBT, desde principios de los '80 se comenzó a observar el desarrollo de características sexuales masculinas en ejemplares hembra de algunos caracoles marinos, una condición llamada "imposex", (Bryan *et al.*, 1987; de Mora, 2000). Se ha demostrado que el TBT, a concentraciones de  $1 \text{ ng L}^{-1}$ , es capaz de inducir el desarrollo de estas características en caracoles hembra adultos. La bioacumulación de TBT en gasterópodos y sus efectos en la disrupción endocrina resultan en el aumento de testosterona promoviendo de este modo la aparición de "imposex" (Horiguchi *et al.*, 1997). Actualmente se ha reportado la aparición de esta condición en más de 260 especies de gasterópodos (Titley-O'Neal *et al.*, 2011). Se ha determinado que la aparición y la intensidad de este fenómeno son proporcionales a los niveles ambientales de TBT. Por esta razón los gasterópodos son reconocidos como buenos biomarcadores de contaminación causada por estos compuestos organoestánicos (Sousa *et al.*, 2009a). Los datos toxicológicos determinan que los moluscos, bivalvos y gasterópodos, son los más sensibles al TBT.

El TBT es considerado un contaminante crónico que, según su concentración, puede causar diversos efectos en invertebrados y algunos vertebrados marinos (Alzieu, 2000b). A pesar de las altas concentraciones de compuestos organoestánicos encontrados en invertebrados acuáticos, no existe mucha información sobre la acumulación y efectos tóxicos de estos contaminantes en niveles tróficos más elevados. Trabajos recientes demuestran que, incluso concentraciones muy bajas de OTC son capaces de inducir efectos endocrinos en mamíferos, incluidos los seres humanos, tales como modificación en la implantación del embrión, cambios en la función de las células

de Sertoli y Leydig, en el peso de los órganos sexuales y en las hormonas sexuales, alteración en la actividad de enzima aromatasa en diferentes líneas celulares del ovario y, por último, modificaciones en la actividad de diferentes glándulas, como la tiroides (Delgado Filho *et al.*, 2011).

En 2004, la Comisión OSPAR, Convención para la Protección del Medio Ambiente Marino del Atlántico del Nordeste, actualizó los valores de los criterios de evaluación ecotoxicológicos (EAC) para TBT en agua de mar y biota, de acuerdo a los conocimientos más recientes sobre los posibles efectos adversos en la población de moluscos provocados por la presencia TBT (OSPAR, 2004). Propuso, para el agua de mar, como valores inferior y superior de EAC:  $0,04 \text{ ng Sn L}^{-1}$  ( $0,1 \text{ ng TBT L}^{-1}$ ) y  $0,62 \text{ ng Sn L}^{-1}$  ( $1,5 \text{ ng TBT L}^{-1}$ ), respectivamente. En el caso de muestras biológicas, la Comisión OSPAR planteó un EAC inferior de  $4,91 \text{ ng Sn g}^{-1}$  ( $12,0 \text{ ng TBT L}^{-1}$ ) y EAC superior de  $71,7 \text{ ng Sn g}^{-1}$  ( $175 \text{ ng TBT L}^{-1}$ ) (Furdek *et al.*, 2012). El valor más bajo de EAC es la concentración necesaria para la protección de todas las especies marinas de los efectos tóxicos crónicos, incluyendo las especies más sensibles, mientras que el valor de EAC superior se define como la más alta concentración para la cual no se esperan efectos tóxicos agudos. Entre los valores de la EAC inferior y superior todos los efectos biológicos son posibles (la respuesta de biomarcadores, problemas de crecimiento y reproducción, entre otros). Por encima del valor de EAC superior, son probables los efectos tóxicos tanto crónicos como agudos.

En el hombre, el contacto con TBT, provoca irritaciones oculares y de la piel, que pueden conducir a dermatitis severa. Los síntomas se deben principalmente a los efectos que ejerce el TBT en el sistema nervioso central: dolor de cabeza, náusea, vómitos, mareo y a veces convulsiones y pérdida del conocimiento, desórdenes mentales y fotofobia (Blunden & Evans, 1990). Se ha descrito dolor epigástrico, incluso en envenenamientos causados por inhalación. En algunos casos ha ocurrido aumento de la glucosa en la sangre, suficiente para causar glucosuria (Colosio *et al.*, 1991; Carpinteiro Botana, 2005). Sin embargo, no se ha reportado ningún caso de envenenamiento por ingestión directa (Alzieu, 2003).

#### **1.1.6 Legislación: breve reseña histórica**

Hasta ahora, los controles legislativos sobre los compuestos organoestánicos se han centrado especialmente en el TBT presente en pinturas anti-incrustantes. El éxito comercial de las pinturas autopulimentantes de lixiviación controlada radica en que los buques pueden llegar a estar hasta 60 meses sin necesidad de volver a pintarlos. Esto ha permitido, sin duda, una gran ampliación de las actividades comerciales de los buques,

con increíbles ventajas económicas de funcionamiento. Sin embargo, los aspectos negativos de los TBT en estas pinturas, no fueron sospechados hasta finales de 1960, cuando se descubrieron los efectos colaterales en especies no-blanco. A pesar de los esfuerzos y advertencias realizadas, para fines de 1970 el desarrollo y uso de pinturas a base de TBT se había extendido masivamente para todas las embarcaciones comerciales y deportivas.

A principios de los '80, un hecho particular marcó la historia de la legislación relacionada con los OTC: la conocida merma en la cosecha de ostras (*Crassostrea gigas*) en la Bahía de Arcachon, Francia. Como ya se comentó, esto condujo a la investigación e identificación del TBT como causante de la disminución en el tamaño y grosor de las valvas. En enero de 1982, el Ministerio de Ambiente de Francia promulgó la prohibición, por dos años, de pinturas que contuvieran más del 3% de TBT. En principio, la medida contemplaba embarcaciones menores a 25 toneladas de peso y abarcaba la costa Atlántica y el canal inglés; pero luego fue extendido para todas las pinturas y todas las embarcaciones (Alzieu *et al.*, 1986; Alzieu, 1991). Se hizo una excepción para embarcaciones con casco de aluminio puesto que el cobre producía corrosión (Lewis, 1999).

Por su parte, Inglaterra incorporó la legislación en 1985. En primera instancia las medidas tendieron a limitar la venta y el contenido de las pinturas de asociación libre y luego disminuir el porcentaje de Sn en las pinturas de copolímero. También se realizaron campañas de difusión explicativas acerca de cómo cambiar los anti-incrustantes en cada embarcación y se definió el primer nivel provisional de calidad ambiental (*Environment Quality Target*) para agua ( $20 \text{ ng L}^{-1}$ ) (Champ, 2000). Por último, se establecieron programas de monitoreo sistemático e investigación. Un tiempo más tarde (1987), las autoridades inglesas reforzaron la legislación, disminuyendo tanto el valor del estándar de calidad (de  $20 \text{ ng L}^{-1}$  a  $2 \text{ ng L}^{-1}$ ) como el contenido mínimo de Sn en pinturas de copolímero (de 7,5 a 5,5%) (Abel, 2000). A partir de estas medidas se consideró al TBT con el mismo nivel de peligrosidad que los pesticidas y se reglamentó la prohibición de su fabricación, distribución, comercialización y uso, con excepción de autorización expresa por parte de los ministerios.

Suiza y Austria, a pesar de no tener acceso al océano, han prohibido todo uso de TBT en ambientes de agua dulce. Alemania por su parte, ha tomado algunas medidas que van desde la prohibición de aplicación a botes menores a 25 m de eslora, hasta la proscripción de la comercialización minorista y uso en estructuras para maricultura. El límite permitido en pinturas poliméricas ha sido fijado en 3,8% y su desecho y disposición final se encuentran regulados.

A partir de diversos estudios desarrollados en Japón en la década del '80, el gobierno decidió regular siete compuestos de trifenilestaño y trece de la familia de los TBT como especies químicas clase II, es decir, moderadamente peligrosos. De esta manera la utilización, venta y consumo de estos compuestos quedaron reglamentados a partir del año 1990, así como también la aplicación de TBT a barcos nacionales e internacionales con períodos de entrada a dique seco menores a un año. Los relevamientos científicos en los años subsiguientes demostraron que la aplicación de estas regulaciones ha dado lugar a la disminución de los niveles de TBT en el océano y en ciertos tejidos de especies marinas (por ejemplo, hígado de calamar) que han demostrado coeficientes de bioacumulación de hasta 480.000.

La aplicación de estas leyes, que ya regían en Europa, se demoró un poco más en los Estados Unidos de Norteamérica (EEUU) debido, en principio, a razones económicas: el beneficio obtenido a partir del uso de TBT sin restricciones era calculado en ese momento en 100-300 millones de dólares por año (Champ, 2000). Finalmente, en 1988, el gobierno federal elevó una "Acta de control para pinturas anti-incrustantes" que preveía medidas similares a las tomadas por Inglaterra (Ten Hallers-Tjabbes, 1997; Champ, 2000).

En 1989, Canadá, Australia y Nueva Zelanda introdujeron regulaciones análogas a las de EEUU (Ten Hallers-Tjabbes, 1997). La legislación estaba dirigida a la prohibición del uso de pinturas conteniendo TBT en cascos nuevos, su producción e importación. El mismo patrón regulatorio se extendió, y hacia 1992 muchos países contaban con legislación regulatoria para TBT.

En Argentina (1998), la institución que regula el transporte marítimo (Prefectura Naval Argentina) prohibió el uso de pinturas anti-incrustantes a base de TBT en todos los tipos de buques (Ordenanza nº 4/98) (Ohji *et al.*, 2007).

En el año 2001, la comisión del Parlamento Europeo incluyó los OTC como sustancias prioritarias peligrosas sometidas a cese de emisiones, vertidos y pérdidas en el agua (Directiva política de aguas 2000/60/CE) (Antizar-Ladislao, 2008). Además, la Organización Marítima Internacional (OMI) impulsó un tratado mundial para limitar la aplicación de pinturas a base de TBT a partir del 1 de enero del 2003, y la prohibición total a partir del 01 de enero de 2008 (OMI, 1999).

## 1.2 Metodologías analíticas para la determinación de compuestos organoestánicos: Aspectos Generales

Como se ha mencionado, existen distintas formas en las que se pueden presentar los compuestos organoestánicos, y sus efectos tóxicos son diferentes dependiendo de la especie química en consideración. Hay evidencia de que existe una relación directa entre la forma química de los compuestos orgánicos de estaño y su biodisponibilidad, forma de transporte, toxicidad y propiedades fisicoquímicas. Como resultado, la determinación de las especies en que se distribuye un elemento químico es esencial, ya que ayuda a definir su potencial de acción (Rosenberg, 2005). Es aceptado que la especiación genera mayor información que el simple conocimiento de las concentraciones totales (Tessier & Turner, 1995; Salomons *et al.*, 1995)

En general, se define como especiación química al proceso de identificar y/o cuantificar las diferentes formas o especies químicas presentes en un material determinado. El análisis de especiación incluye el estudio de los elementos en sus distintos estados de oxidación y de los compuestos químicos de los cuales forman parte. En el caso del estaño, es de interés estudiar sus asociaciones con moléculas orgánicas. Como mencionamos anteriormente, el estaño es un metal que no se considera nocivo para la salud o el ambiente *per se*, sin embargo los compuestos organometálicos de estaño pueden ser altamente tóxicos y se encuentran entre los contaminantes ambientales más peligrosos, generando gran preocupación en las últimas décadas.

La determinación de la forma química de los elementos constituye un desafío desde el punto de vista de la química analítica. Las especies orgánicas son, a menudo, inestables y las concentraciones encontradas en muestras ambientales son del orden de  $\mu\text{g g}^{-1}$  o inferiores, para sedimentos y tejidos biológicos, y del orden de  $\mu\text{g L}^{-1}$  para aguas estuarinas. Esto implica que, frecuentemente, se debe recurrir a operaciones previas sobre las muestras, tendientes a la preconcentración de los analitos de interés. Por el contrario, las formas inorgánicas pueden estar simultáneamente presentes en concentraciones mil veces mayores.

### 1.2.1 Técnicas de extracción

En este sentido, dependiendo de las diferentes muestras ambientales, existen diversas técnicas que pueden utilizarse, entre las que se incluyen la extracción asistida por ultrasonido (USE) (de Mora *et al.*, 2003; Chandrinou *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2010), la extracción asistida por microondas (MAE) (Üveges *et al.*, 2007; Flores *et al.*, 2011), la extracción en fase sólida (SPE) (Wang *et al.*, 2008; Gallego-Gallegos *et al.*, 2010), la

microextracción en fase sólida (SPME) (Segovia-Martinez *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2007), la extracción con líquido presurizado (PLE) (Konieczka *et al.*, 2007), la extracción líquido-líquido con surfactantes utilizando la técnica de punto nube (Louppis *et al.*, 2010), la extracción con fluidos supercríticos (SFE) junto con agente complejantes (Liu *et al.*, 1994; Fernández-Escobar & Bayona, 1997), la extracción con soxhlet (Dietz *et al.*, 2007), la extracción por adsorción con barras magnéticas (SBSE) (Prieto *et al.*, 2008; Neng *et al.*, 2014), la extracción acelerada por disolventes (ASE) (Arnold *et al.*, 1998; Wasik & Ciesielski, 2004), entre otras.

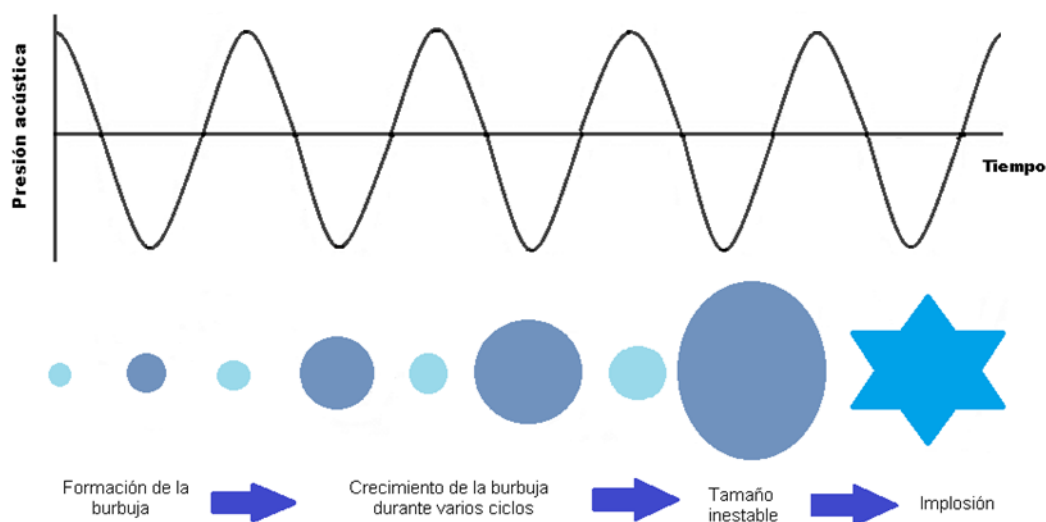
Entre las técnicas mencionadas, en esta Tesis se utilizará particularmente la extracción asistida por energía de ultrasonido, dadas las ventajas inherentes a esta técnica que se detallan a continuación.

### 1.2.1.1 Extracción asistida por ultrasonido

Ultrasonido es el nombre dado a cualquier onda de sonido cuya frecuencia sea superior a la frecuencia más alta que es capaz de captar el oído humano, esto es, de más de 16 kHz. Se distinguen dos áreas de ultrasonido, la de alta frecuencia (de 1 a 10 MHz) y baja energía, y la de baja frecuencia (entre 20 y 100 kHz) y alta energía. Los ultrasonidos ejercen su efecto a través de lo que se conoce como burbujas de cavitación (**Figura 1.4**). El sonido, incluyendo el ultrasonido, es transmitido a través de cualquier medio físico por medio de ondas que comprimen y estiran el espacio molecular a través de su paso por el medio. Los ciclos de compresión juntan las moléculas del medio mientras que los ciclos de expansión las separan. Cuando una onda del ultrasonido causa una presión negativa suficiente a través de un líquido, la distancia entre las moléculas del mismo excede la mínima distancia molecular requerida para mantener el líquido intacto, lo que origina que las fuerzas de cohesión se rompan y se cree un vacío; literalmente el líquido se abre para formar burbujas microscópicas. A este vacío es a lo que se denomina burbujas de cavitación.

Estas burbujas van creciendo en unos cuantos ciclos, desde una medida inferior al micrómetro hasta unas decenas de micrómetros, atrapando vapores o gases del medio. El crecimiento de la cavidad durante cada expansión es ligeramente más grande que el encogimiento durante la compresión. Así, a lo largo de muchos ciclos acústicos, la cavidad va creciendo hasta lograr finalmente una medida crítica con la cual puede absorber eficientemente energía ultrasónica. En este punto, la cavidad puede crecer rápidamente durante un ciclo acústico adquiriendo una medida inestable con la que ya no puede absorber energía eficientemente. Sin esta energía la cavidad no se puede

mantener y el líquido que la rodea entra violentamente a la cavidad, ocasionando su implosión. La rápida compresión de los gases y vapores dentro de la burbuja genera temperaturas y presiones enormes, de hasta 5000 °C y 1000 atm, respectivamente. Dado que las burbujas son muy pequeñas en comparación con el volumen del líquido que hay alrededor, el calor generado se “disipa” muy rápidamente, con lo cual las condiciones ambientales se mantienen esencialmente inalteradas. Esta combinación de altas temperaturas, altas presiones y rápido enfriamiento genera unas condiciones difícilmente alcanzables con otras técnicas. Así se produce, por una parte, un incremento local de temperatura que favorece la solubilidad donde se produce la explosión de la burbuja, y, por otra, un aumento de presión que provoca una mejor penetración del disolvente al interior del sólido.



**Figura 1.4-** Formación de burbujas ultrasónicas y su violenta implosión.

La extracción asistida por ultrasonido es una alternativa que se caracteriza fundamentalmente por su bajo costo, sencillez y eficiencia en comparación con técnicas convencionales de extracción. Además, dentro de las principales ventajas de esta técnica se incluyen: el aumento de rendimiento de la extracción, la reducción tanto de la cantidad de muestra como del volumen de disolvente, la disminución del tiempo utilizado y de la temperatura de trabajo. Esta reducción de la temperatura permite la extracción de analitos termolábiles.

Los equipos ultrasónicos comerciales más comunes en los laboratorios químicos son el baño de ultrasonido y la sonda ultrasónica. El baño presenta las ventajas de ser la fuente de irradiación económicamente más asequible, al tiempo que asegura una

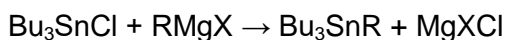
distribución homogénea de la energía en el reactor que se coloque en el baño. La sonda destaca por su mayor potencia, y por el hecho de que ésta sea variable.

### 1.2.2 Técnicas de derivatización

Muchos de los métodos desarrollados para la determinación de compuestos organoestánicos están basados en la utilización de la cromatografía de gases (CG) como técnica de separación. Debido a que los OTC presentes en el ambiente (excepto los tetrasustituidos) son polares y no volátiles, necesitan ser derivatizados a compuestos compatibles con su separación mediante CG, es decir, a especies volátiles y térmicamente estables. La derivatización puede considerarse como un paso crítico en el análisis debido a los bajos rendimientos de la reacción de derivatización y a la pérdida de analitos que puede tener lugar durante esta etapa. Por otro lado, pueden suscitarse fenómenos de degradación, que conllevan una subestimación del contenido de OTC en las muestras, afectando en gran medida la calidad de los resultados.

Las reacciones de derivatización más comúnmente empleadas son:

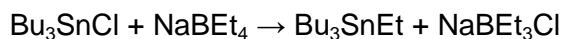
- ✓ alquilación con reactivos de Grignard (RMgX)



Estas reacciones tienen la ventaja de poder utilizarse para la derivatización de la mayoría de los compuestos orgánicos de estaño presentes en el ambiente (especies metiladas, butiladas y feniladas) y en una gran variedad de muestras (agua, sedimentos, biota) (Vella *et al.*, 2000; Tsunoi *et al.*, 2002; de Oliveira *et al.*, 2010) con altos rendimientos y buena reproducibilidad. Sin embargo, tienen ciertas limitaciones: son reacciones que llevan mucho tiempo, sólo se pueden usar disolventes apolares y no próticos para evitar que estos derivatizantes se descompongan y suelen emplearse en combinación con agentes complejantes. Además, implican el uso de un reactivo considerado como químicamente peligroso, ya que reacciona violentamente con ácidos, agua, alcohol, cetonas, entre otros, por lo que se necesita extremo cuidado para manipularlo. Asimismo, es necesario eliminar el exceso de reactivo una vez finalizada la reacción, generalmente por la adición de un ácido.

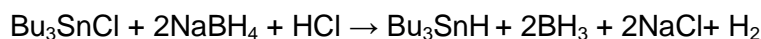
- ✓ etilación con tetraetilborato de sodio (NaBEt<sub>4</sub>)





La reacción de derivatización es rápida, cuantitativa y no es necesario eliminar los subproductos generados. Además los derivados etilados resultantes poseen un punto de ebullición muy superior al de los hidruros de estaño, por lo que las pérdidas por evaporación son menos probables. Otras ventajas de este tipo de reacción consisten particularmente en ser adecuadas para muestras acuosas (después de ajustar el pH a 5), pueden aplicarse directamente sobre este tipo de muestras y permiten realizar la derivatización de los compuestos organoestánicos y su extracción simultánea a un disolvente orgánico (Rajendran *et al.*, 2000). La etilación, en contraste con la generación de hidruros, presenta altos rendimientos en la derivatización, no sólo para los compuestos de butilestaño sino también para compuestos de fenilestaño. Una de las desventajas que presenta es que el  $\text{NaBEt}_4$  no es estable y se descompone en presencia de ácidos fuertes, habitualmente requeridos para la extracción de OTC en muestras sólidas. Tampoco se puede aplicar este tipo de derivatizante a la determinación de las especies etiladas.

- ✓ formación de hidruros con borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$ )



Es muy utilizada para la determinación de OTC, en particular para especies de butilestaño en muestras ambientales (Dowling & Uden, 1993). La principal ventaja, al igual que  $\text{NaBEt}_4$ , es que puede aplicarse directamente sobre este tipo de muestras. Además, permite llevar a cabo simultáneamente la derivatización y la extracción *in situ*, reduciendo el número de pasos analíticos y, por lo tanto, las fuentes potenciales de error. El uso de  $\text{NaBH}_4$  brinda altos rendimientos en la formación de hidruros orgánicos de estaño, es fácil de aplicar y permite separar los analitos de interés, de los posibles interferentes presentes en la matriz de la muestra (Xiao *et al.*, 2008; Martin & Donard, 1995). El inconveniente de esta reacción es que los compuestos resultantes son altamente volátiles.

### 1.2.3 Limpieza de la muestra

Consiste en la eliminación de componentes de la matriz tales como lípidos, grasas, proteínas y azufre, entre otros, debido a que pueden afectar seriamente el rendimiento tanto de la derivatización como de la extracción. Los adsorbentes en fase sólida usados durante la purificación del extracto están generalmente caracterizados por una gran área superficial y la presencia de sitios específicos para la adsorción. La adsorción puede ser física (donde las moléculas son atrapadas en la superficie del sólido por fuerzas de Van der Waals) o química (donde se retienen las moléculas con más fuerza mediante la unión reversible a la superficie del adsorbente). La propiedad básica que rige la adsorción es la polaridad, y por lo tanto es un factor limitante para la desorción. Cuando las moléculas se eluyen con un disolvente pueden ser extraídas de la superficie del adsorbente o desplazadas por solubilización de los sitios a través de un disolvente que es adsorbido más fuertemente que el analito de interés (Anderson, 1987; de Carvalho Oliveira & Santelli, 2010). Los adsorbentes comúnmente utilizados son el gel de sílice (sitios activos Si-OH), alúmina (sitios activos Al-OH) y Florisil (ampliamente utilizado para las matrices bióticas con alto contenido en lípidos). Por lo general, deben ser activados antes de su uso por calentamiento para desorber agua y/u otros compuestos de la atmósfera eventualmente adsorbidos (Takeuchi *et al.*, 2000).

### 1.2.4 Técnicas analíticas

En la mayoría de los casos, la especiación de los compuestos organoestánicos requiere la utilización de técnicas de separación. En este sentido, las técnicas cromatográficas presentan mayor versatilidad, debido a la compatibilidad que presentan con una amplia variedad de detectores.

Muchos de los métodos analíticos desarrollados para la determinación de especies de compuestos organoestánicos utilizan como técnica analítica de separación la cromatografía gaseosa (GC), debido a su alta resolución y a la gran disponibilidad de detectores que pueden ser acoplados a ella (Takeuchi *et al.*, 2000): detector de ionización en llama (FID), espectrometría de absorción atómica (AAS), espectrometría de emisión atómica con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-AES), espectrometría de emisión atómica con fuente de plasma inducido por microondas (MIP-AES), detector fotométrico de llama (FPD), detector fotométrico de llama por pulsos (PFPD), espectrometría de masas (MS), espectrometría de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

La cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), permite evitar el paso de derivatización, minimizando el número de operaciones previas involucradas en la determinación, lo que hace al procedimiento menos propenso a la contaminación o pérdida de analito (de Carvalho Oliveira & Santelli, 2010). Uno de los problemas que presenta esta técnica para la determinación de compuestos organoestánicos, es la falta de grupos cromóforos en estas especies, lo que impide el uso directo de detectores UV, que son los más comúnmente acoplados a la cromatografía líquida en los laboratorios de rutina. Los detectores empleados suelen ser ópticos (fluorescencia), generación de hidruros seguida de Absorción Atómica (AAS) o detectores de masa con fuente de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

Recientemente, ha habido un creciente interés en la separación y determinación de compuestos iónicos e ionizables utilizando electroforesis capilar (CE) debido a su alta eficiencia y sencillez (de Carvalho Oliveira & Santelli, 2010). La mayor parte de los compuestos organoestánicos presentes en muestras de origen ambiental existen como cationes o complejos cargados eléctricamente. Debido a su sencillez y menor costo, los detectores utilizados habitualmente en CE son ópticos (detectores de absorción molecular UV y detectores de fluorescencia). Sin embargo, al igual que en HPLC, la detección directa de compuestos organoestánicos utilizando absorción molecular UV o fluorescencia es difícil, porque la mayoría de los compuestos orgánicos de estaño poseen pocos grupos cromóforos y de baja absorción. Una alternativa para el uso de estas técnicas es la detección indirecta, pero la sensibilidad analítica generalmente no es satisfactoria. El acoplamiento de la CE a detectores de masas resulta ser el más adecuado para la detección de estos compuestos a niveles de trazas. Sin embargo también se ha reportado el uso de detectores de gradiente de potencial y la generación de hidruros seguida de la detección mediante fluorescencia atómica. Entre las ventajas de la CE se pueden mencionar: bajos tiempos de análisis, alta eficiencia, fácil manipulación de la muestra, escaso uso de solventes orgánicos y baja producción de residuos en comparación con la cromatografía líquida.

Debido a que los compuestos organoestánicos han demostrado tener un efecto perjudicial sobre el ambiente inclusive a bajas concentraciones, es necesario el uso de técnicas analíticas que permitan realizar una monitorización y control confiable de estos compuestos en distintas matrices ambientales (Quintas *et al.*, 2014). Es importante que los límites de detección de los métodos analíticos desarrollados en base a estas técnicas alcancen los niveles mínimos permitidos o sugeridos por la legislación. Asimismo, son necesarios métodos sensibles para la determinación correcta y simultánea de compuestos organoestánicos en concentraciones extremadamente bajas (Hoch, 2001).

En esta Tesis se empleará particularmente la cromatografía gaseosa con detección de masas (GC-MS).

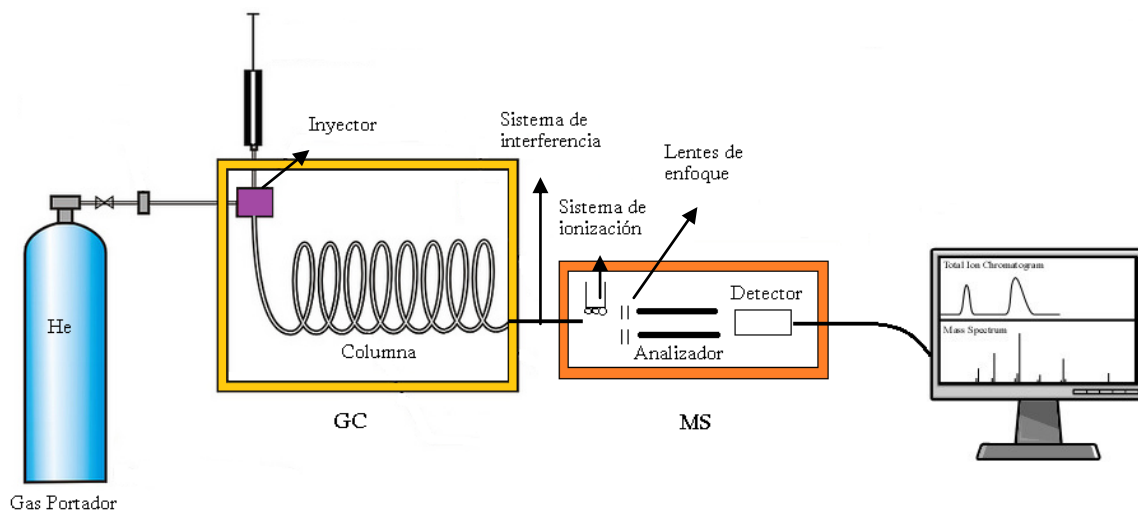
#### 1.2.4.1 Cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS)

En cromatografía gaseosa, la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de una columna cromatográfica. La elución se produce por el flujo de la fase móvil, que es un gas químicamente inerte (helio, argón, nitrógeno, dióxido de carbono e hidrogeno) el cual no interacciona con las moléculas del analito; su única función es la de transportarlo a través de la columna. La cromatografía gas-sólido, abreviada CG, se basa en una fase estacionaria sólida en la cual se produce la retención de los analitos como consecuencia de la adsorción física.

Los componentes básicos de un CG-MS se muestran en la **Figura 1.5**. Como sistema de inyección de la muestra comúnmente se utiliza una microjeringa a través de un diafragma o septum de goma de silicona, en una cámara de vaporización instantánea situada en la cabeza de la columna. La eficacia de la columna requiere que la muestra sea de un tamaño adecuado y que sea introducida como un “tapón” de vapor. La inyección lenta de muestras demasiado grandes provoca un ensanchamiento de las bandas y una mala resolución. En cuanto a las columnas, existen dos tipos: las empaquetadas, también llamadas de relleno, y las *capilares* (tubulares abiertas). En general, varían desde 2 hasta 50 m, o más. Se construyen de acero inoxidable, vidrio, sílice fundida o teflón, normalmente se configuran como helicoides con diámetros de 10 a 30 cm a fin de poder colocarlas en el interior de un termostato. Este último es fundamental, puesto que la temperatura es una variable importante. Para muestras con un amplio intervalo de puntos de ebullición se suele emplear una programación de temperatura, con lo que se aumenta la temperatura de la columna, ya sea de forma continua o bien por etapas, al mismo tiempo que tiene lugar la separación.

Una vez que la muestra es introducida en el espectrómetro de masas (MS), a través del sistema de interferencia, se produce la ionización de la muestra, en la que se transforman los átomos o moléculas en especies iónicas en fase gaseosa, con la consiguiente pérdida de electrones o protones. En cuanto a los sistemas de ionización, existen una amplia variedad, pero ninguno de ellos es universal y la elección del tipo de ionización viene determinada por la naturaleza de la muestra y la clase de información que se desea obtener. El más empleado, y utilizado en ese trabajo de Tesis fue el de *ionización por impacto de electrones (EI)*. Es un proceso en el que la muestra, previamente vaporizada, se somete a un bombardeo mediante electrones acelerados que

chocan con las moléculas provocando su ionización. La elevada energía cinética de los electrones acelerados y su pequeña masa proporcionan a las moléculas con las que impactan, una energía que provoca una elevada fragmentación dando lugar a un gran número de iones positivos que pueden tener mayor o menor masa que la del ión molecular.



**Figura 1.5-** Esquema de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS).

Los iones son entonces conducidos mediante un acelerador de iones a un tubo analizador, donde se produce la separación y el análisis de los iones moleculares y de los fragmentos cargados producidos según su relación masa/carga. El más empleado es el analizador de cuadrupolo (Q) el cual, consiste en cuatro barras paralelas, separadas entre ellas, a las que se aplica un potencial de corriente continua, sobre el que se superpone un potencial de radiofrecuencia. Los iones atraviesan el espacio entre las barras y el campo creado en ellas actúa a modo de filtro, determinando qué iones alcanzarán el detector.

El detector genera una señal eléctrica proporcional al número de iones que han pasado a través del filtro de masas, la cual puede ser amplificada, almacenada y presentada mediante el sistema de tratamiento de datos de forma que se pueda interpretar. Sus características más importantes son sensibilidad, exactitud, adecuada resolución, tiempo de respuesta, estabilidad, amplio intervalo dinámico y un nivel de ruido bajo.

El espectro de masas obtenido es una representación de la abundancia relativa de los iones y fragmentos separados respecto a la relación masa/carga. Cada compuesto es único, y por tanto, cada uno de los compuestos se ionizará y fragmentará de una determinada manera, y en este principio se basa la espectrometría de masas para identificar cada analito.

### **1.3 Planteamiento de hipótesis y objetivos**

#### **1.3.1 Hipótesis de trabajo**

- Todos los sitios estudiados a lo largo del estuario de Bahía Blanca han sido impactados por la presencia de TBT y sus productos de degradación, portando los niveles más altos los sitios cercanos a zonas de intenso tráfico marino.
- Las concentraciones de TBT, DBT y MBT en los sitios estudiados varían en las distintas épocas del año.

#### **1.3.2 Objetivos generales y específicos.**

##### **1.3.2.1 Objetivos Generales**

- Desarrollar, optimizar y evaluar nuevas metodologías analíticas tendientes a llevar a cabo el análisis de especiación de los compuestos orgánicos de estaño aplicado en muestras del ambiente marino.
- Evaluar la presencia y distribución de los compuestos organoestánicos en el área de estudio en relación a los parámetros oceanográficos.
- Comprender el ciclo dinámico de estos compuestos (con énfasis en el TBT), considerando su ciclo estacional y tasa de degradación.
- Caracterizar el impacto de los OTC (TBT, DBT y MBT) en el sistema marino-costero bajo estudio, etiquetando zonas de acuerdo a la magnitud del impacto y estableciendo posibles "hotspots" o reservorios de estos contaminantes.

##### **1.3.2.2 Objetivos Específicos**

- Estudiar las diferentes etapas analíticas para la determinación de TBT y sus productos de degradación en muestras ambientales marinas. Evaluar los problemas analíticos inherentes al muestreo, tratamiento previo al almacenamiento, extracción, preconcentración y detección.

- 
- Establecer y validar procedimientos operacionales que apunten a la determinación de TBT y sus productos de degradación.
  - Determinar la concentración de OTC en muestras ambientales del estuario de Bahía Blanca, incluyendo zonas fuertemente antropizadas (por ej., zonas portuarias y dique seco) y zonas libres de intervención (por ej., islotes de la reserva ambiental)
    - Sedimentos superficiales de las planicies de marea elegidas
    - Agua de mar sub-superficial (disuelto y material particulado en suspensión)
    - Mejillines, *Brachidontes rodriguezzi*
  - Los datos obtenidos, los cuales poseen una estructura multidimensional, serán sometidos a un tratamiento quimiométrico a través del Análisis de Componentes Principales Desplegado (U-PCA), para obtener una mejor visualización y comprensión de los resultados.

## CAPÍTULO 2: ÁREA DE ESTUDIO Y METODOLOGÍA

### 2.1 Área de estudio

#### 2.1.1 Definición de estuario

Cada estuario es único dado sus propias características intrínsecas que lo hacen diferente de los otros (Perillo, 1995). Etimológicamente, la palabra estuario deriva del latín “*aestus*” que significa “de marea”. Desde un punto de vista oceanográfico, Perillo (1995) definió al estuario como un cuerpo de agua costero semicerrado que se extiende hasta el límite efectivo de la influencia de la marea, dentro del cual, el agua salada que ingresa por una o más conexiones libres con el mar abierto, o cualquier otro cuerpo de agua salino, es diluida significativamente con agua dulce derivada del drenaje terrestre, y puede sustentar especies biológicas eurihalinas ya sea por una parte o la totalidad de su ciclo de vida.

Cada expresión se analizó a efectos de comprender dicha definición (Perillo, 2007);

...*cuerpo de agua costero*. Entendiendo como costa una zona de ancho variable que incluye tanto una parte en el continente como otra en el mar. Por lo tanto, los estuarios forman parte del continente y no son un ámbito totalmente marino, sino que representan una zona intermedia transicional entre ambos ambientes.

...*semicerrado*, implica que tanto los márgenes como el fondo del estuario ejercen una considerable influencia sobre la dinámica del ambiente, especialmente en lo que se refiere a la propagación de la onda de marea dentro de ellos.

...*influencia de la marea*. La marea es proveedora de más del 80% de la energía necesaria para generar los procesos que ocurren en los estuarios. Además de ser clave para la introducción de sal y otros elementos marinos, está asociada a la erosión, circulación y depositación de los sedimentos aportados por el río. La acción de la marea modifica las características del transporte de sedimentos y sustancias orgánicas o contaminantes, al igual que cambia las condiciones de la biota que vive en las planicies de la marea, marismas y manglares asociados.

...*dentro del cual el agua salada que ingresa por una o más conexiones libres con el mar abierto*. En un estuario, el aporte de agua salada debe ser continuo, por lo que las conexiones deben estar abiertas permanentemente.

...*es diluida significativamente con agua dulce*. Por un lado, para la existencia de un estuario es importante que exista algún nivel de dilución del agua salada que penetra desde el mar por acción de agua dulce proveniente desde el continente. Por otro, “significativamente”, implica que la dilución debe ser lo suficientemente grande, no solo



para ser detectada, sino para que se produzca una circulación gravitacional o estuarial de las masas de agua. Este proceso debe asegurar la existencia de un gradiente espacial a lo largo del estuario (por ej., de salinidad, nutrientes inorgánicos, etc).

Por último, *especies biológicas eurihalinas*. El término eurihhalino (del griego *eurý* = amplio) se lo emplea para describir a especies que puedan soportar amplios cambios en la salinidad y no tiene relación alguna con rangos de salinidad específicos.

### 2.1.2 Estuario de Bahía Blanca

El estuario de Bahía Blanca se encuentra ubicado en el sudoeste de la provincia de Buenos Aires, Argentina, entre los 38° 45' y 39° 25' de latitud sur y los 61° 45' y 62° 30' de longitud oeste (**Figura 2.1**). Es un estuario de planicie costera donde los canales están separados por extensas planicies de mareas, parches de marismas e islas. La superficie total del sistema es de aproximadamente 2300 km<sup>2</sup>, de los cuales 410 km<sup>2</sup> corresponden a islas, 1150 km<sup>2</sup> al sector intermareal y 740 km<sup>2</sup> a la zona submareal (Piccolo *et al.*, 2008). El área cubierta por agua durante la bajamar es aproximadamente 400 km<sup>2</sup>, mientras que durante la pleamar la superficie cubierta es tres veces superior (~1300 km<sup>2</sup>) (Perillo & Piccolo, 1991).

Desde el punto de vista geomorfológico, el estuario posee una configuración en triángulo irregular más alargado en dirección noroeste-sudeste (NO-SE), con los canales mayores orientados en dicha dirección. Estos canales son los denominados: Principal, Bermejo, Bahía Falsa, Bahía Verde y Brightman (Perillo & Piccolo, 1991; Cuadrado *et al.*, 2007). El Canal Principal de Navegación, con una longitud total de 60 km y un ancho que varía desde 200 m en la cabecera hasta 3-4 km en la boca, se destaca entre los demás. La máxima profundidad del agua se ubica en la boca con 22 m y la mínima llega a menos de 1 m en la cabecera (Piccolo & Perillo, 1990; Piccolo *et al.*, 2008; Cuadrado *et al.*, 2007).

La mayor fuente de energía del estuario de Bahía Blanca es la marea cuasi estacionaria que lo afecta (Perillo *et al.*, 2007). La forma de la onda de marea lo caracteriza como un estuario hipersincrónico, donde la amplitud se incrementa paulatinamente desde la desembocadura a la cabecera (Perillo *et al.*, 2001). El rango de amplitud de marea media varía entre 2 m (próximo a la desembocadura) y 3,3 m (en el puerto de Ingeniero White) (Piccolo & Perillo, 1990), por lo que se lo clasifica como un estuario mesomareal (Perillo, 1995).

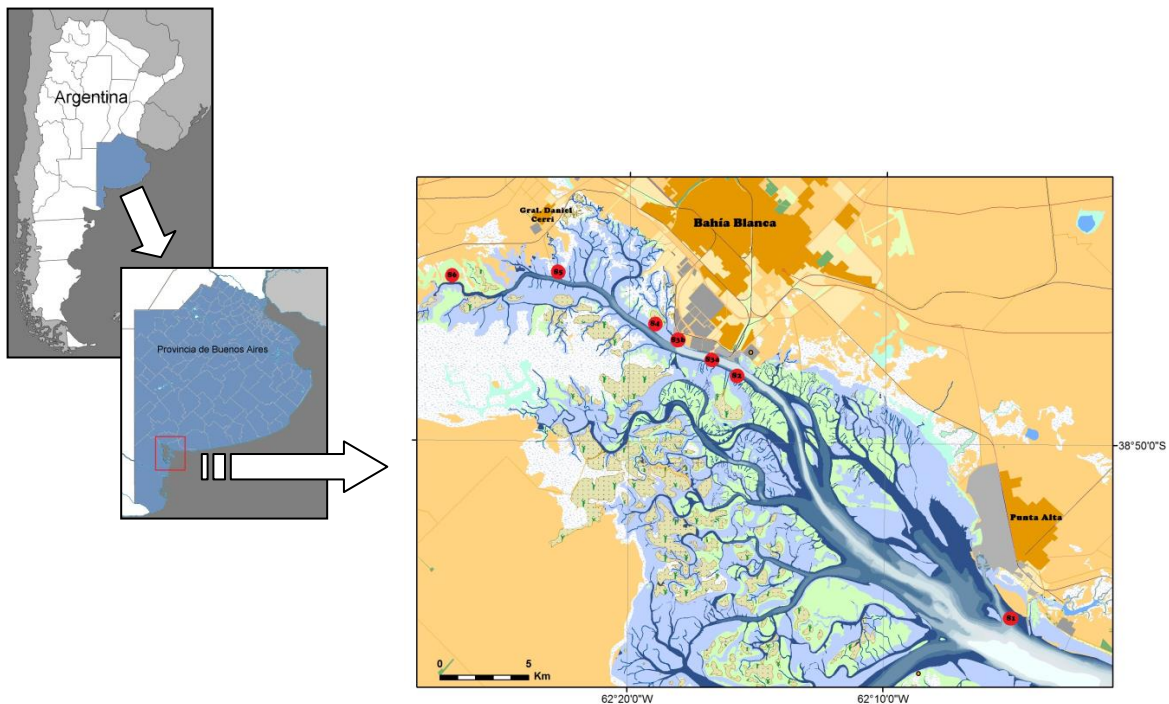
Las características climáticas de la zona corresponden a un clima seco y templado, con valores anuales medios de temperatura comprendidos entre 13 y 21,6° C en verano y 8,5° C en invierno; con vientos predominantes del sector NO y N que soplan en forma aproximadamente paralela al eje del Canal Principal (Piccolo & Perillo, 1990) y, con una velocidad media de 24 km/h y ráfagas que superan los 100 km/h, soplando sobre el estuario el 40% del año (Perillo *et al.*, 2001; 2007). La influencia de los fuertes vientos de la región produce importantes efectos sobre la marea. En general, los vientos que soplan desde el sector NO dan lugar a una depresión del nivel medio del agua, mientras que los provenientes del SE generan el efecto contrario. Sin embargo, los vientos del NO y N son los que producen mayores variaciones (Perillo & Piccolo, 1991; Perillo *et al.*, 2007; Piccolo *et al.*, 2008).

Los sedimentos son limosos en la cabecera del estuario y predominantemente arenosos en la boca del mismo, variando de limo-arcillosos a arcillo-limosos entre ambas zonas. A su vez, el estuario se caracteriza por una elevada turbidez producto de la acción conjunta de las corrientes de marea y los vientos (Perillo *et al.*, 2007). En este sedimento en suspensión prevalece la fracción limo-arcillosa (Gelós *et al.*, 2007). Los valores de turbidez disminuyen desde la cabecera hasta la boca, lo cual puede asociarse a más fuentes de sedimento y menores profundidades en la zona interna del estuario.

El aporte de agua dulce al estuario proviene principalmente de dos tributarios: el Río Sauce Chico, en la cabecera del estuario, con un área de drenaje de 1.600 km<sup>2</sup>; y el Arroyo Napostá Grande, sobre la margen norte y al sur del puerto de Ingeniero White, con un área de drenaje de 920 km<sup>2</sup>. Aunque el caudal anual medio de ambos es bajo (1,9 y 0,8 m<sup>3</sup>/s respectivamente), el Río Sauce Chico puede alcanzar valores picos entre 10 y 50 m<sup>3</sup>/s (Perillo *et al.*, 2001, 2007). Existen además otros arroyos menores como el canal Maldonado, el Arroyo Saladillo de García y el Arroyo Galván, cuyas cuencas son muy pequeñas y sus aportes son generados por la precipitación local (Piccolo & Perillo, 1990; Perillo *et al.*, 2007; Piccolo *et al.*, 2008).

La distribución de la salinidad media presenta un crecimiento exponencial desde la cabecera hasta la parte media del estuario, donde se produce un mínimo local debido a la influencia del Arroyo Napostá Grande, la descarga de aguas cloacales de Bahía Blanca y el agua de los tributarios en la cabecera que avanzan hacia la zona exterior (Piccolo & Perillo, 1990; Perillo *et al.*, 2007). La salinidad en la zona interna es muy variable a lo largo del año; en determinadas condiciones (veranos cálidos y secos), se comporta como “hipersalino” (42) y en otras oportunidades las precipitaciones pueden producir diluciones

tan marcadas como para disminuir su salinidad a menos de la mitad (16) (Freije *et al.*, 1980, 1981). Esta variación de la salinidad es producto de los regímenes estacionales de lluvia, procesos de evaporación, vientos y temperaturas. Asimismo, entre la cabecera y Puerto Cuatrerros la tendencia es de mezcla parcial durante las fuertes descargas del río Sauce Chico, mientras que durante los estiajes es seccionalmente homogéneo (Freije *et al.*, 2008). Por otro lado, entre Puerto Cuatrerros e Ingeniero White se lo puede considerar como un estuario verticalmente homogéneo (Perillo *et al.*, 2007).



**Figura 2.1-** Ubicación del estuario de Bahía Blanca en la República Argentina, Provincia de Buenos Aires (izquierda) y mapa de la zona interna del estuario mostrando la localización de los sitios de muestreo. (Mapa gentileza del Dr. Walter Melo, IADO)

La temperatura superficial del agua es relativamente constante a lo largo del estuario, con oscilaciones marcadas en la zona interna, en donde sus aguas están menos expuestas al efecto regulador del mar adyacente (Piccolo & Perillo, 1990) y está fuertemente condicionada por la temperatura ambiente (Freije *et al.*, 1981). El rango de variación anual de este parámetro en la zona interna del estuario es de 4,1 °C a 26,4 °C (Freije *et al.*, 2008). Los valores de pH presentan un patrón de distribución anual homogéneo y con un valor promedio de 8,2 (Botté, 2005).

El estuario de Bahía Blanca es considerado uno de los sistemas costeros más naturalmente eutróficos en función a sus concentraciones de nutrientes inorgánicos, que son sostenidamente altas durante la mayor parte del año (Freije *et al.*, 2008); sin embargo, esas concentraciones tienden a disminuir desde la zona interna hacia la boca del estuario (Popovich & Marcovecchio, 2008). El contenido de materia orgánica en las aguas del estuario presenta altas concentraciones, que han sido asociadas en mayor medida a la producción primaria *in situ*, aunque otras fuentes como efluentes, ríos y arroyos también pueden contribuir con altos porcentajes de materia orgánica (Freije *et al.*, 2008; Marcovecchio *et al.*, 2008). El fitoplancton está caracterizado por pequeñas diatomeas que muestran un patrón anual repetitivo, con una floración en invierno dominada por *Thalassiosira curviseriata* y otra en verano dominada por *Thalassiosira minima* (Gayoso, 1998, 1999; Guinder *et al.*, 2012; López Abbate, 2014).

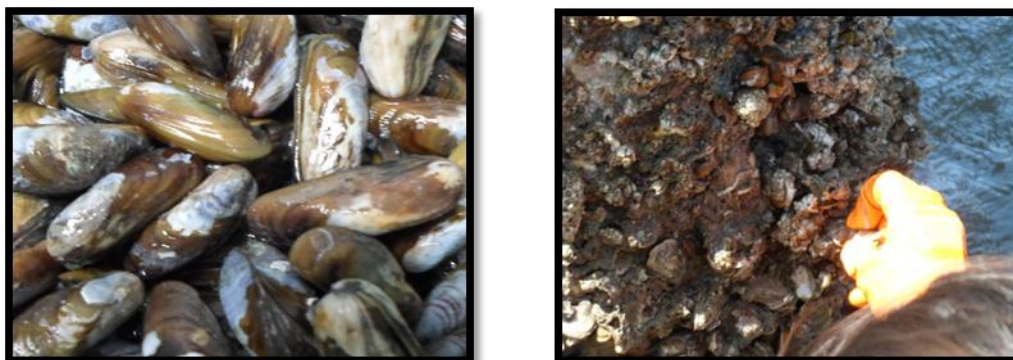
La zona interna del estuario es un ambiente con gran influencia antrópica. Sobre la costa norte se ubican grandes asentamientos urbanos como Bahía Blanca, Punta Alta y General Cerri; y varios puertos como Cuatros, Ingeniero White, Galván, Rosales y Puerto Belgrano (Base Naval). Este sistema portuario ofrece una salida directa al Océano Atlántico, razón por la cual es intensamente navegado por embarcaciones pesqueras, buques regasificadores, buques de carga y de transporte de combustibles y cereales, lo cual requiere que el Canal Principal de Navegación sea sometido a dragados periódicos. Esto incide en la resuspensión, transporte y redistribución de sedimentos, lo que contribuye notablemente al transporte de contaminantes. Entre los puertos de Ingeniero White y Galván se encuentra uno de los polos industriales más importantes de Argentina. Comprende refinerías, industrias petroquímicas, fábricas de plásticos y producción de fertilizantes. También coexisten industrias como plantas textiles, curtiembres, silos y molinos cerealeros, frigoríficos e industrias relacionadas. Además, se ubica la planta productora de amoníaco y urea granulada más grande de Sudamérica, con una producción de 1.200.000 ton/año. Todas ellas descargan sus efluentes en el estuario, por lo cual se ha estimado que ingresan alrededor de 100 m<sup>3</sup>/día de efluentes sin ningún tipo de tratamiento (Piccolo & Perillo, 1990; Perillo *et al.*, 2001).

### 2.1.3 Especie propuesta como organismo centinela

La monitorización biológica es una técnica ampliamente utilizada, que emplea la capacidad que tienen algunos organismos denominados-“centinelas” o “bioindicadores”-

de acumular, bioconcentrar y, eventualmente, de biomagnificar los contaminantes presentes en el medio (Oliva, 2015).

El mejillín *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846) es un molusco bivalvo perteneciente a la familia *Mytilidae* (**Figura 2.2**). Es la especie dominante sobre los sustratos intermareales duros de la costa bonaerense (Adami *et al.*, 2004), cumpliendo con las características más importantes que permiten su uso como organismos centinela (Farrington *et al.*, 1983; Marcovecchio *et al.*, 2014).



**Figura 2.2-** Imágenes de bancos del mejillín *Brachidontes rodriguezii*.

Son organismos con un estilo de vida sésil que se encuentran ampliamente distribuidos en la zona de estudio, lo cual facilita su muestreo y obtención (O'Connor, 2002). A esto se suman sus hábitos de alimentación por filtración y capacidad de acumular y tolerar altas concentraciones de diferentes contaminantes (Livingstone, 1991; Magi *et al.*, 2008; Tanabe *et al.*, 2000). Son organismos con importancia comercial y económica, por lo que la medición de la concentración de compuestos potencialmente tóxicos en sus tejidos es de interés para la salud pública.

A nivel mundial, los moluscos bivalvos han sido ampliamente utilizados como especies centinelas en el monitoreo de contaminación orgánica en zonas costeras. Particularmente, el estudio de OTC se realizó en numerosas especies de mejillones como *Mytilus trossulus*, *Mytilus edulis*, *Mytilus galloprovincialis*, *Dreissena polymorpha*, entre otras (Jacobsen & Asmund, 2000; Regoli *et al.*, 2001; Albalat *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2002; Namiesnik *et al.*, 2008; Lehtonen *et al.*, 2016). No se han encontrado estudios de contaminación organoestánnica en *Brachidontes rodriguezii*, sin embargo es considerado por diversos autores como una especie sensible a la contaminación orgánica y se han

reportados ciertos estudios sobre el comportamiento de este bivalvo (López Gappa *et al.*, 1993; Hindell & Quinn, 2000; Vallarino *et al.*, 2002).

Por lo expuesto, se ha considerado que los mejillines *Brachidontes rodriguezii* son una especie adecuada para realizar estudios de monitoreo e impacto de los OTC en el estuario de Bahía Blanca, área de estudio propuesta para este trabajo de Tesis.

## 2.2 Sitios de muestreo seleccionados

Como se observa en la **Figura 2.1**, se eligieron para este estudio siete sitios de muestreo a lo largo del estuario de Bahía Blanca, con diferente impacto antropogénico, incluyendo zonas de intenso tráfico marino, zonas de pesca y otras de menor impacto (**Tabla 2.1**).

**Tabla 2.1-** Ubicación de los sitios de muestreo en el estuario de Bahía Blanca.

Sitios	Latitud (S) <sup>a</sup>	Longitud (W) <sup>a</sup>	Clasificación
1	38°55'43.69"	62° 4'14.50"	Puerto
2	38°47'54.50"	62°15'23.07"	Central Termoeléctrica
3a	38°46'46.43"	62°18'28.73"	Puerto
3b	38°47'44.20"	62°16'17.10"	Puerto/ Industria
4	38°46'58.82"	62°18'29.99"	Puerto/ Industria
5	38°45'0.78"	62°23'21.95"	Puerto de recreación y pesca
6	38°45'54.20"	62°25'35.50"	Zona rural

<sup>a</sup> Las coordenadas fueron determinadas mediante el uso de un sistema de posicionamiento global (GPS)

El sitio de muestreo S1 se ubica en Puerto Rosales, zona media del estuario de Bahía Blanca. En este sitio existe una terminal de transferencia de petróleo crudo y un muelle principal. De hecho, aproximadamente el 70% del crudo total que se consume en el país pasa por la planta de almacenamiento de Puerto Rosales. Además, se encuentra en cercanías de Puerto Belgrano, el puerto militar más importante de la Argentina, en cuyas instalaciones se incluye el mayor dique seco del país, donde se reparan, limpian y pintan los cascos de numerosos barcos comerciales y militares. El resto de los sitios estudiados se encuentran en la zona interna del estuario de Bahía Blanca. Los sitios S2 y S3a, se ubican dentro del Puerto de Ingeniero White, una zona marítima de grandes terminales comerciales y de cargas generales. El sitio S2 se encuentra en la proximidad de la central termoeléctrica "Luis Piedra Buena", la cual suministra energía eléctrica a la

zona mediante gas natural o fuel oil. El sitio de muestreo S3a se caracteriza por la presencia de numerosos barcos y lanchas pesqueras. Los sitios S3b y S4 se encuentran dentro de Puerto Galván, un núcleo muy industrializado del estuario. El sitio S3b está situado en un muelle abandonado y S4 se encuentra en la proximidad de la llamada “Posta de inflamables”, donde grandes buques cargan combustible, derivados de petróleo y gases. El sitio de muestreo S5 se ubica en Puerto Cuatros, caracterizado por un pequeño muelle de pesca y de recreación. Por último, el sitio de muestreo S6, Villarino Viejo, se encuentra en el sitio más interno del estuario, en las proximidades de las tierras rurales (**Figura 2.3**).

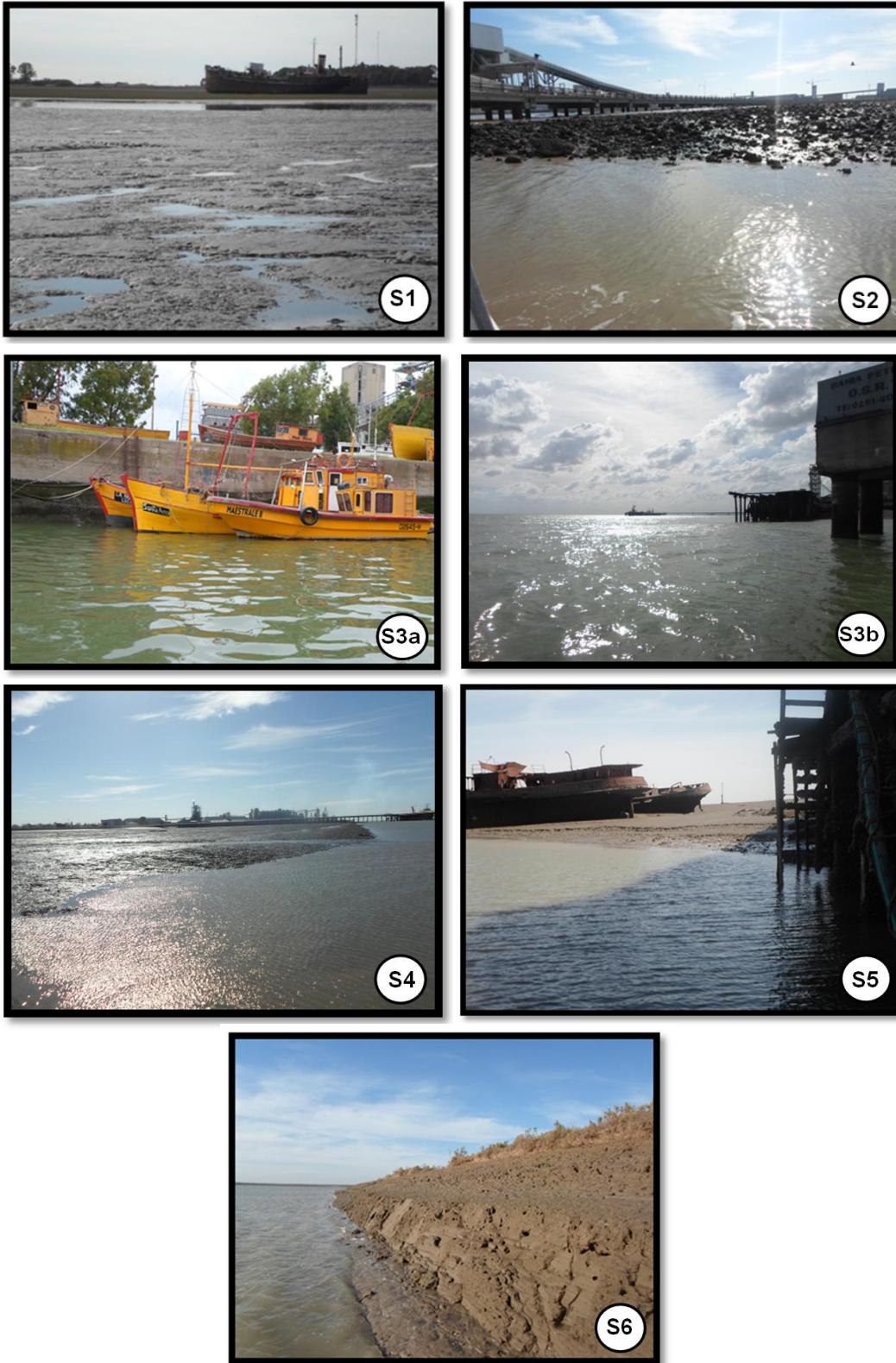


Figura 2.3- Fotografías de los sitios de muestreo en el estuario de Bahía Blanca.



### 2.2.1 Obtención de muestras

Se llevaron a cabo un total de 8 campañas estacionales de muestreo a bordo de la lancha oceanográfica “IADO IV”, entre Febrero de 2013 y Noviembre de 2014. Los muestreos se realizaron en marea baja. En todos los casos se realizaron mediciones *in situ* de parámetros fisicoquímicos. En la **Tabla 2.2** se muestran las fechas de cada campaña y el tipo de muestras recolectadas en cada sitio de muestreo.

**Tabla 2.2-** Fechas de las campañas realizadas en los sitios descritos del estuario de Bahía Blanca.

Campaña Nº	Fecha y estación del año	Sitios muestreados	Tipos de muestras recolectadas
1	Febrero de 2013 (Verano)		
2	Mayo de 2013 (Otoño)	S1, S2, S3a, S4, S5, S6	Sedimentos superficiales y Mejillines <i>Brachidontes rodriguezii</i>
3	Agosto de 2013 (Invierno)		
4	Octubre de 2013 (Primavera)		
5	Marzo de 2014 (Verano)		
6	Mayo de 2014 (Otoño)	S1, S2, S3b, S4, S5, S6	Sedimentos superficiales, Mejillines <i>Brachidontes rodriguezii</i> , Agua de mar superficial y Material particulado en suspensión (MPS)
7	Agosto de 2014 (Invierno)		
8	Noviembre de 2014 (Primavera)		

Todo el material utilizado se acondicionó adecuadamente, tanto para la toma como para el procesamiento de las muestras. Primero se lavó con detergente no iónico, se enjuagó con agua de red y luego se realizaron, al menos, tres enjuagues con agua destilada. Seguidamente, se sumergió en ácido nítrico al 5% (v/v) durante 24 h. Finalmente, el material se enjuagó nuevamente con agua destilada y se llevó a sequedad, según lo indicado por protocolos internacionales para evitar la contaminación de la muestra (Michel & Averty, 1999; Bancon-Montigny *et al.*, 2000). En el caso del material utilizado para la determinación de materia orgánica particulada (MOP), el lavado se realizó con solución sulfocrómica en lugar de ácido nítrico (también durante 24 horas).

- **Sedimentos**

En cada sitio de muestreo se obtuvieron de 4 a 6 porciones de la capa superficial (1-5 cm) utilizando para ello un muestreador de agarre de acero inoxidable. Las mismas se reunieron para su homogeneización en recipientes de vidrio color ámbar, para evitar la exposición a la luz, generándose de esta forma una muestra compuesta. Esta estrategia de muestreo es útil para proveer información sobre las características promedio de los sedimentos de un área determinada (Ure, 1996; Kennedy *et al.*, 1997; Tack & Verloo, 2001). Las muestras compuestas se refrigeraron a bordo y luego se transportaron rápidamente al laboratorio, donde se conservaron a  $-18^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

Antes de realizar el análisis, los sedimentos se liofilizaron por 48 h y luego, se homogeneizaron utilizando morteros de porcelana. Posteriormente, se pasaron a través de un tamiz de  $63\ \mu\text{m}$  de luz de malla (Nº 250), ya que la determinación del contenido de organoestánicos de interés se lleva a cabo sobre la fracción de tamaño inferior a  $63\ \mu\text{m}$ , que incluye limos ( $2-63\ \mu\text{m}$ ) y arcillas ( $<2\ \mu\text{m}$ ). Este procedimiento permite, al mismo tiempo, alcanzar la homogeneización del material a estudiar (Salomons & Förstner, 1984). La fracción seleccionada fue almacenada en recipientes de vidrio color ámbar a  $4^{\circ}\text{C}$ .

- **Mejillines**

Alrededor de 75 ejemplares de mejillines (*Brachidontes rodriguezii*) se recolectaron manualmente de sus bancos naturales, muelles, plataformas o sedimentos superficiales, de acuerdo a su disponibilidad. En cada lugar en particular se intentó recoger muestras de tamaños similares. En general, la longitud de los mejillines varió entre 28 y 44 mm. Los mejillines recolectados se colocaron en bolsas adecuadas limpias y, al igual que en el caso de los sedimentos, se refrigeraron a bordo y se transportaron al laboratorio, donde se conservaron a  $-18^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento.

En el laboratorio, los mejillines fueron lavados con agua destilada para eliminar restos de partículas y sedimento. Posteriormente se procedió a armar tres muestras compuestas de aproximadamente 25 individuos cada uno. Los tejidos blandos se homogeneizaron utilizando una licuadora de mano (*mixer*) y se liofilizaron durante 48 h. Finalmente se almacenaron a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

- **Agua de mar y MPS**

Las muestras de agua (4L) se recolectaron en botellas de vidrio color ámbar, previamente lavadas y acondicionadas, y se transportaron hasta el laboratorio al resguardo de la luz, refrigeradas en heladera portátil para su procesamiento.

Una vez en el laboratorio, se procedió a la inmediata filtración de las muestras de agua para evitar pérdidas por adsorción sobre el recipiente, por degradación biológica o por acción de la degradación UV. Durante la filtración, las muestras se mantuvieron a bajas temperaturas (4°C) y en oscuridad. El proceso de filtración, al mismo tiempo permitió obtener el material particulado en suspensión (MPS).

Las muestras de agua fueron filtradas a través de una membrana de polycarbonato (Millipore HTTP 04700) de 0,4 µm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro por medio de un equipo de filtración Millipore® de vidrio Pyrex®, utilizando una bomba eléctrica de vacío. Previo a su uso, las membranas fueron sumergidas durante 48 h en ácido nítrico al 0,7%, luego enjuagadas varias veces con agua destilada, secadas a 50 °C hasta pesada constante en balanza analítica. Los filtros con el material retenido fueron congelados (-18°C) y posteriormente liofilizados, pesados en balanza analítica y almacenados a 4°C hasta el momento de su análisis.

Por otro lado, se recogió el volumen filtrado de cada muestra de agua, y para conservarla se acidificó hasta pH=2 con ácido clorhídrico concentrado. Luego se almacenó en botellas de vidrio color ámbar, previamente acondicionadas, en oscuridad a 4°C hasta su posterior análisis.

### 2.2.2 Determinación *in situ* de parámetros fisicoquímicos en el medio acuático

En cada campaña y en cada sitio de muestreo, se midieron *in situ* algunos parámetros fisicoquímicos en la columna de agua: temperatura, pH, turbidez y conductividad, utilizando una sonda multisensor HORIBA U-10. La salinidad se calculó a partir de la conductividad.

## 2.3 Estándares y Reactivos

Los estándares empleados fueron adquiridos en Sigma-Aldrich: Tricloruro de monobutilestaño (MBT, 97%), Dicloruro de dibutilestaño (DBT, 97%), Cloruro de tributilestaño (TBT, 96%) y Tetrabutilestaño (TeBT, 93%), usado como estándar interno. El Cloruro de tripropilestaño (TPrT, > 99%), usado como estándar de control de recuperación, fue adquirido en LGC Promochem. Todas las soluciones estándar se prepararon en metanol grado cromatográfico U.V.E. (Merck) para obtener soluciones que contengan una concentración de Sn equivalente a 1 mg mL<sup>-1</sup>. Las soluciones individuales

de trabajo se prepararon luego por diluciones apropiadas en metanol. Todas las soluciones estándar se almacenaron en frascos y viales de color ámbar a 0 °C en la oscuridad (UNEP/IOC/IAEA, 1994).

El reactivo derivatizante, borohidruro de sodio ( $\text{NaBH}_4$  > 96%), se adquirió en Fluka Chemika y la solución metanólica de hidróxido de sodio se preparó disolviendo 1,0 g de NaOH (98%) en 1 L de metanol de grado cromatográfico U.V.E. para obtener una solución al 0,1% (UNEP/IOC/IAEA, 1994). Las extracciones se realizaron utilizando hexano de grado cromatográfico U.V.E (Merck). Se utilizó agua deionizada ultra pura ( $18,3 \Omega \text{ cm}^{-1}$ , Barnstead, Dubuque, USA).

Los reactivos de calidad analítica empleados fueron: ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) y ácido clorhídrico (HCl). Se utilizó un estándar de glucosa monohidrato (99%), Cicarelli. Se utilizó peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30% (v/v).

Además, se empleó un material de referencia certificado (CRM) PACS-2, provisto por el programa de materiales estándares de referencia del National Research Council of Canada (NRC - CNRC), que es un sedimento marino del puerto de Esquimalt, Canadá. Este material de referencia internacional abarca el ámbito de concentración de los compuestos orgánicos de interés (MBT, DBT y TBT) presentes en los sedimentos naturales empleados en este trabajo.

## **2.4 Metodologías**

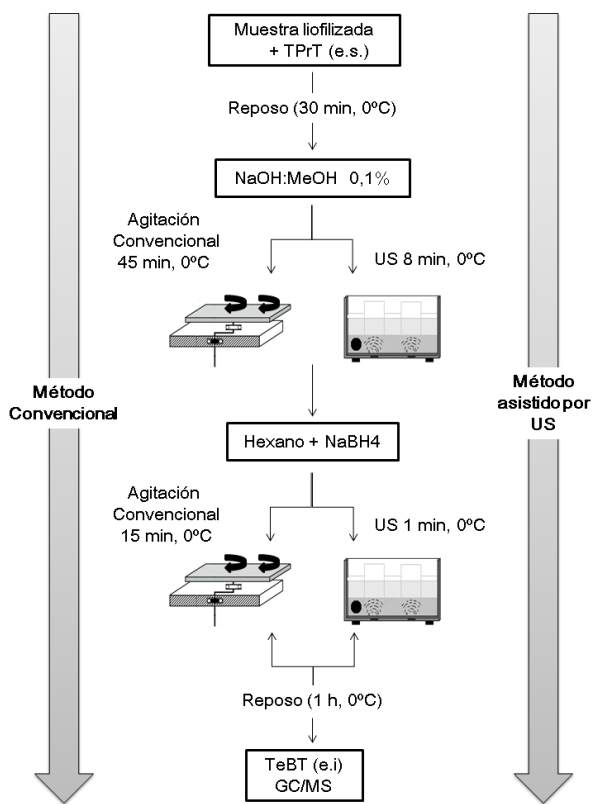
### **2.4.1 Sedimento superficial**

#### **2.4.1.1 Extracción y preconcentración de los compuestos organoestánicos**

##### **2.4.1.1.1 Método convencional y modificaciones**

El pretratamiento se llevó a cabo utilizando la metodología aplicada por UNEP/IOC/IAEA (1994) y Delucchi (2007) con algunas modificaciones. Se pesaron 2,000 g de muestra de sedimento liofilizado, al que se le añadieron 2,0 mL de agua deionizada ultra pura y 100  $\mu\text{L}$  TPrT en un tubo de centrifuga de polipropileno de 50 mL. Luego, se dejó en reposo durante 30 minutos a 0 °C. A continuación, se añadieron aproximadamente 8 mL de solución metanólica de hidróxido de sodio 0,1% para obtener una relación metanol: agua (v/v) 4:1. El tubo se tapó y se agitó (en un agitador orbital) durante 45 min utilizando un baño de hielo. A continuación, se añadieron 5 mL de hexano

y aproximadamente 100 mg de  $\text{NaBH}_4$ . El tubo se agitó, ligeramente abierto para liberar la presión producida por la formación de hidrógeno, durante 15 minutos en un agitador orbital con un baño de hielo. Luego, se tapó y se dejó en reposo durante una hora a  $0^\circ\text{C}$ . A continuación, se agregó sulfato de sodio anhidro para eliminar restos de agua y finalmente se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$  para evitar pérdidas por evaporación. Finalmente, la capa de hexano conteniendo los compuestos derivatizados se colocó en un vial de vidrio color ámbar y el volumen se redujo a 1 mL mediante una corriente suave de nitrógeno puro. Por último, se añadieron  $7\ \mu\text{L}$  de una solución estándar de TeBT (patrón interno) y de inmediato se inyectó en el cromatógrafo de gases. La **Figura 2.4** (parte izquierda) muestra el procedimiento de manera esquemática.



**Figura 2.4-** Representación esquemática del método convencional con las modificaciones aplicadas y el método asistido por US.

- **Modificaciones realizadas**

Se realizaron algunas modificaciones con respecto al método convencional. En primer lugar, se aplicaron bajas temperaturas (0 °C), tanto en el paso de extracción como en el de derivatización. Este cambio hizo posible la cuantificación de MBT, ya que al trabajar a temperatura ambiente, como lo propone el método UNEP/IOC/IAEA, se pierde por volatilización. Trabajar a bajas temperaturas también permitió controlar el paso de derivatización, evitando pérdidas de compuestos volátiles, logrando así mejorar la exactitud de los resultados.

La segunda modificación fue la masa de sedimentos utilizado en la etapa de extracción. Cuando se usaron 4,000 g de sedimentos (según lo recomendado por el método UNEP/IOC/IAEA) se generaron grandes cantidades de espuma durante las etapas de extracción y derivatización (probablemente debido al alto contenido de materia orgánica en los sedimentos analizados), con el consiguiente riesgo de pérdida de analito. Por lo tanto, se decidió utilizar 2,000 g de sedimentos.

La tercera modificación fue con respecto al volumen del extractante. Se utilizaron 5 mL de hexano, en lugar de 2 mL (UNEP/IOC/IAEA), debido a que la capa orgánica se lograba visualizar más fácilmente utilizando mayor volumen de extractante.

#### **2.4.1.1.2 Método asistido por ultrasonido**

Los compuestos orgánicos de estaño fueron extraídos siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, en la sección 2.4.1.1.1, pero reemplazando los tiempos de extracción (45 min) y derivatización (15 min) por 8 min y 1 min de sonicación, respectivamente (**Figura 2.4, parte derecha**). Para ello se utilizó un baño ultrasónico TESTLAB (modelo TB 04 CTPD, con una potencia de ultrasonido de 160 W y una frecuencia de 40 KHz).

Los tiempos de aplicación de US se optimizaron con el fin de maximizar el porcentaje de recuperación (variable respuesta). La optimización se llevó a cabo usando un diseño factorial  $2^2$  con cuatro puntos centrales para estimar el error experimental y la precisión del sistema (Safa & Hadjmohammadi, 2005; Domini *et al.*, 2009). Cada punto del diseño experimental se realizó de forma aleatoria y por duplicado. Los factores seleccionados fueron el tiempo de extracción (A) y el tiempo de derivatización (B). La **Tabla 2.3** muestra la matriz del diseño con los factores y el dominio experimental correspondiente. Los niveles bajos (-1), central (0), y altos (+1) de las variables se

muestran para cada experimento. El diseño estadístico y el análisis de las variables de respuesta fueron realizados con un software de gráficos estadísticos (STATGRAPHICS Plus, version 5.1 STSC, Rockville, MD, USA).

**Tabla 2.3-** Niveles de factores y matriz de diseño factorial  $2^2$  desarrollados para la optimización del método asistido por ultrasonido.

Factor	Representación	Niveles			Experimento Nº				
		Bajo (-)	Alto (+)	Central(0)	1	2	3	4	5
Tiempo de extracción (min)	A	4	8	6	-	+	-	+	0
Tiempo de derivatización (min)	B	1	3	2	+	-	-	+	0

#### 2.4.1.2 Determinación de los compuestos organoestánicos por GC-MS

La separación y cuantificación de los compuestos orgánicos de estaño estudiados, TBT, DBT y MBT, se llevó a cabo utilizando un cromatógrafo de gases con columna capilar (Agilent 7890 B) acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent 5977A). La columna cromatográfica utilizada fue de sílice fundida (HP-5MS, 30 m; 0,25 mm d.i.; 0,25  $\mu\text{m}$  espesor de capa).

Un microlitro de la muestra -o estándares, o blanco- se inyectó en el modo splitless a 220 °C. Se utilizó helio como gas portador a un caudal constante de 1 mL/min. El programa de temperatura fue de 55 °C durante 1 min, luego 20 °C/min a 200 °C, que se mantuvo durante 5 minutos. El espectrómetro de masas fue operado en el modo EIM (del inglés: *electron impact mode*, 70 eV). Los hidruros orgánicos de estaño fueron monitoreados a partir del espectrómetro de masas en modo de iones seleccionados (SIM, del inglés: *selected ion monitoring mode*). Los iones utilizados durante los análisis para identificación y cuantificación de los compuestos de interés se presentan en la **Tabla 2.4**. Cada analito fue confirmado mediante su tiempo de retención y la abundancia de sus iones de cuantificación en relación a los obtenidos por estándares certificados de cada compuesto organoestánico estudiado.

**Tabla 2.4-** Iones característicos (m/z) y tiempos de retención de los compuestos de interés.

Analito	Iones (m/z)	Tiempo de retención (min)
MBTH	119-121-177-179	2,15
DBTH	121-177-179	5,17
TPrTH	119-121-163-165-205-207	5,65
TBTH	119-121-177-179-233-235	7,52
TeBT	119-121-177-179-233-235-289-291	9,23

### 2.4.1.3 Determinaciones complementarias

- **Determinación de humedad, materia orgánica total y carbono orgánico total**

Se tomaron alícuotas de sedimento (10 a 20 g) de cada sitio, se pesaron y luego se secaron a 105 °C en estufa, durante 24 horas o hasta peso constante. La diferencia de peso antes y después del tratamiento térmico permitió determinar el contenido de humedad de las muestras. Luego, los sedimentos fueron llevados a 500 °C en mufla durante 3 horas de manera de lograr la ignición total de la materia orgánica. Se asume que la pérdida de peso alcanzada mediante este calentamiento estima el contenido de materia orgánica total (OM) de la muestra (Commendatore & Esteves, 2004). Posteriormente, el carbono orgánico total (TOC) fue estimado a partir de la siguiente ecuación:  $OM (\%) = 1,9 \times TOC (\%)$  (Pribyl, 2010).

- **Determinación granulométrica**

Para determinar las fracciones granulométricas de los sedimentos superficiales de cada sitio de muestreo, se separaron del material original húmedo pequeñas fracciones que fueron analizadas a través de difracción láser, utilizando un analizador de tamaño de partículas Malvern Masterziser 2000. Antes de realizar el análisis, las muestras se trataron con peróxido de hidrógeno para eliminar el contenido de material orgánico. Los datos fueron analizados utilizando el software Mastersizer 2000 5.40 (Malvern Instrument Ltd., 2007).

## 2.4.2 Mejillines *Brachidontes rodriguezii*

### 2.4.2.1 Extracción y preconcentración de los compuestos organoestánicos

Los OTC fueron extraídos de las muestras de mejillines aplicando los dos procedimientos mencionados anteriormente para las muestras de sedimento, el método



convencional y el método asistido por ultrasonido. Se utilizaron 10 mL de solución metanólica de hidróxido de sodio 0,1% (UNEP/IOC/IAEA, 1994). Fue necesario realizar un “*clean-up*” o limpieza de los extractos, previa a la inyección en el cromatógrafo de gases, con el objetivo de eliminar los compuestos polares incluidos en la matriz y presentes como interferentes en el análisis, a fin de lograr cromatogramas claros y bien definidos. La separación y cuantificación de los analitos se realizó mediante GC-MS.

- **Limpieza de extractos**

La limpieza de los extractos se realizó mediante columnas de vidrio de 1 cm de diámetro interno, rellenas con 1 g de sílica gel como fase estacionaria. Luego de la siembra de los extractos en las columnas, los OTC fueron eluidos con 4 mL de hexano y se recogieron en un vial de vidrio color ámbar, donde fueron concentrados bajo una corriente de nitrógeno puro. A lo largo del *clean-up* se mantuvo la temperatura a 0 °C.

#### 2.4.2.2 Caracterización biológica de los organismos

- **Determinación de longitud, peso y humedad**

En primer lugar, mediante el empleo de un calibre electrónico se determinó la longitud de cada valva y luego las mismas fueron removidas y separadas de los tejidos blandos. Cada uno de estos tejidos fue pesado en balanza analítica y posteriormente liofilizado. La diferencia de peso obtenida entre el tejido liofilizado y el húmedo permitió calcular el % de humedad de cada individuo.

- **Índice de condición**

Para determinar el índice de condición (IC) las valvas se secaron en estufa a 60°C hasta peso constante. El IC se calculó mediante la siguiente ecuación (Freeman, 1974; Crosby & Gale, 1990; Orban *et al.*, 2002):

$$\text{IC (\%)} = (\text{peso de tejido seco} / \text{peso seco de las valvas}) \times 100$$

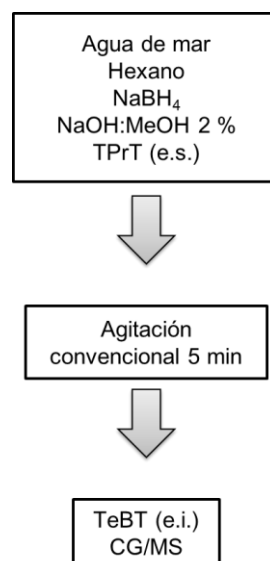
#### 2.4.3 Agua de mar superficial

##### 2.4.3.1 Extracción y preconcentración de los compuestos organoestánicos

El método de referencia UNEP/IOC/IAEA (1994) propone realizar una única extracción líquido-líquido utilizando diclorometano como disolvente. En esta Tesis se optó

por llevar a cabo la extracción empleando hexano para recolectar los hidruros formados (Tolosa *et al.*, 1996; Ikononou *et al.*, 2002; Furdek *et al.*, 2012; Okoro *et al.*, 20016). El uso de este disolvente es adecuado debido a que la polaridad del hexano es suficiente para extraer los hidruros de los compuestos de interés, no muestra interferencias con los OTC y permite una rápida separación de las fases (Yañez *et al.*, 2016).

La **Figura 2.5** muestra el procedimiento de manera esquemática. En primer lugar, se colocaron 500,00 mL de muestra en una ampolla de decantación, luego se introdujeron 100  $\mu$ L de TPrT utilizado como estándar de control de recuperación, 1 mL de una solución metanólica de NaOH al 2%, 25 mL de hexano y, por último, se añadieron aproximadamente 100 mg de NaBH<sub>4</sub>. A continuación, se tapó y se dejó en reposo unos minutos hasta que cesó la formación de burbujas y se llevó a cabo la agitación durante 5 min a 0 °C empleando un agitador orbital. Luego, se liberó la presión originada y se dejó en reposo para permitir la separación de las fases. Por último, a la capa de hexano conteniendo los compuestos derivatizados, se le agregó sulfato de sodio anhidro para eliminar restos acuosos y se transfirió a un vial de vidrio color ámbar. Seguidamente, se procedió a la reducción del volumen a 1 mL aplicando una corriente suave de nitrógeno puro. Finalmente, se añadieron 7  $\mu$ L de una solución estándar de TeBT (patrón interno) y de inmediato se inyectó en el cromatógrafo de gases.



**Figura 2.5-** Representación esquemática del método aplicado para la determinación de compuestos organoestánicos de interés en agua de mar.

La separación y cuantificación de los analitos se realizó mediante cromatografía gaseosa acoplada a un espectrómetro de masas, al igual que los sedimentos, y se encuentra explicado en la sección de dicha muestra.

#### **2.4.3.2 Determinación de la materia orgánica particulada**

Para la determinación de materia orgánica particulada (MOP) se procedió al filtrado inmediato de las muestras utilizando filtros de fibra de vidrio de 0,7  $\mu\text{m}$  de poro y 47 mm de diámetro (Whatman, GF/F) previamente muflados. Posteriormente, el filtro con el material retenido fueron colocados en sobres de aluminio (muflados) y almacenados a 4  $^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis. El contenido de MOP se determinó siguiendo el método descrito por Strickland & Parsons (1968), basado en la oxidación húmeda de la materia orgánica mediante dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) en medio ácido ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). El método se basa en medir la disminución en la absorbancia del  $\text{Cr}_2\text{O}_7^-$ , a  $\lambda = 440 \text{ nm}$ , después de ser reducido a  $\text{Cr}^{3+}$  por la materia orgánica presente. Como estándar de calibración se utilizó una solución de glucosa. Las lecturas de absorbancia se realizaron utilizando un espectrofotómetro UV-visible, Beckman DU-2, usando celdas de 1 cm de paso óptico.

#### **2.4.4 Material Particulado en suspensión (MPS)**

Los analitos de interés fueron extraídos de las muestras de MPS liofilizadas aplicando el procedimiento asistido por US mencionado en la sección 2.4.1.1.2. Se trabajó con el MPS recogido en cada sitio de muestreo (aproximadamente 1 g) correspondiente a un volumen de agua de mar filtrada entre 700 y 1000 mL. Al igual que las restantes matrices evaluadas, la separación y cuantificación de los analitos se realizó mediante GC-MS.

### **2.5 Análisis estadístico aplicado**

La distribución normal de cada grupo se puso a prueba con el test de Shapiro-Wilk modificado ( $p > 0,05$ ). Con el fin de evaluar las relaciones entre las concentraciones de los compuestos organoestánicos encontradas en cada una de las muestras estudiadas, y los distintos parámetros evaluados asociados a las mismas, se realizaron análisis de correlación, en los que una probabilidad  $p < 0,05$  fue considerada significativa.

Además, se llevó a cabo la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar la similitud entre distintos conjuntos de datos. Todos estos análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando la versión de software INFOSTAT 2008.

Para hacer posible una mejor visualización e interpretación de la información subyacente en el conjunto de datos se realizó el análisis de componentes principales desplegado (*unfolded principal component analysis*, U-PCA) y el mismo se llevó a cabo utilizando Matlab 7.0 (The MathWorks).

El Análisis de Componentes Principales (PCA) es una herramienta muy utilizada en el análisis de datos multivariados debido a que es un método simple y no paramétrico que extrae información relevante de datos complejos (Shlens, 2009). PCA es un procedimiento matemático que facilita la interpretación de los datos a partir de la transformación de las variables originales, posiblemente correlacionadas, en nuevas variables no correlacionadas. Estas nuevas variables son las llamadas Componentes Principales y son combinaciones lineales de las variables anteriores. El número de componentes principales es igual o menor al número de variables originales. El primer componente tendrá la mayor variancia posible, y cada componente siguiente tendrá la mayor variancia posible con la restricción de que debe ser ortogonal (es decir, no correlacionado) respecto de los componentes precedentes.

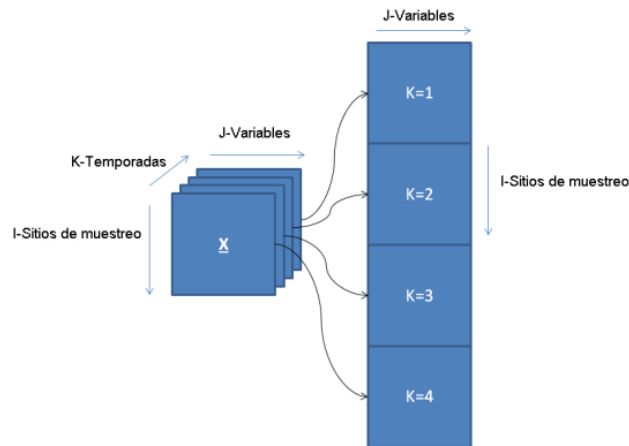
El U-PCA, es una extensión del PCA, y fue desarrollado para manejar un conjuntos de datos multidimensionales (Villez *et al.*, 2009).

Cuando se dispone de una estructura interna de datos multidimensionales, para llevar a cabo un análisis PCA es necesario desplegar la estructura hasta conseguir una matriz (estructura de 2 dimensiones). El desplegado es simplemente una manera de reagrupar una estructura de datos multidimensionales en una matriz. La manera en que la estructura se despliega se muestra en la **Figura 2.6**.

La estructura de los datos recogidos constituye un cubo  $X$  de 3 dimensiones, incluyendo los sitios de muestreo "I", las variables "J" y las temporadas (estaciones del año) "K". El cubo  $\underline{X}$  ( $I \times J \times K$ ) se despliega de manera que se obtiene una matriz de dimensiones ( $I \times K \times J$ ), obligando al modelo a recorrer el total de dimensiones I y K. El modelo equivale matricialmente a la expresión:

$$\mathbf{X}^{(I \times K \times J)} = \mathbf{A}^{(I \times K \times D)} \mathbf{H}^{(D \times J)} + \mathbf{R}^{(I \times K \times J)}$$

que constituye un modelo PCA para una matriz  $\mathbf{X}$  de dimensiones  $(IK \times J)$ . La matriz  $\mathbf{A}$  es conocida como la matriz de *scores*  $y$ , representa la manera en la que se puede comprimir la información correspondiente a las muestras. La matriz  $\mathbf{H}$  se la denomina matriz de *loadings*,  $y$ , representa la manera en la que se puede comprimir la información correspondiente a las variables involucradas. La matriz  $\mathbf{R}$  es denominada matriz de residuales y  $D$  es el número de componentes principales que se obtienen.

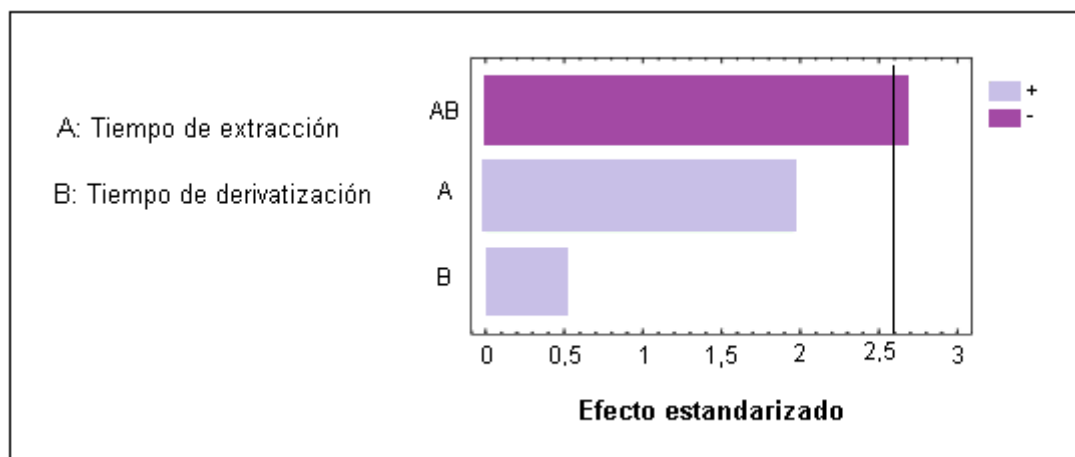


**Figura 2.6-** Despliegue por columna de un cubo de datos  $\mathbf{X}$  de tres vías en una matriz de dos dimensiones.

## CAPÍTULO 3: COMPUESTOS ORGANOESTÁNNICOS EN SEDIMENTOS SUPERFICIALES

### 3.1 Optimización de las etapas de extracción y derivatización asistida por ultrasonido

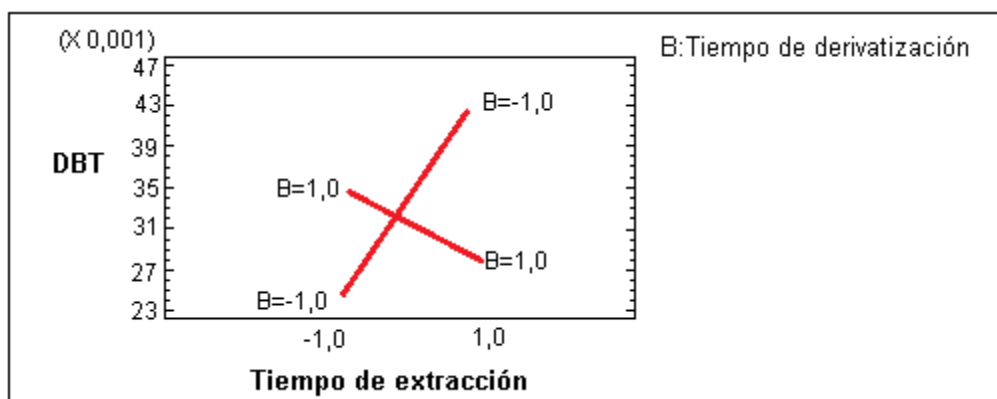
Los efectos principales y su interacción (AB) correspondientes a la optimización de las etapas de extracción y derivatización se observan en el diagrama de Pareto representado en la **Figura 3.1**, tomando como ejemplo al compuesto disustituido (DBT). Los datos obtenidos se evaluaron por el test de análisis de varianza (ANOVA). La línea vertical, que se encuentra en la figura, indica el nivel de confianza del 95%, es decir, los efectos que superan esta línea son estadísticamente significativos. Como se puede observar, sólo la interacción (AB) puede ser considerada significativa, mostrando un efecto negativo. Mientras que, los factores A y B muestran no ser estadísticamente significativos.



**Figura 3.1-** Gráfico de Pareto de los efectos normalizados en el diseño factorial  $2^2$  para DBT. La línea vertical representa el intervalo de confianza del 95% para un efecto significativo.

En términos de la interacción AB (**Figura 3.2**) pueden explicarse las condiciones óptimas de trabajo, las cuales corresponden al experimento número 2 (**Tabla 2.3**), es decir, 8 min de tiempo de extracción y 1 min de tiempo de derivatización. Como puede observarse, cuando el tiempo de extracción aumenta, se obtiene una mejor respuesta

para los tiempos de derivatización más bajos. Para los otros compuestos de interés, TBT y MBT, se obtuvieron resultados similares.



**Figura 3.2-** Gráfico de interacción del tiempo de extracción vs el tiempo derivación para DBT.

### 3.2 Parámetros analíticos de los métodos propuestos: UNEP modificado y US

Se llevó a cabo la evaluación de distintos parámetros analíticos correspondientes a los métodos propuestos en este trabajo. La primera característica evaluada fue la sensibilidad analítica y, como se observa en la **Tabla 3.1**, cuando se utilizó energía de US en las etapas de extracción y derivatización se logró una mayor sensibilidad analítica, excepto para la determinación de TBT donde ambos métodos exhibieron pendientes similares en las curvas de calibrado ( $p > 0,05$ ). En cuanto a los coeficientes de determinación obtenidos ( $R^2$ ), estos oscilaron entre 0,994 y 0,999 para UNEP modificado y fueron ligeramente mejores para US. La evaluación de linealidad se realizó aplicando la prueba de ANOVA, y no se observó falta de ajuste al modelo lineal para los tres analitos estudiados ( $p > 0,30$ ), para ninguno de los dos métodos analíticos aplicados.

Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) son parámetros de mérito analítico que establecen la capacidad de análisis de un método analítico en condiciones de máxima sensibilidad de operación instrumental (Clayton *et al.*, 1987). El límite de detección es la mínima concentración de analito en una muestra que puede ser detectada con un aceptable nivel de confianza, pero no necesariamente cuantificada. El límite de cuantificación es la mínima concentración de analito que se puede determinar con un nivel aceptable de confianza. Los LOD y LOQ se calcularon teniendo en cuenta la

relación señal ruido: S/N=3 y S/N=10, respectivamente. El método de referencia para los estudios de la contaminación marina (UNEP/IOC/IAEA, 1994) informó que los límites de detección para TBT, DBT y MBT fueron 5, 10 y 20 ng Sn g<sup>-1</sup> p.s. (peso seco), respectivamente. Con la aplicación de dicho método pero con las modificaciones planteadas en este trabajo de Tesis, se lograron límites de detección más bajos: 1,5; 1,3 y 5,2 ng Sn g<sup>-1</sup> p.s. para TBT, DBT y MBT, respectivamente. Con la aplicación de energía de ultrasonido (US) en las etapas de extracción y derivatización, se lograron límites de detección aún más bajos: 0,8; 1,1 y 3,5 ng Sn g<sup>-1</sup> p.s. para TBT, DBT y MBT, respectivamente.

**Tabla 3.1-** Cifras de mérito para la determinación de los compuestos orgánicos de estaño mediante GC-MS.

Método	Analito	Intervalo lineal de trabajo	y = b <sub>0</sub> + b <sub>1</sub> x		R <sup>2</sup>	LOD	LOQ
			b <sub>0</sub> (S <sub>b0</sub> )	b <sub>1</sub> (S <sub>b1</sub> )			
US	TBT	4,5-1000	0,002 (1 E-4)	0,382 (1,2 E-2)	0,999 <sub>5</sub>	0,8	2,7
	DBT	6,2-1000	0,002 (3 E-4)	0,277 (7 E-3)	0,999 <sub>1</sub>	1,1	3,7
	MBT	19,5-1000	0,001 (6 E-4)	0,215 (4 E-3)	0,999 <sub>3</sub>	3,5	11,7
UNEP modificado	TBT	8,3-1000	-0,002 (2 E-4)	0,357 (1,4 E-2)	0,997	1,5	5,0
	DBT	7,0-1000	0,036 (4 E-3)	0,159 (8 E-3)	0,994	1,3	4,2
	MBT	28,8-100	0,004 (9 E-4)	0,147 (3 E-3)	0,999 <sub>2</sub>	5,2	17,3

Intervalo lineal de trabajo (ng Sn mL<sup>-1</sup>), b<sub>0</sub>: ordenada al origen; b<sub>1</sub>: pendiente; S<sub>b0</sub>: desviación estándar de la ordenada al origen; S<sub>b1</sub>: desviación estándar de la pendiente; LOD-LOQ (ng Sn g<sup>-1</sup>p.s.); p.s.: peso seco

La trazabilidad de ambos métodos se evaluó utilizando un material de referencia de sedimento marino, PACS-2 (Consejo Nacional de Investigación de Canadá, Ottawa, Canadá). Los resultados obtenidos se presentan en la **Tabla 3.2** y no muestran un sesgo significativo con respecto al material de referencia para TBT y DBT, cuando se aplica el método basado en US. Cuando se llevó a cabo el método UNEP con algunas modificaciones, no se encontró sesgo significativo para TBT.

El bajo porcentaje de recuperación para MBT obtenido al aplicar el método UNEP modificado podría atribuirse a una desorción insuficiente de dicho compuesto (Ceulemans & Adams, 1995). La alta afinidad de adsorción de este analito por los sedimentos estuarinos podría explicarse en términos de la polaridad del MBT (Randall & Weber, 1986). Además, otros autores sugieren que altos contenidos de carbono orgánico podrían afectar negativamente a la extracción de MBT de los sedimentos (Ceulemans & Adams,



1995). Debido a que el MBT parece estar más fuertemente ligado al sedimento que DBT y TBT, se necesitan condiciones de extracción más rigurosas con el fin de extraerlo cuantitativamente a partir de esta matriz. En este sentido, la aplicación de US en lugar de la agitación convencional logró mejores valores de recuperación de MBT.

**Tabla 3.2-** Concentración de los compuestos orgánicos de estaño de interés expresados como ng Sn g<sup>-1</sup> p.s. en el material de referencia PACS-2.

Analito	Valores obtenidos		Valores Certificados
	US	UNEP modificado	
TBT	863 (1,5)	795 (12,6)	890 ± 105
DBT	998 (1,9)	749 (11,8)	1047 ± 64
MBT	495 (1,1)	315 (9,8)	600 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> solo para información. Los valores de DER% están incluidos entre paréntesis. (n=3)

La precisión se evaluó en condiciones de repetitividad y se estimó como DER% (desviación estándar relativa porcentual) de tres determinaciones, utilizando para ello el material de referencia PACS-2. Los resultados logrados están en conformidad con las recomendaciones de análisis de validación analítica, es decir, por debajo del 20% (Eurachem, 1998; IUPAC, 2002) (**Tabla 3.2**). Sin embargo, fue notablemente mejor para el método que aplica US.

Con el fin de evaluar la eficacia de la extracción, se sometieron muestras de sedimentos liofilizadas a ambos procedimientos analíticos (UNEP modificado y US) con concentraciones conocidas de TeBT y se añadió TPrT como estándar interno. Debido a que TeBT no sufre el proceso de derivatización, se utilizó esta característica para evaluar la etapa de extracción. Las recuperaciones obtenidas fueron 101% para el método UNEP modificado y el 98,9% para el método basado en US, por tanto la aplicación de agitación orbital y ultrasónica resultan comparables en la etapa de extracción. A partir de estos resultados, podría suponerse que los porcentajes de recuperación obtenidos para cada analito (TBT, DBT y MBT) aplicando ambos métodos dependen, principalmente, del proceso de derivatización.

A partir del estudio de todos los parámetros analíticos podemos observar que la aplicación de US, en lugar del empleo de agitación convencional, demuestra ser más adecuada para la matriz en estudio, logrando mayor sensibilidad analítica para los tres analitos estudiados, límites de detección más bajos y menores valores de DER%. En

términos de eficiencia de extracción, ambos métodos (US y UNEP modificado) resultan ser satisfactorios.

### 3.3 Niveles de compuestos orgánicos de estaño en muestras de sedimentos superficiales

Las muestras fueron tratadas con el método que utiliza US, dadas las mejores características y desempeño analítico discutidos anteriormente.

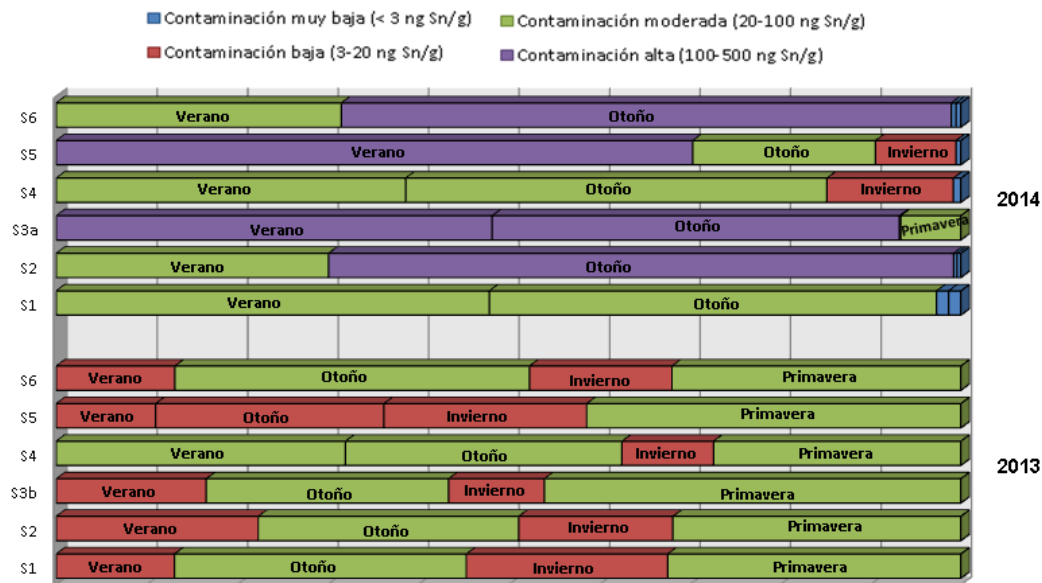
Durante el período de muestreo se obtuvieron en total 48 muestras de sedimento superficiales. En la **Tabla 3.3 y 3.4** se resumen los valores de los compuestos orgánicos de estaño hallados durante todo el período de estudio. Se observa que tanto TBT como sus productos de degradación - DBT y MBT - se detectaron en todos los sitios de muestreo y en todas las estaciones del año. En 2013, con un total de 24 muestras, los niveles de TBT se encontraron entre 7,68 y 36,75 ng Sn g<sup>-1</sup> p.s. La concentración de DBT osciló entre 14,32 y 156,09 ng Sn g<sup>-1</sup> p.s. Por último, las concentraciones MBT variaron de 31,05 a 292,62 ng Sn g<sup>-1</sup> p.s. Por otro lado, en 2014 (24 muestras), los valores de OTC se encontraron entre valores no cuantificables y 259,01 ng Sn g<sup>-1</sup> p.s., 782,13 ng Sn g<sup>-1</sup> p.s. y 831,14 ng Sn g<sup>-1</sup> p.s. para TBT, DBT y MBT, respectivamente.

Dowson *et al.*, (1993) propusieron una clasificación de sedimentos, basada en su contenido de TBT, que incluía los siguientes niveles: contaminación muy baja (< 3 ng Sn g<sup>-1</sup>), baja (3-20 ng Sn g<sup>-1</sup>), moderada (20-100 ng Sn g<sup>-1</sup>), alta (100-500 ng Sn g<sup>-1</sup>) y muy alta (> 500 ng Sn g<sup>-1</sup>). Como se observa en la **Figura 3.3**, en 2013, y de acuerdo a dicho criterio de clasificación, durante la estación estival todos los sitios presentaron contaminación baja con respecto a las concentraciones encontradas de TBT, con la excepción del sitio S4 (Posta de Inflamables), que se encontró moderadamente contaminado. Por el contrario, durante el otoño todos los sitios de muestreo pudieron ser clasificados como moderadamente contaminados por TBT con la excepción de S5 (Puerto Cuatrerros, contaminación baja). Por otra parte, en la estación invernal todas las muestras de sedimentos se encontraron ligeramente contaminadas (3-20 ng Sn g<sup>-1</sup>). Finalmente, en la estación primaveral todos los sedimentos fueron clasificados como moderadamente contaminados.

**Tabla 3.3-** Valores de TBT y sus productos de degradación- DBT y MBT- en muestras de sedimento superficiales, tomadas en 2013, expresados en ng Sn g<sup>-1</sup> p.s.

Estaciones del año	Sitios	TBT	DBT	MBT	TBts <sup>a</sup>	BDI
Verano	S1	11,6 ± 0,8	66,8 ± 3,2	33,7 ± 1,2	112 ± 4	0,12
	S2	16,4 ± 1,0	77,7 ± 2,9	67,6 ± 2,1	162 ± 4	0,11
	S3b	13,3 ± 0,4	74,4 ± 4,8	49,3 ± 3,1	137 ± 6	0,11
	S4	24,4 ± 1,1	66,9 ± 1,3	58,4 ± 3,9	150 ± 4	0,19
	S5	7,68 ± 0,15	76,8 ± 7,9	54,2 ± 2,7	139 ± 8	0,06
	S6	8,57 ± 0,52	65,1 ± 1,7	32,4 ± 1,1	106 ± 2	0,09
Otoño	S1	28,5 ± 0,5	67,6 ± 6,8	116 ± 8	212 ± 10	0,16
	S2	21,1 ± 1,1	84,9 ± 9,9	181 ± 6	288 ± 12	0,08
	S3b	20,8 ± 1,4	74,4 ± 3,7	57,8 ± 5,1	153 ± 6	0,16
	S4	20,0 ± 1,7	61,5 ± 5,6	47,8 ± 4,2	129 ± 7	0,18
	S5	17,6 ± 0,1	52,8 ± 1,0	52,8 ± 5,6	123 ± 6	0,17
	S6	25,6 ± 1,3	77,1 ± 6,6	292 ± 8	395 ± 11	0,07
Invierno	S1	19,7 ± 2,8	55,1 ± 5,2	216 ± 15	292 ± 16	0,07
	S2	12,5 ± 0,5	35,5 ± 1,5	213 ± 14	262 ± 14	0,05
	S3b	8,4 ± 1,0	26,7 ± 2,8	41,3 ± 2,0	76,5 ± 3,6	0,12
	S4	7,7 ± 0,6	35,0 ± 3,8	52,9 ± 6,7	95,5 ± 7,8	0,09
	S5	15,4 ± 0,5	27,1 ± 2,9	31,0 ± 2,5	73,6 ± 3,8	0,27
	S6	10,3 ± 1,0	156 ± 12	35,4 ± 2,7	202 ± 12	0,05
Primavera	S1	32,0 ± 3,8	16,6 ± 1,5	64,0 ± 7,1	112 ± 8	0,37
	S2	23,4 ± 2,9	16,5 ± 0,8	234 ± 6	275 ± 6	0,09
	S3b	36,8 ± 3,4	26,6 ± 2,8	75,0 ± 4,2	138 ± 6	0,36
	S4	20,8 ± 2,0	14,3 ± 0,8	152 ± 18	188 ± 19	0,12
	S5	28,9 ± 4,6	20,4 ± 2,0	116 ± 20	166 ± 20	0,19
	S6	20,8 ± 0,4	36,8 ± 3,4	31,7 ± 0,7	89,3 ± 3,4	0,64

Los valores reportados son el promedio de tres réplicas junto con su correspondiente desviación estándar  
<sup>a</sup>TBts:TBT+DBT+MBT, BDI= TBT/(DBT + MBT).



**Figura 3.3-** Patrón de contaminación basado en la concentración de TBT, de acuerdo a la clasificación de Dowson *et al.*, (1993).

En 2014 se observa una mayor variabilidad entre las estaciones muestreadas (**Figura 3.3**). Por un lado, en verano, los sitios S1, S2, S4 y S6 pudieron ser clasificados como moderadamente contaminados por TBT, mientras que los sitios S3a y S5 se encontraron altamente contaminados. Por otro lado, en otoño, se encontraron concentraciones entre 100 y 500 ng Sn g<sup>-1</sup> del compuesto trisustituido en los sitios S2, S3a y S6, clasificándolos de esta forma como altamente contaminados. Los sitios S1 y S4 se mantuvieron como moderadamente contaminados y el sitio S5 también presentó contaminación moderada. En la estación invernal, las concentraciones de TBT encontradas disminuyeron en todos los sitios de muestreo. De esta forma, los sitios S1, S2, S3a y S6 se clasificaron como sitios con contaminación muy baja mientras que, los sitios S4 y S5 presentaron baja contaminación. En primavera, todos los sitios mostraron estar muy poco contaminados, a excepción del S3a que se encuentra moderadamente contaminado.

**Tabla 3.4-** Valores de TBT y sus productos de degradación- DBT y MBT- en muestras de sedimento superficiales, tomadas en 2014, expresados en ng Sn g<sup>-1</sup> p.s.

Estaciones del año	Sitios	TBT	DBT	MBT	TBts <sup>a</sup>	BDI
Verano	S1	28,8 ± 1,0	33,2 ± 1,8	263 ± 5	324 ± 5	0,10
	S2	61,7 ± 0,7	36,9 ± 1,9	149 ± 2	248 ± 3	0,33
	S3a	259 ± 14	104 ± 6	435 ± 25	798 ± 16	0,48
	S4	38,4 ± 14,2	42,4 ± 2,2	155 ± 9	236 ± 17	0,19
	S5	108 ± 2	55,8 ± 0,6	210 ± 9	375 ± 9	0,41
	S6	47,9 ± 3,9	37,3 ± 2,4	150 ± 5	235 ± 7	0,26
Otoño	S1	29,7 ± 1,2	67,4 ± 7,5	463 ± 6	560 ± 10	0,06
	S2	141 ± 12	33,3 ± 5,0	611 ± 9	786 ± 15	0,22
	S3a	241 ± 15	97,3 ± 7,4	831 ± 8	1170 ± 18	0,26
	S4	46,2 ± 4,4	40,1 ± 4,3	123 ± 8	210 ± 10	0,28
	S5	31,2 ± 2,6	48,5 ± 2,2	n.c.	83,2 ± 3,4	0,64
	S6	102 ± 3	38,3 ± 2,5	n.c.	146 ± 4	2,67
Invierno	S1	n.c.	10,0 ± 0,6	47,0 ± 6,2	57,9 ± 6,2	-
	S2	n.c.	3,70 ± 0,15	117 ± 1	121 ± 1	-
	S3a	n.c.	15,1 ± 1,6	196 ± 7	212 ± 8	-
	S4	13,9 ± 1,8	11,6 ± 0,9	417 ± 7	442 ± 7	0,03
	S5	13,7 ± 4,0	5,46 ± 1,04	247 ± 5	266 ± 6	0,05
	S6	n.c.	n.c.	72,2 ± 6,3	74,1 ± 6,3	-
Primavera	S1	n.c.	n.c.	134 ± 5	136 ± 5	-
	S2	n.c.	598 ± 34,8	98,5 ± 3,7	697 ± 35	-
	S3a	35,6 ± 2,9	6,94 ± 0,85	288 ± 18	331 ± 18	0,12
	S4	n.c.	601 ± 6	47,7 ± 2,4	650 ± 7	-
	S5	n.c.	782 ± 12	220 ± 12	1003 ± 17	-
	S6	n.c.	n.c.	243 ± 7	245 ± 7	-

Los valores reportados son el promedio de tres réplicas junto con su correspondiente desviación estándar  
n.c.: No cuantificado, <sup>a</sup>TBts: TBT+DBT+MBT, BDI= TBT/ (DBT + MBT). -: Valores próximos a cero

Por lo tanto, como se muestra en la **Figura 3.3**, durante 2013 se encontró que la concentración de TBT fue mayor durante el otoño y la primavera que durante el verano y el invierno. En 2014 se hallaron concentraciones más elevadas de TBT en verano y en otoño que en invierno y primavera. Esta variación estacional podría atribuirse a varias razones. En primer lugar, al dragado de la ruta de navegación (Canal Principal) que provoca la removilización de los sedimentos de fondo y, por tanto, podría incidir en el transporte y la recirculación de los OTC (Buggy & Tobin, 2006). Además, se puede esperar que las descargas del material dragado contengan altos niveles de TBT (Santos *et al.*, 2004), ya que, en condiciones anaeróbicas (sedimentos del fondo), la vida media de

TBT parece estar en el orden de decenas de años (Dowson *et al.*, 1993). Además, estos sedimentos anóxicos pueden actuar como reservorios de TBT, los cuales pueden ser remobilizados a la columna de agua por fenómenos de desorción (Unger *et al.*, 1988).

En otoño, hay un notable incremento del tráfico marítimo debido a las actividades de exportación de granos durante el período entre abril y junio, lo que puede explicar el aumento en los niveles de TBT encontrados. Por otra parte, la disminución de la concentración de TBT en los sedimentos durante el invierno se debe, probablemente, a un proceso de degradación causado por las diatomeas (Seligman *et al.*, 1996). De hecho, la zona interna del estuario de Bahía Blanca se caracteriza por poseer altos niveles de nutrientes durante el otoño (Freije & Marcovecchio, 2007) y un florecimiento de diatomeas durante el invierno-primavera (junio-septiembre) (Gayoso, 1999; Guinder *et al.*, 2015). El mencionado florecimiento de diatomeas (“*bloom* fitoplanctónico”) es el evento más importante del ciclo anual del fitoplancton en el estuario, no sólo por su magnitud sino también por su temprano inicio (Popovich *et al.*, 2006; Popovich, 2007).

Las menores concentraciones encontradas en verano 2013 y primavera 2014, pueden ser atribuidas a los días lluviosos previos al muestreo. Buggy & Tobin (2006) sugieren que la resuspensión de sedimentos superficiales, provocado por el aumento de agua dulce proveniente de lluvias, da lugar a que el TBT ingrese a la columna de agua y por tanto se encuentre en menor concentración en el sedimento.

### 3.4 Índice de degradación de TBT

En general, el encontrar concentraciones elevadas de TBT en un determinado sitio, supone que ha habido una descarga reciente de ese compuesto en el medio. Sin embargo, cuando la concentración de MBT es más elevada que la del derivado trisustituido, la contaminación es considerada antigua o, alternativamente, los procesos de degradación están ocurriendo de manera más rápida. El índice de degradación de butilestaño (BDI) se definió como la relación entre TBT y sus productos de degradación (Diez *et al.*, 2002), según la siguiente fórmula:

$$\text{BDI} = [\text{TBT}/(\text{MBT} + \text{DBT})] \quad [\text{Ec. 1}]$$

y puede utilizarse para estimar el nivel de degradación de TBT en cada sitio muestreado.

Como mencionamos anteriormente, existen muchos factores que pueden ser responsables de la degradación de estos compuestos en el medio y, por tanto, no es fácil

evaluar qué tan reciente es la entrada de este contaminante en los sitios estudiados. Sin embargo, el uso del BDI parece ser apropiado teniendo en cuenta que las muestras se recogieron al mismo tiempo, en un área relativamente pequeña y bajo condiciones ambientales similares.

Un BDI >1 sugiere que la contaminación se debe a aportes recientes de TBT; por el contrario, un índice <1 indica la falta de afluencia reciente de TBT o que dicho compuesto se encuentra bajo un proceso avanzado de degradación y por lo que la contaminación se podría considerar antigua (Diez *et al.*, 2002).

De acuerdo con los valores de BDI obtenidos (**Tabla 3.3**), se observa que la contribución de TBT al estuario de Bahía Blanca no es reciente y/o se encuentra bajo un proceso de degradación general y probablemente rápido, ya que es un estuario que se caracteriza por un gran contenido de nutrientes y alta biomasa fitoplanctónica.

Sin embargo, en 2014, en el sitio de muestreo más interno del estuario (S6-otoño) se encontró un BDI de 2,67 lo que podría ser resultado del transporte de sedimentos debido a las corrientes de marea. Por ejemplo, el sitio S5, que en verano tenía una alta concentración de TBT, en la estación siguiente sufrió un descenso de la misma, quizás debido a la movilización de sedimentos hacia el sitio S6. Al respecto, cabe mencionar la importancia en el transporte de MPS que traslada los OTC a lo largo de toda el área de estudio y la sedimentación de las partículas que se ve favorecida por la hidrodinámica del estuario de Bahía Blanca.

### **3.5 Características asociadas a la distribución de OTC en los sedimentos estudiados**

Cuando se evalúan las concentraciones de OTC en sedimentos resulta de importancia tener en cuenta ciertas características de la matriz (contenido de materia orgánica y granulometría), así como también, ciertos parámetros fisicoquímicos tales como temperatura, salinidad y pH, dado que pueden influir en la distribución de los compuestos estudiados (Hoch, 2001). Estas variables fueron analizadas en los sedimentos superficiales del estuario de Bahía Blanca con el fin de evaluar el rol de las propiedades fisicoquímicas sobre la distribución de los OTC.

- **Materia orgánica**

El contenido de materia orgánica juega un papel importante para el destino, movilidad y disponibilidad de los compuestos orgánicos de estaño en los ecosistemas marino-costeros; de hecho, la materia orgánica ha sido señalada como el componente adsorbente principal de la matriz de los sedimentos. Los compuestos orgánicos de estaño estarán más o menos disponibles para los organismos bentónicos en función de las propiedades iónicas y/o lipofílicas que determinan el grado de asociación de los OTC a la materia orgánica (Pinochet *et al.*, 2009). De esta manera, los sedimentos ricos en materia orgánica podrían actuar como un gran sumidero de TBT en el ambiente (Langston & Pope, 1995).

En la **Figura 3.4** se muestra el contenido de materia orgánica (OM, expresado en %) para cada sitio en estudio a lo largo de los dos años de muestreo. Los valores determinados fluctuaron entre 2,1% (S6, otoño, 2014) y 11,0% (S1, otoño, 2013). Si bien estacionalmente el OM% no muestra un patrón claramente establecido, puede observarse que, por lo general, en verano e invierno el contenido de materia orgánica tiende a aumentar, mientras que en otoño y primavera se observa una disminución de dicho parámetro. A excepción del sitio S1 (Puerto Rosales) en otoño de 2013, donde se observa un gran aumento del OM%, probablemente asociado a una abundancia fitoplanctónica que tiene lugar antes del llamado “*bloom* fitoplanctónico”. Es importante destacar que los sedimentos de este estuario muestran contenidos de OM durante todo el período estudiado, lo que indica su significativa productividad.

No pudo hallarse una correlación estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre el OM% y las concentraciones de los compuestos organoestánicos estudiados (TBT, y sus productos de degradación, DBT y MBT). En este sentido, en la literatura se han reportado resultados contradictorios en cuanto a dicha correlación. Así, por un lado, Pinochet *et al.*, (2009) mostraron muy buena correlación entre las concentraciones de TBT y DBT con la materia orgánica, en los sedimentos marinos de la bahía de San Vicente, Chile. Por otro lado, Abidli *et al.*, (2013) demostraron poca o ninguna correlación para estos parámetros en sedimentos superficiales de la costa de Túnez. Este comportamiento impredecible puede ser atribuido a las propiedades fisicoquímicas inherentes al sedimento, tales como la capacidad de adsorción relativa de partículas inorgánicas y la existencia de actividad biológica (bioturbación) en las capas de sedimentos superiores (Town & Filella, 2002; Braga Castro *et al.*, 2012). El estuario de Bahía Blanca está caracterizado por su alta productividad (Freije *et al.*, 2008) y por la presencia de numerosas y diversas comunidades bentónicas, muchas de las cuales tienen una alta capacidad de remoción de



contaminantes de los sedimentos (Elías *et al.*, 2007), por tanto en función de lo dicho anteriormente, se puede considerar que estas características podrían ser la causa de la ausencia de una relación entre los niveles de OTC y el contenido de OM%. Otra probable explicación a la ausencia de correlación es la incorporación de los compuestos orgánicos de estaño di y monobutilado al ecosistema a partir de fuentes antropogénicas (como la presencia de una planta de fabricación de PVC, donde se utiliza DBT y MBT como estabilizador químico, descargas de aguas residuales y efluentes industriales).

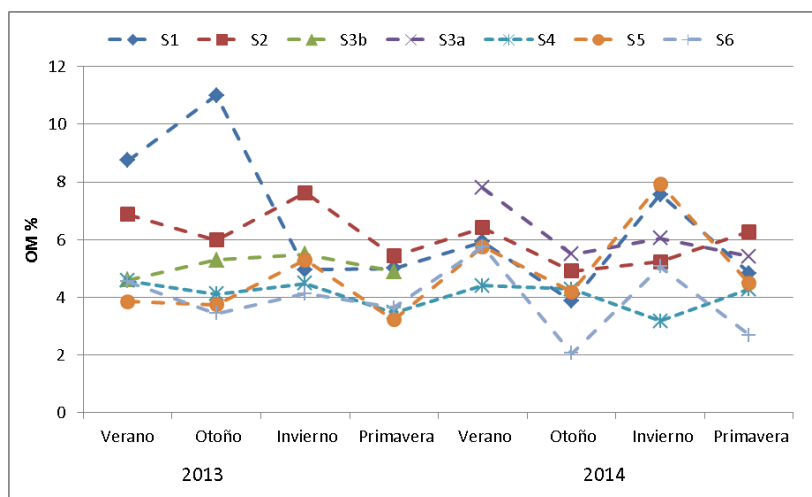


Figura 3.4- Distribución de OM% en sedimentos superficiales del estuario de Bahía Blanca.

- **Granulometría**

En la **Tabla 3.5** se presentan los resultados obtenidos en los análisis de las fracciones granulométricas de sedimentos superficiales para los sitios seleccionados a lo largo del Canal Principal, expresados en porcentajes. En relación con el tamaño de grano, la totalidad de las estaciones de muestreo fueron clasificadas como sedimentos limo-arcillosos. En general, los cocientes limo/arcilla variaron en un intervalo entre 0,77 y 1,60 creciendo en sentido interno-externo, teniendo en cuenta la orientación del estuario. En general, los sedimentos con fracciones mayoritariamente “finas” (limo y arcilla) tienen una mayor relación superficie/volumen que aquellos con partículas más grandes (fracción gruesa), y por tanto tienen una mayor capacidad para adsorber materia orgánica, pudiendo sustentar mayores concentraciones de OTC que los sedimentos arenosos (Hoch *et al.*, 2002).

A pesar del hecho de que los compuestos orgánicos de estaño serían preferentemente adsorbidos en la fracción fina, al igual que para la OM%, no se encontró

correlación significativa entre TBT, DBT y MBT con la granulometría ( $p > 0,05$ ). La falta de correlación puede ser atribuida a la alta variabilidad en la dinámica de deposición de los sedimentos causada por las altas tasas de transporte de los sedimentos en el área de estudio (Perillo & Piccolo, 1991) y a la removilización que se produce en los sedimentos como consecuencia del dragado periódico que se realiza sobre el canal principal.

**Tabla 3.5-** Análisis granulométrico de los sedimentos en cada sitio de muestreo. Los resultados se expresan en porcentajes.

Fracciones	Sitios de muestreo						
	S1	S2	S3a	S3b	S4	S5	S6
Arcilla (<39 $\mu$ m)	55,25	51,16	50,19	49,36	34,76	43,76	34,08
Limo (39-63 $\mu$ m)	42,50	41,48	49,69	48,06	47,25	48,60	54,67
proporción L/A	0,77	0,81	1,01	0,97	1,36	1,11	1,60
Arena (>63 $\mu$ m)	0,95	5,64	8,52	2,38	16,83	6,14	10,20
Clasificación	franco limoso	franco limoso	limo arcillosos	limo arcillosos	franco limoso	limo arcillosos	franco arcilloso

- **Parámetros fisicoquímicos medidos *in situ* en el medio acuático**

La actividad de adsorción/desorción de los compuestos orgánicos de estaño en relación con los sedimentos puede estar significativamente influenciada por cambios producidos en el pH y la salinidad del medio acuático que lo rodea, debido a que no sólo afectan a las propiedades superficiales del sedimento, sino también a la química de la especies de OTC (Hoch *et al.*, 2002).

A valores de pH > 7 la fuerza de adsorción se debe al carácter hidrofílico de los hidróxidos de butilestaño neutros, que dependen del número y la naturaleza de los grupos funcionales unidos al catión de estaño. En este caso, la orden de adsorción, según la creciente hidrofobia, será TBT > DBT > MBT (Hoch *et al.*, 2003).

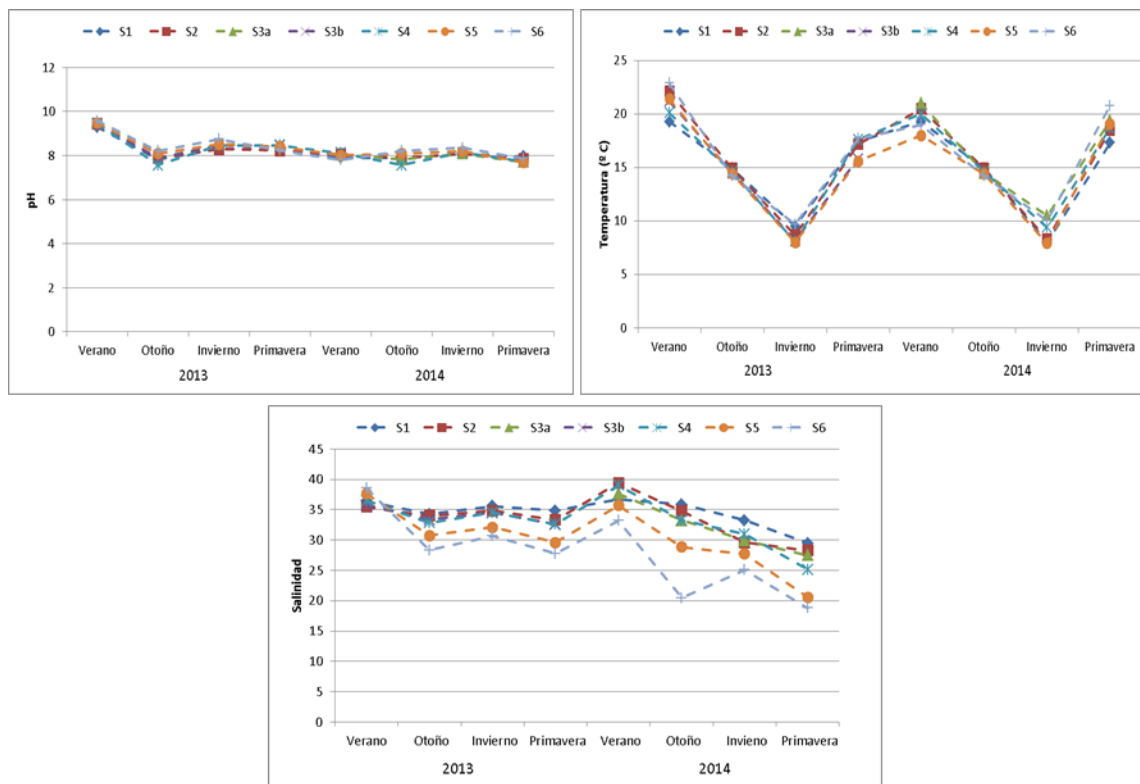
En cuanto a la salinidad, es de esperar que cuanto mayor sea el valor de esta variable mayor sea la desorción de los OTC. Este comportamiento puede explicarse por una competencia de intercambio iónico entre los cationes del agua de mar y las moléculas de butilestaño por los sitios de enlace en la superficie del sedimento (Hoch *et al.*, 2003).

La **Figura 3.5** muestra las variaciones de pH correspondientes a la columna de agua de mar. Como se puede observar, los valores son casi constantes para todos los sitios de muestreo dentro de cada estación del año. El intervalo de pH osciló entre 7,6

(S4, otoño, 2014) y 9,6 (S6, verano, 2013). Un comportamiento similar se observa con las temperaturas medidas a lo largo del período de muestreo. Así, las variaciones de la temperatura del medio dentro de cada estación del año son muy pequeñas, pero existen grandes fluctuaciones entre las distintas estaciones del año (**Figura 3.5**). Como era de esperar, todos los sitios presentaron las mayores temperaturas en verano y las menores en invierno, estos valores oscilaron entre un valor medio de 8,0°C (S1, 2014) y 22,9°C (S6, 2013).

Por otra parte, la salinidad osciló entre 18,8 (S6, primavera, 2014) y 39,4 (S2, verano, 2014). En general, como se observa en la **Figura 3.5**, la salinidad mostró un patrón creciente desde la cabecera (S6) hacia la zona media del estuario (S1), como consecuencia principal de un efecto de dilución provocado por los afluentes de agua dulce de la cuenca de drenaje. Durante el verano, los valores de salinidad aumentan debido a una evaporación uniforme a lo largo de todo el estuario. Esto ocurre especialmente en los puntos de muestreo situados en la zona interna del estuario (principalmente S6) donde el aumento de salinidad es más notorio ya que se trata de zonas de menor profundidad.

Dado que la salinidad y el pH del medio son factores importantes para controlar la partición de los OTC entre el sedimento y la columna de agua (Meador, 2000; Hoch *et al.*, 2002) se esperaba encontrar una correlación significativa. Sin embargo, no se hallaron correlaciones ( $p > 0,05$ ) entre dichas variables fisicoquímicas y los analitos estudiados, así como tampoco con la temperatura del medio. Este hecho, posiblemente, obedezca a la interacción de otros factores que influyen en la distribución de los OTC en el estuario (ej. la presencia de microorganismos responsables de la biodegradación). Otra causa puede provenir de ingresos adicionales de DBT y MBT en el estuario de Bahía Blanca, que podrían estar solapando una posible correlación.



**Figura 3.5-** Variación temporal y espacial de ciertos parámetros fisicoquímicos- pH, temperatura y salinidad- a los largo de los dos años de muestreo.

### 3.6 Distribución de los compuestos orgánicos de estaño

Se empleó el Análisis de Componentes Principales Desplegado (U-PCA), para lograr una mejor visualización en cuanto al comportamiento de los compuestos organoestánicos estudiados en muestras de sedimento, tanto temporal como espacialmente.

#### 3.6.1 Muestras de sedimento superficiales tomadas en 2013

En el análisis de U-PCA se identificaron tres componentes principales, los cuales explicaron el 99,6% de la varianza total. Las **Figuras 3.6 a-c** muestran los gráficos de *loadings* obtenidos después de aplicar U-PCA. El primer componente o factor tiene una gran contribución de la concentración de MBT, el segundo componente principal refleja la contribución de la concentración de DBT y el tercer factor muestra una gran influencia de la concentración de TBT y una contribución, en menor medida, de la temperatura y la salinidad. El resto de las variables estudiadas (pH y contenido de materia orgánica) no

presentan una variabilidad tal que pueda influir en el modelo. Las **Figuras 3.6 d-f** ilustran los gráficos de *scores*.

Como puede observarse (**Fig 3.6 e y f**) el sitio S3b presenta la mayor cantidad de TBT en primavera, seguido por el sitio S1 que, tanto en primavera como en otoño, muestra también elevada concentración (altos valores de factor 3). Particularmente, este último sitio de muestreo se encuentra en cercanías de Puerto Belgrano, que cuenta con instalaciones militares y diques secos comerciales (incluido el dique seco más grande del país para buques de gran porte) donde se reparan y pintan buques tanto de servicio nacional como internacional, lo que puede explicar los altos valores de TBT registrados. Por otra parte, el sitio S3b podría presentar un alto valor de TBT por estar frecuentado, en esta estación del año, por buques de carga.

Las muestras tomadas en otoño y primavera presentan, en general, valores positivos de factor 3, mientras que lo opuesto ocurre para las muestras de verano e invierno (**Figura 3.5 f**). Tanto en la estación otoñal como primaveral se observa un aumento en los niveles del compuesto trisustituido, probablemente como resultado de un notable incremento del tráfico marítimo. En otoño, particularmente debido a las actividades de exportación de granos durante el período entre abril y junio.

Debido a que estudios previos han demostrado que las microalgas y bacterias pueden desempeñar un papel importante en la biodegradación de TBT en el ambiente (Hoch, 2001), la disminución de la concentración de TBT observada en la estación invernal, probablemente, sea producto de un proceso de degradación causado por el fitoplancton presente en el área de estudio, que presenta un colapso de la floración en agosto/septiembre (Guinder, 2011). En el verano el número de embarcaciones, principalmente de pesca y recreación, tiende a aumentar y con ello deberían aumentar los niveles de TBT en el medio. Sin embargo, debido a las altas temperaturas y radiación solar más intensa en esta época del año, la actividad metabólica de los microorganismos se incrementa y con ello la degradación del TBT.

Una excepción a este comportamiento es el sitio S4 en verano que presenta un alto contenido de TBT, probablemente, como resultado de las numerosas embarcaciones comerciales que caracterizan el sitio de estudio. Las muestras S2 y S4 en primavera presentan un valor negativo de factor 3, a pesar de tener altos contenidos de TBT. Esto puede ocurrir debido a la contribución negativa de la salinidad a este factor, puesto que este parámetro parece aumentar a medida que disminuyen los valores de factor 3. Por otra parte, los menores valores de este factor se visualizan en las muestras recolectadas

en invierno, particularmente los sitios S2, S3b y S4, dado que poseen las menores concentraciones de TBT. Si bien, el sitio S6 también posee bajas concentraciones de este compuesto, el valor de salinidad, hace que se encuentre a valores mayores de factor 3.

Como puede observarse en la **Figura 3.6 d y f** el sitio S6 en invierno se encuentra visiblemente apartado del resto de las muestras por tener un alto valor de factor 2, que se corresponde directamente con una concentración de DBT notablemente elevada (aproximadamente el doble o más que cualquiera de los sitios en las distintas estaciones del año). Un comportamiento peculiar se observa en este sitio puesto que las concentraciones de DBT se incrementan a lo largo del año, con un mínimo en primavera y un máximo en invierno. Como ha sido señalado por Almeida et al. (2004), las corrientes de marea son determinantes en el transporte de material particulado que traslada los OTC desde las zonas de origen a zonas remotas, esto puede ocurrir particularmente en este sitio, donde la sedimentación de las partículas se ve favorecida por la hidrodinámica del estuario. El sitio Villarino Viejo (S6) presenta varias características especiales tales como: aguas poco profundas, baja energía de mareas y una capa fina de sedimentos óxicos. Las altas concentraciones de DBT podrían ser resultado de la acumulación del mismo y de un proceso de degradación menos efectivo que en otros sitios estudiados dentro del estuario.

De la misma manera que para TBT, se observa un comportamiento estacional (**Fig 3.6 d y f**) que registra valores positivos de factor 2 para las muestras recolectadas en otoño y verano, mientras que en invierno y primavera los valores son negativos. Esto se asocia con concentraciones de DBT más altas (otoño y verano) y más bajas (invierno y primavera), respectivamente. La única excepción es el ya mencionado comportamiento del sitio S6 con respecto a este analito. Como ya se indicó, es probable que los altos valores encontrados en verano sean producto de las condiciones ambientales favorables a la degradación de TBT, la cual es insignificante a bajas temperaturas y relativamente rápida a las temperaturas registradas en la estación estival (Langston *et al.*, 1987). Contrariamente, en invierno-primavera, el descenso en las concentraciones de DBT puede ser debido al “*bloom* fitoplanctónico” que caracteriza al área de estudio y da lugar a una intensa biodegradación de los OTC.

Como puede observarse (**Fig 3.6 d y e**), el sitio S6 en otoño presentó el valor más alto de factor 1, en concordancia con la concentración más alta de MBT. Probablemente, esto ocurre como resultado de las corrientes de marea que generan un transporte de material particulado desde sitios alejados hacia la parte más interna del estuario (Villarino Viejo, S6). Además, los altos valores encontrados sugieren la existencia de contribuciones

adicionales de MBT más allá de las correspondientes a la degradación de TBT y DBT. Una fuente adicional difusa de dicho analito, posiblemente provenga de las descargas de aguas residuales de la ciudad, donde se drena agua doméstica (aguas negras) sin ningún tratamiento residual (Shim *et al.*, 1999; Hoch *et al.*, 2003; Buggy & Tobin, 2006). Como se ha mencionado en el capítulo 2, este compuesto es utilizado en la estabilización del PVC, material empleado para las tuberías de agua potable, de aguas residuales y de agua de drenaje, por lo que la lixiviación de MBT de los tubos de PVC al medio es posible (Hoch, 2001). Otra fuente, podría derivar de la descarga colectora de efluentes industriales, principalmente por la presencia de una planta de PVC en el área de estudio.

El sitio S2 presenta, con respecto a los demás sitios muestreados, altas concentraciones de MBT. Este sitio se encuentra en la proximidad de la instalación termoeléctrica "Luis Piedra Buena", desde la que se descarga agua a elevada temperatura al estuario, lo cual favorece una degradación más rápida del TBT (Almeida *et al.*, 2004). Por otro lado, se debe considerar la cercanía de S2 a la salida principal de las aguas residuales de la ciudad de Bahía Blanca. Los altos recuentos microbianos registrados en esta zona del estuario (Baldini *et al.*, 1999), confirman una actividad biológica importante, que podría ocasionar la biodegradación de los OTC. Además, las altas concentraciones de MBT podrían obedecer a las fuentes adicionales de este compuesto, mencionadas anteriormente. Por otro lado, el sitio S2 registra un aumento de MBT a lo largo del año, con un mínimo valor en verano y un máximo en primavera. Esto está en concordancia con la velocidad del proceso de degradación de los OTC. El DBT, cuya concentración es alta en verano, comienza a degradarse hasta que el "bloom fitoplanctónico", característico del invierno, acelera dicho proceso, alcanzándose las mayores concentraciones de MBT en primavera. En contraposición, el resto de los sitios de muestreo, presentan valores más bajos (y similares entre sí) de MBT, dado que las características de estos sitios no parecen ser tan favorables para la degradación de los OTC.

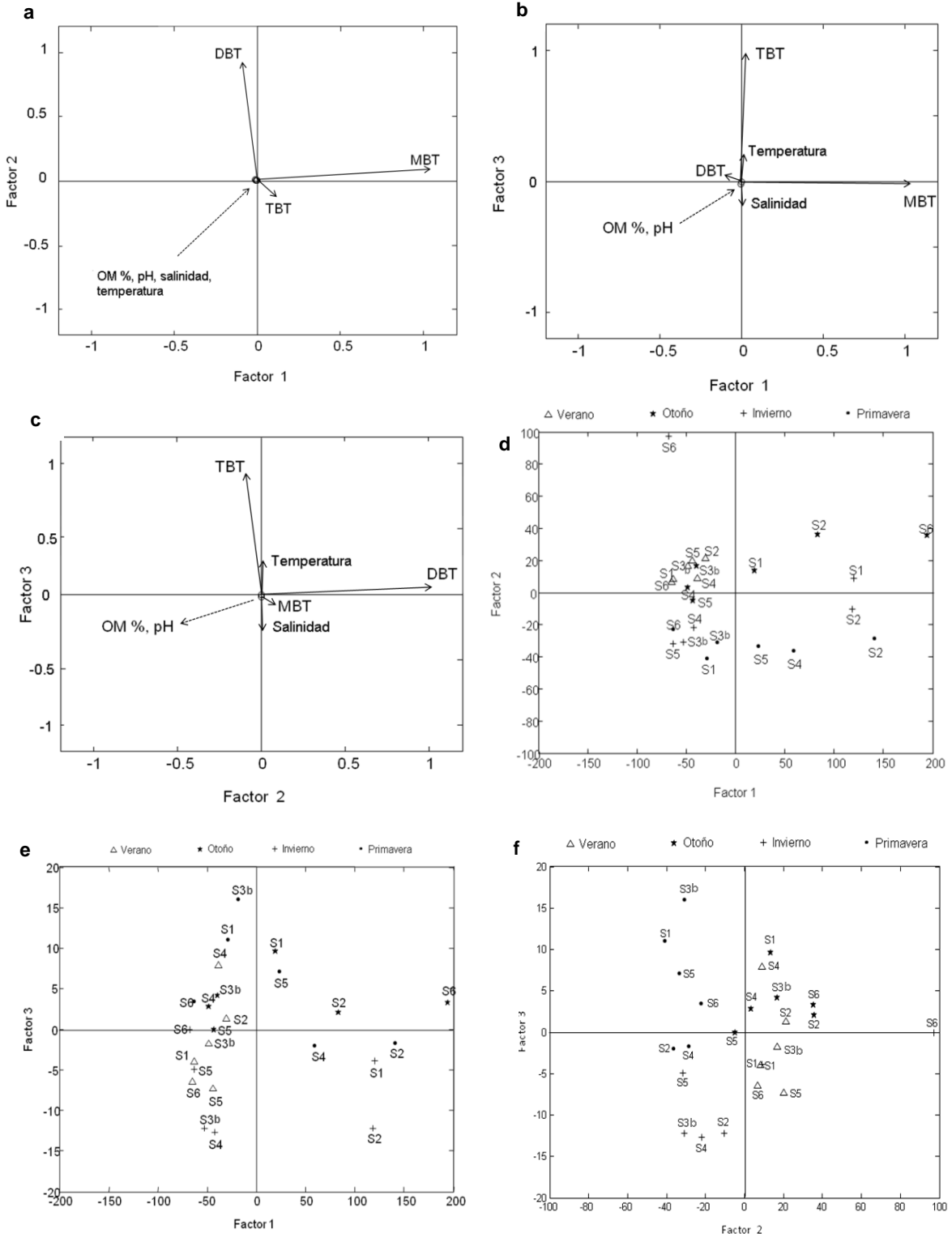


Figura 3.6- a-c Gráficos de loadings, d-f gráficos de scores para las muestras de sedimento superficiales tomadas en 2013.



### 3.6.2 Muestras de sedimentos superficiales tomadas en 2014

A partir del análisis de U-PCA se identificaron tres componentes principales, los cuales explicaron el 49,1%, el 38,1% y el 10,4% de la varianza total, respectivamente. Las variables que contribuyen a la varianza recogida por el modelo son: la salinidad y las concentraciones de TBT, DBT y MBT. El resto de las variables estudiadas (temperatura, pH y contenido de materia orgánica) no presentan una variabilidad tal que deba ser tomada en cuenta por el modelo (**Figuras 3.7 a-c**). Esto demuestra, a pesar de la falta de correlación encontrada entre los compuestos organoestánicos estudiados y la salinidad, la importancia de esta variable en la distribución de los OTC en muestras de sedimento. El primer componente principal está caracterizado por una contribución positiva y elevada con respecto a la concentración de MBT y, en menor medida, de TBT. Al mismo tiempo, se observa una contribución negativa de la concentración de DBT y la salinidad del medio (DBT > salinidad). El segundo factor presenta una componente positiva relacionada con los tres compuestos estudiados (DBT > MBT > TBT) y una componente negativa debida a la salinidad. El tercer componente sólo presenta contribuciones positivas de la concentración de MBT y la salinidad del medio. Las **Figuras 3.7 d-f** ilustran los gráficos de scores de los primeros tres componentes principales.

El patrón de distribución observado de acuerdo al primer y segundo componente principal (**Figura 3.7 d**) presenta un grupo de muestras claramente diferenciado del resto por su posición en el segundo cuadrante. Se trata de las muestras recolectadas en los sitios S2, S4 y S5, en primavera, que se diferencian de las otras muestras por una alta concentración de DBT. Estos niveles significativamente elevados de DBT podrían sugerir un ingreso adicional de este compuesto, posiblemente derivados de efluentes industriales. El resto de los sitios, en primavera, no presentó una concentración de DBT apreciable, probablemente debido a su ubicación (S1 que se encuentra fuera de la parte interna del estuario, S6 que se halla en una zona de baja energía de marea y S3a que corresponde a una zona aislada del Canal Principal), mientras que los sitios con alto contenido de DBT se ubican expuestos a la corriente del canal de navegación.

Se observa un comportamiento general de degradación con respecto al compuesto disustituido, encontrándose las concentraciones más elevadas en verano y las más bajas en la estación primaveral, a excepción de los sitios previamente discutidos. El elevado contenido de DBT, en verano, probablemente sea resultado de la biodegradación de TBT en dicha estación. Las altas temperaturas registradas permiten incrementar la actividad metabólica de los microorganismos y con ello, la degradación de TBT a DBT. Esta

biodegradación se ve intensificada en invierno-primavera por el “*bloom* fitoplanctónico” que caracteriza al estuario de Bahía Blanca, dando lugar a concentraciones menores de DBT en estas estaciones del año, debido a que se degrada hacia el compuesto monosustituido (y éste a estaño metálico).

Las demás muestras se encuentran distribuidas a lo largo de una línea definida por los vectores correspondientes a la salinidad y las concentraciones de MBT y TBT (**Figura 3.7 a**). Las muestras que presentan un mayor contenido de MBT se encuentran en el primer cuadrante (S3a y S2 en otoño, S3a en verano y S4 en invierno). El sitio S3a, particularmente, presentó altas concentraciones de MBT a lo largo del año muestreado. Además, este sitio, se caracteriza por la presencia de numerosas embarcaciones de pesca y recreación a lo largo de todo el año, lo que da lugar a altas concentraciones de TBT. Las concentraciones del compuesto trisustituido aumentaron de forma estacional, con un valor mínimo en invierno y un máximo en otoño, coincidiendo con el aumento en los valores de MBT (coeficiente de Spearman:  $r=0,80$ ;  $p=0,05$ ). Esta correlación significativa, indicaría que el MBT encontrado en el sitio S3a es producto de la degradación del TBT (en sucesivas etapas) y no de contribuciones adicionales. Gracias a las características de este sitio dentro del estuario de Bahía Blanca (ubicación en una zona aislada del canal principal, aguas poco profundas y escasa circulación de las mismas) se ve favorecida la adsorción y acumulación de los OTC-particularmente MBT-en muestras de sedimento presentes en el sitio S3a (Lee *et al.*, 2006)

La elevada concentración de MBT encontrada en el sitio S2, probablemente sea consecuencia de una degradación más rápida del TBT y DBT. Por un lado, debido a la cercanía del sitio S2 a la central termoeléctrica "Luis Piedra Buena", desde donde se descarga agua a elevada temperatura al estuario, favoreciendo la degradación térmica de los OTC (Almeida *et al.*, 2004). Por otro lado, la elevada concentración de MBT encontrada en el sitio S2 puede ser resultado de una importante biodegradación de los OTC, debido a la cercanía de este sitio a la salida principal de las aguas residuales de la ciudad de Bahía Blanca, donde existe una actividad biológica significativa (Baldini *et al.*, 1999).

Por otra parte, la elevada concentración de MBT registrada en el sitio S4, en invierno, parece ser resultado de un ingreso adicional del compuesto monosustituido. Este sitio, se ubica en un centro industrial y en cercanía a la descarga colectora de efluentes industriales, que pueden considerarse posibles fuentes de MBT, principalmente por la descarga proveniente de una fábrica de plástico PVC en el área de estudio. Como

mencionamos anteriormente, DBT (y MBT) son comúnmente utilizados como estabilizadores químicos del calor y la luz en la industria plástica (Ebdon *et al.*, 1998; Olushola Sunday *et al.*, 2012).

Si bien, según su contenido de OTC, se esperaba una posición similar para el sitio S1 en otoño y para el sitio S3a en primavera, el bajo valor de salinidad registrado para dichos sitios en estas estaciones del año ocasiona un desplazamiento de esta muestra hacia el origen de coordenadas. A lo largo de esta diagonal los valores de las muestras para cada estación del año se corresponden, en líneas generales, con la concentración de MBT. Sin embargo, se observan algunas excepciones. En verano, para el sitio S6 se esperaba una posición similar a los sitios S2 y S4 (tercer cuadrante). No obstante, debido al bajo nivel de salinidad registrado en este sitio, se observa un cambio de posición. Lo mismo sucede en primavera para este sitio ya que, de acuerdo a la concentración de MBT se esperaba una posición intermedia entre los sitios S1 y S3a. Sin embargo, esto no ocurre a causa de la baja salinidad registrada en el sitio S6.

El patrón de distribución observado de acuerdo al primer y tercer componente principal (**Figura 3.7 e**) presenta tres agrupaciones diferentes. Por un lado, un conjunto de muestras se encuentra distribuido a lo largo de una diagonal definida por el vector correspondiente a la concentración del MBT (**Figura 3.7 e**). Al igual que lo comentado anteriormente para la **Figura 3.7 d**, se esperaba que el sitio S1, en otoño, ocupara una posición en esta diagonal entre el sitio S2 (otoño) y los sitios S3a (otoño) y S4 (invierno); sin embargo, el elevado valor de salinidad registrado para este sitio lo posicionó fuera de dicha diagonal en dirección al vector correspondiente a la variable fisicoquímica antes mencionada. El mismo comportamiento se observó para los sitios S2 y S4, en verano, los cuales al tener una concentración de MBT similar al sitio S6, en la misma estación, se esperaba encontrarlos en la diagonal. Sin embargo, debido a su elevada salinidad (los valores más altos del año muestreado) se ubicaron fuera de la línea mencionada.

Por otro lado, es posible observar un conjunto de muestras ubicado en el centro de la **Figura 3.7 e**. Al estar alrededor del origen de coordenadas, definido por los factores 1 y 3, estas muestras no parecen estar afectadas significativamente por alguna variable en particular. Es posible afirmar, sin embargo, que todas ellas poseen bajas concentraciones de MBT en relación con aquellas situadas sobre la diagonal mencionada (a excepción de aquellas muestras ya mencionadas: S1-otoño, S2-verano, S4-verano). Otra observación con respecto a este grupo es que las muestras S3a (primavera) y S5 (invierno) son las únicas que poseen valores positivos de factor 1. Este factor tiene una componente menor

correspondiente a la concentración de TBT (**Figura 3.7 b**) y, precisamente, estas muestras son las únicas de este grupo que presentan un contenido de TBT apreciable. Tanto el sitio S3a como el sitio S5, se caracterizan por numerosas embarcaciones de pesca y recreación, lo que favorece la presencia de TBT en muestras de sedimento en dichos sitios.

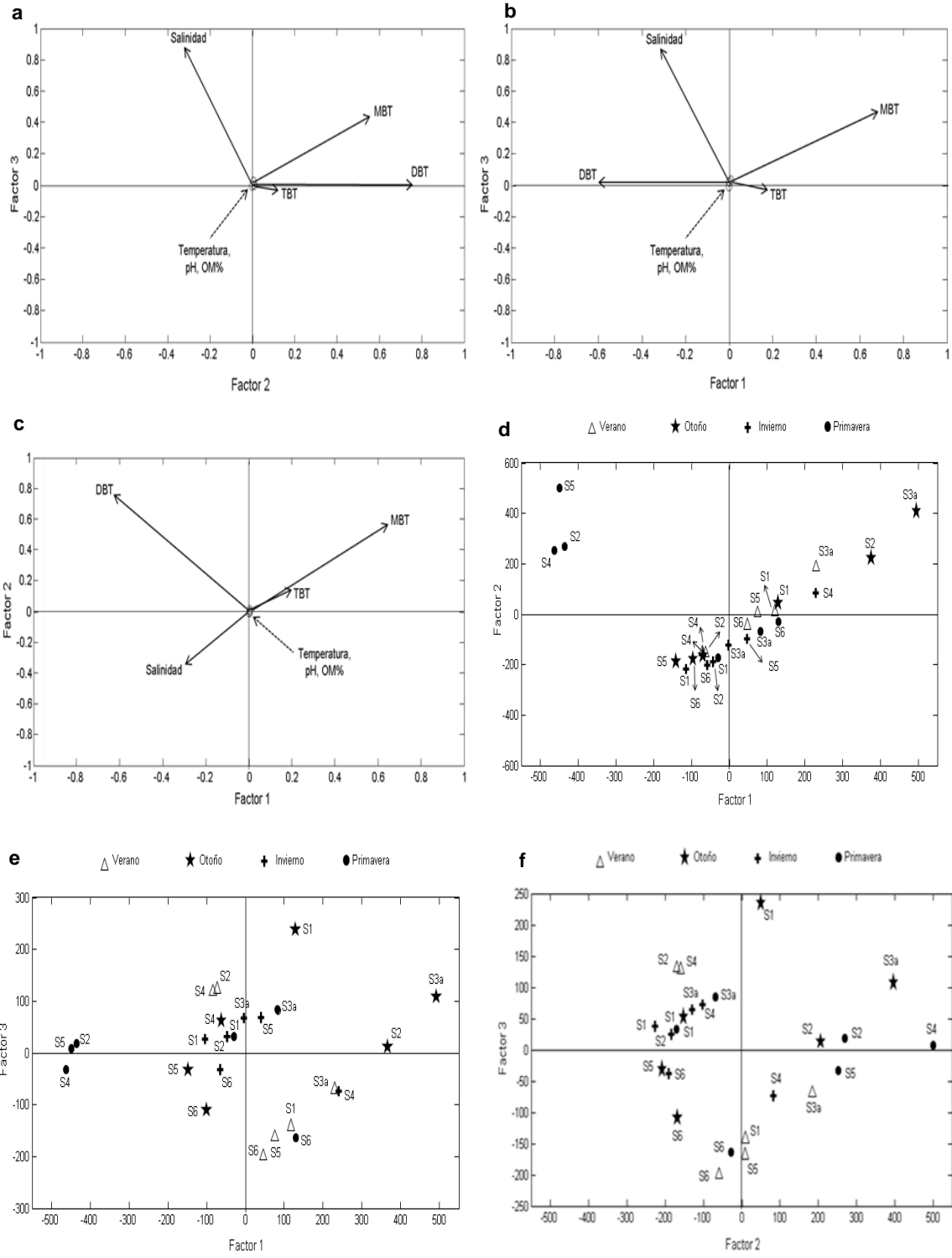
Finalmente, al igual que lo observado en la **Figura 3.7 d**, un grupo de muestras corresponde los sitios S2, S4 y S5 en la estación primaveral se diferenciaron de las otras muestras por un alto valor de factor 3, consistente con una elevada concentración de DBT.

En la **Figura 3.7 f** se observan agrupaciones similares a las que presenta la **Figura 3.7 e**, aunque orientadas según la posición de los vectores asociados a las variables (**Figura 3.7 b**). Por lo tanto, no es necesario realizar comentarios adicionales.

- **Conclusiones parciales**

A partir del análisis de U-PCA se pudo observar que la distribución en cuanto a las concentraciones de TBT y sus productos de degradación –DBT y MBT– en las muestras de sedimento parece estar influenciada por ciertos parámetros fisicoquímicos discutidos anteriormente tales como, temperatura y salinidad del medio. Además, se observó una cierta variación temporal con respecto a las concentraciones de OTC encontradas en las muestras de sedimento. También se pudo notar una importante biodegradación del TBT, principalmente, en el período del “*bloom* fitoplactónico” que caracteriza al área de estudio en invierno/primavera. En cuanto a las concentraciones de DBT y MBT, parecen existir fuentes adicionales de estos compuestos a lo largo del área de estudio, más allá de la degradación del TBT. Estas distintas fuentes se mencionaron a lo largo del capítulo.

Desde un punto de vista espacial no se observó una tendencia clara sino que toda el área de estudio parece estar impactada por la presencia de TBT, DBT y MBT. Las concentraciones más elevadas de TBT no se han encontrado sólo en sitios que suponen una magnitud de impacto mayor, por ser zonas de intenso tráfico marino. Por el contrario, toda el área de estudio parece estar impactada por los OTC, probablemente como resultado de las corrientes de marea que caracterizan la zona de estudio, así como los procesos de dragado que se realizan periódicamente sobre el Canal Principal.



**Figura 3.7-** a–c Gráficos de *loadings*, d–f gráficos de *scores* para las muestras de sedimento superficiales tomadas en 2014.

## CAPÍTULO 4: COMPUESTOS ORGANOESTÁNNICOS EN AGUA DE MAR Y EN MATERIAL PARTICULADO EN SUSPENSIÓN

### 4.1 Parámetros analíticos para la determinación de compuestos organoestánnicos en agua de mar

En la **Tabla 4.1** se pueden observar las cifras de mérito correspondientes a la determinación de OTC en muestras de agua de mar. El método presentó buena linealidad en el ámbito estudiado, con coeficientes de determinación ( $R^2$ ) entre 0,990 y 0,998. La evaluación de linealidad se realizó aplicando la prueba de ANOVA, y no se observó falta de ajuste al modelo lineal ( $p > 0,30$ ). Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para cada analito se calcularon teniendo en cuenta la relación señal/ruido:  $S/N=3$  y  $S/N=10$ , respectivamente. Los LOD alcanzados fueron 2,1; 5,4 y 8,4 ng Sn L<sup>-1</sup> para TBT, DBT y MBT, respectivamente. Los LOQ obtenidos fueron 7,0; 17,7 y 28,0 ng Sn L<sup>-1</sup> para el compuestos tri, di y monosustituido, respectivamente.

**Tabla 4.1-** Cifras de mérito para la determinación de los compuestos orgánicos de estaño mediante GC-MS.

Analito	Intervalo lineal de trabajo	$y = b_0 + b_1 x$		$R^2$	LOD	LOQ
		$b_0$ ( $S_{b_0}$ )	$b_1$ ( $S_{b_1}$ )			
TBT	7,0-1000	-0,021 (0,004)	1,256 (0,063)	0,990	2,1	7,0
DBT	17,7-1000	0,112 (0,015)	0,592 (0,037)	0,998	5,4	17,7
MBT	28,0-1000	-0,022 (0,001)	0,097 (0,012)	0,992	8,4	28,0

Intervalo lineal de trabajo (ng Sn L<sup>-1</sup>)  $b_0$ : ordenada al origen;  $b_1$ : pendiente;  $S_{b_0}$ : desviación estándar de la ordenada al origen;  $S_{b_1}$ : desviación estándar de la pendiente; LOD-LOQ (ng Sn L<sup>-1</sup>).

Para estimar la veracidad y precisión del método aplicado, y debido a que no existe un material de referencia certificado de compuestos organoestánnicos en agua de mar, se realizaron agregados conocidos de TBT y sus productos de degradación, DBT y MBT, sobre muestras de agua de mar. Estas muestras fueron tratadas de igual manera que las muestras de agua de mar analizadas cuyo procedimiento analítico está descrito en el capítulo 2.

La veracidad del método se evaluó en términos de recuperación. Para cada concentración conocida fueron analizadas seis muestras y su promedio se presenta en la **Tabla 4.2**. Los porcentajes de recuperación obtenidos variaron entre el 82,1% y 105,7%, y

se encuentran dentro de los valores de recuperación aceptables, es decir entre 70% y 120%, de acuerdo con las recomendaciones de validación de análisis (Eurachem 1998; IUPAC 2002). La precisión se evaluó en condiciones de repetitividad y se estimó como DER% (desviación estándar relativa porcentual). Los resultados estuvieron en conformidad con las recomendaciones de validación de análisis (Eurachem 1998; IUPAC 2002), es decir, por debajo de 20% (**Tabla 4.2**).

**Tabla 4.2-** Porcentajes de recuperación (%) y DER (%) obtenidos en muestras de agua de mar con agregados conocidos de MBT, DBT y TBT.

Analito	Concentración adicionada (ng Sn L <sup>-1</sup> )	Concentración obtenida (ng Sn L <sup>-1</sup> )	% recuperación	DER%
TBT	50	42,4	104,9	17,4
	500	427,5	85,5	10,2
	1000	821,0	82,1	7,4
DBT	50	43,1	85,9	11,3
	500	520,9	104,2	7,9
	1000	866,0	86,6	2,2
MBT	50	43,8	87,6	3,6
	500	501,5	100,3	12,0
	1000	1057,0	105,7	19,3

Al igual que en las muestras de sedimento, se evaluó la eficacia en la extracción de los analitos. Para ello, a muestras de agua de mar se le agregaron cantidades conocidas de TeBT, se les aplicó el procedimiento analítico ya mencionado (Sección 2.4.3.1), se agregó TPrT y se inyectó en el cromatógrafo. De esta forma, sólo se evaluó la etapa de extracción debido a que el TeBT no sufre el proceso de derivatización, como ya se indicó anteriormente. La eficacia de extracción fue satisfactoria, siendo del 87,7 %.

## 4.2 Niveles de compuestos orgánicos de estaño en muestras de agua de mar superficial

A lo largo de 2014 se obtuvieron un total de 24 muestras de agua de mar superficial. En la **Tabla 4.3** se observan las concentraciones de OTC halladas. El TBT y sus productos de degradación -DBT y MBT- se detectaron en todos los sitios de muestreo

y en todas las estaciones del año. Sin embargo, el compuesto disustituido pudo ser cuantificado sólo en la estación primaveral. Este comportamiento parece ser atribuido al ya mencionado “*bloom* o colapso fitoplanctónico” que caracteriza al estuario de Bahía Blanca en dicho período del año, puesto que este fenómeno puede acelerar la degradación de TBT.

**Tabla 4.3-** Valores de TBT y sus productos de degradación- DBT y MBT- en muestras de agua de mar tomadas en el estuario de Bahía Blanca, expresados en ng Sn L<sup>-1</sup>.

Estaciones del año	Sitios	TBT	DBT	MBT	TBts <sup>a</sup>	BDI
Verano	S1	75,1 ± 2,4	n.c.	315 ± 23	390 ± 23	0,24
	S2	68,4 ± 2,8	n.c.	308 ± 24	376 ± 24	0,22
	S3a	74,9 ± 4,2	n.c.	414 ± 12	489 ± 13	0,18
	S4	65,2 ± 5,1	n.c.	347 ± 20	412 ± 21	0,19
	S5	56,5 ± 4,6	n.c.	308 ± 18	365 ± 19	0,18
	S6	21,4 ± 0,5	n.c.	290 ± 10	311 ± 10	0,07
Otoño	S1	216 ± 19	n.c.	317 ± 18	534 ± 26	0,68
	S2	197 ± 17	n.c.	647 ± 29	843 ± 34	0,30
	S3a	227 ± 15	n.c.	363 ± 19	589 ± 24	0,63
	S4	296 ± 20	n.c.	337 ± 22	633 ± 30	0,88
	S5	186 ± 12	n.c.	414 ± 12	600 ± 16	0,45
	S6	387 ± 25	n.c.	315 ± 8	702 ± 27	1,23
Invierno	S1	105 ± 10	n.c.	455 ± 5	560 ± 11	0,23
	S2	43,5 ± 10,9	n.c.	329 ± 20	372 ± 22	0,13
	S3a	88,5 ± 5,1	n.c.	354 ± 4	443 ± 7	0,25
	S4	47,8 ± 4,2	n.c.	356 ± 16	403 ± 17	0,13
	S5	112 ± 8	n.c.	352 ± 12	464 ± 14	0,32
	S6	88,5 ± 2,4	n.c.	370 ± 10	459 ± 10	0,24
Primavera	S1	22,6 ± 2,4	288 ± 12	289 ± 2	600 ± 12	0,04
	S2	58,2 ± 8,2	333 ± 18	317 ± 17	708 ± 26	0,09
	S3a	54,0 ± 5,6	510 ± 28	303 ± 18	867 ± 34	0,07
	S4	84,8 ± 8,5	358 ± 12	289 ± 7	732 ± 16	0,13
	S5	55,5 ± 3,6	260 ± 13	306 ± 15	622 ± 20	0,10
	S6	46,0 ± 2,2	290 ± 13	294 ± 6	630 ± 14	0,08

Los valores reportados son el promedio de tres replicas junto con su correspondiente desviación estándar. n.c.: No cuantificado. <sup>a</sup>TBts: TBT+DBT+MBT. BDI=[TBT/(DBT+MBT)]



Los niveles de TBT se hallaron entre 21,35 y 386,88 ng Sn L<sup>-1</sup>. Las concentraciones de DBT oscilaron entre 259,91 y 509,61 ng Sn L<sup>-1</sup> mientras que las de MBT se encontraron entre 289,24 y 646,59 ng Sn L<sup>-1</sup>.

En cuanto a las concentraciones de TBT, a partir del Test de Kruskal Wallis, se registró que la estación otoñal difiere significativamente del resto de las estaciones del año ( $p < 0,05$ ), mientras que entre ellas (verano, invierno y primavera) no hay diferencia significativa ( $p > 0,05$ ). Como puede observarse en la **Tabla 4.3**, si bien se ha encontrado TBT en el medio acuático en todas las estaciones del año, los valores más altos TBT se registraron en otoño para todos los sitios de muestro.

La presencia TBT a lo largo del año de muestreo en el agua de mar superficial indica una entrada permanente de este compuesto al estuario de Bahía Blanca. Este comportamiento puede ser atribuido, por un lado, a la principal vía de ingreso de TBT a la columna de agua, es decir, a través de la lixiviación directa de las pinturas antiincrustantes. Por otra parte, a diferencia de otros contaminantes, el proceso de sorción/desorción para los OTC es muy rápido, por lo que cualquier resuspensión de sedimentos contaminados (por ejemplo, por las mareas, tormentas o las actividades de dragado) conduce a una mayor concentración de TBT en la columna de agua. De esta forma, la presencia constante de TBT en las muestras de agua puede ser consecuencia del dragado continuo que se realiza sobre el Canal Principal de navegación, lo que provoca la resuspensión de los sedimentos de fondo. Estos sedimentos, debido a las condiciones anaeróbicas en las que se encuentran, contiene elevados niveles de TBT y, debido a que la adsorción de TBT a partículas del sedimento es un proceso reversible, este compuesto puede ser liberado a la columna de agua (Hoch *et al.*, 2003; Hoch & Schwesig, 2004; Furdek *et al.*, 2012). Esta removilización de sedimentos en conjunto con las corrientes de marea que caracterizan al área de estudio, inciden en el transporte y la recirculación del compuesto trisustituido a lo largo del área de estudio. Si bien el dragado del estuario se realiza con regularidad, particularmente se llevó a cabo el dragado del Canal Principal durante los días próximos al muestreo de otoño. Esto explicaría las concentraciones más elevadas de TBT encontradas en esta estación.

Como puede observarse en la **Tabla 4.3** todas las concentraciones de TBT encontradas en las muestras de agua de mar a lo largo de este estudio son mayores al valor superior de EAC (ver sección 1.1.5), por lo que, ciertos efectos biológicos son altamente probables para las especies más sensibles ubicadas en los sitios de estudio. El

efecto adverso más común causado por la concentración de TBT en gasterópodos, “imposex”, aparece a una concentración de  $1 \text{ ng Sn L}^{-1}$  (Furdek *et al.*, 2012). Si bien no se realizaron estudios de “imposex”, en función de las concentraciones obtenidas de TBT en las muestras de agua, la aparición de esta condición podría estar ocurriendo en las especies que habitan en los sitios de muestreo.

### 4.3 Niveles de compuestos orgánicos de estaño en muestras de material particulado en suspensión (MPS)

Se obtuvieron un total de 24 muestras de MPS a lo largo del año de muestreo, sin embargo por inconvenientes en el CG-MS las muestras correspondientes a los sitios S4 y S5, en invierno, no pudieron ser medidas. De esta forma, se determinaron 22 muestras de MPS. Las concentraciones de TBT oscilaron entre 99,07 y 1695,74  $\text{ng Sn g}^{-1}$  p.s. Los valores del compuesto disustituido se hallaron entre 192,91 y 1967,74  $\text{ng Sn g}^{-1}$  p.s. mientras que, las concentraciones de MBT se encontraron entre valores no cuantificables y 6269,63  $\text{ng Sn g}^{-1}$  p.s. En la **Tabla 4.4** se observan las concentraciones de OTC halladas en las muestras de MPS.

En las muestras de MPS la suma de las concentraciones de los OTC estudiados (TBT+DBT+MBT) son mayores que las encontradas en las muestras de sedimento (**Figura 4.1**). El valor más alto obtenido para muestras de sedimento fue de 1170,32, mientras que para MPS se obtuvo un valor de 7515,71  $\text{ng Sn g}^{-1}$ . Esto ocurre como consecuencia de la gran relación superficie/ volumen que presenta el MPS, que lo convierte en un gran sumidero de contaminantes en el ambiente marino. Los OTC presentes en la columna de agua, debido a su hidrofobia y/o su carga positiva, son adsorbidos rápidamente sobre las fases orgánicas y/o minerales del material particulado en suspensión (Arnold *et al.*, 1997; Berg *et al.*, 2001).

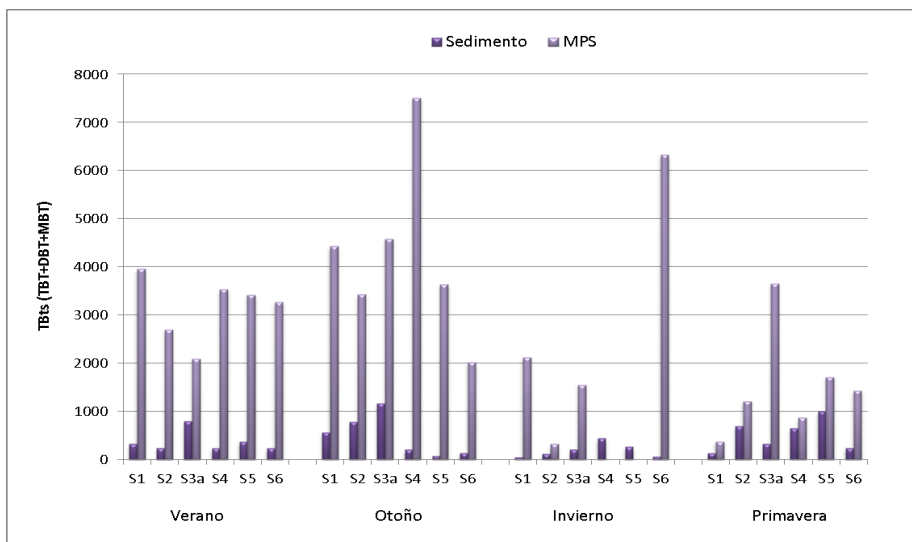
**Tabla 4.4-** Valores de TBT y sus productos de degradación –DBT y MBT– en muestras de MPS tomadas en el estuario de Bahía Blanca, expresados en ng Sn g<sup>-1</sup>p.s.

Estaciones del año	Sitios	TBT	DBT	MBT	TBts <sup>a</sup>	BDI
Verano	S1	850 ± 32	1173 ± 9	1938 ± 29	3961 ± 44	0,27
	S2	1077 ± 24	1628 ± 27	n.c.	2704 ± 36	0,66
	S3a	940 ± 32	1152 ± 14	n.c.	2092 ± 32	0,82
	S4	895 ± 35	1218 ± 47	1425 ± 31	3538 ± 66	0,34
	S5	1209 ± 82	1500 ± 66	718 ± 11	3427 ± 107	0,54
	S6	1406 ± 68	1871 ± 42	n.c.	3277 ± 80	0,75
Otoño	S1	561 ± 23	846 ± 8	3030 ± 27	4436 ± 35	0,14
	S2	534 ± 5	1498 ± 48	1402 ± 88	3434 ± 101	0,18
	S3a	718 ± 46	812 ± 47	3059 ± 67	4589 ± 94	0,19
	S4	438 ± 9	808 ± 42	6270 ± 75	7516 ± 86	0,06
	S5	405 ± 18	622 ± 17	2613 ± 28	3640 ± 37	0,13
	S6	290 ± 28	507 ± 33	1233 ± 33	2030 ± 55	0,17
Invierno	S1	1114 ± 19	1006 ± 64	n.c.	2120 ± 66	1,11
	S2	99,1 ± 9,4	197 ± 14	30,4 ± 4,3	327 ± 17	0,44
	S3a	684 ± 23	876 ± 25	n.c.	1560 ± 34	0,78
	S4	-----	-----	-----	-----	-----
	S5	-----	-----	-----	-----	-----
	S6	844 ± 32	1424 ± 44	4063 ± 109	6332 ± 122	0,15
Primavera	S1	184 ± 15	193 ± 4	n.c.	377 ± 16	0,96
	S2	554 ± 12	667 ± 47	n.c.	1220 ± 48	0,83
	S3a	1696 ± 70	1968 ± 70	n.c.	3663 ± 99	0,86
	S4	394 ± 33	476 ± 42	n.c.	870 ± 53	0,83
	S5	774 ± 31	942 ± 32	n.c.	1716 ± 45	0,82
	S6	710 ± 21	728 ± 45	n.c.	1438 ± 49	0,97

Los valores reportados son el promedio de tres replicas junto con su correspondiente desviación estándar.

n.c.: No cuantificado <sup>a</sup>TBts: TBT+DBT+MBT ---No fueron cuantificados por problemas en el CG-MS.

BDI= TBT/(DBT+MBT)



**Figura 4.1-** Suma de las concentraciones de los compuestos orgánicos de estaño (TBts) en muestras de sedimento y MPS tomadas en 2014, expresadas ng Sn por g<sup>-1</sup>.

#### 4.4 Índice de degradación de TBT en las muestras de agua de mar y MPS

El índice de degradación de butilestaño (BDI), definido por la Ec. 1 (Diez *et al.*, 2002) puede ser utilizado para estimar el nivel de degradación de TBT en cada sitio muestreado.

En las muestras de agua de mar superficial, los valores de BDI obtenidos fueron menores a 1 lo que indicaría que se trata de una contaminación antigua (**Tabla 4.3**). Una excepción a este comportamiento la constituye el sitio S6 (otoño) que, al igual que ocurrió en las muestras de sedimento, presentó un valor de BDI que superó la unidad. Esto sugiere, por un lado, una contaminación reciente de TBT o por otro lado, podría ser el resultado del transporte de sedimentos debido a las corrientes de marea que caracteriza al estuario de Bahía Blanca.

Los valores de BDI registrados para las muestras de MPS se encontraron por debajo de la unidad, indicando que la contaminación a lo largo del año de estudio no es reciente (**Tabla 4.4**), a excepción del sitio S1 (Puerto Rosales), en la estación invernal, donde se obtuvo un valor de 1,22. Esto sugiere una contaminación reciente, la cual puede deberse a que dicho sitio se encuentra próximo a los diques secos, ubicados en Puerto Belgrano, en cuyas instalaciones se llevan a cabo reparaciones de distintas embarcaciones.

De acuerdo con los valores de BDI obtenidos, tanto para muestras de agua de mar como para MPS, se observa que la contribución de TBT al estuario de Bahía Blanca no es reciente y/o se encuentra bajo un proceso de degradación general y probablemente rápido, principalmente producto de una biodegradación ya que es un estuario que se caracteriza por un gran contenido de nutrientes y alta biomasa fitoplanctónica.

#### 4.5 Características fisicoquímicas del medio

Como ya se ha dicho, el TBT, una vez introducido en la columna de agua, se somete a procesos de degradación tanto microbianos como fotolíticos, para dar lugar a sus compuestos menos alquilados (DBT y MBT). Entre otras condiciones ambientales, la luz, la temperatura, los nutrientes y la presencia de ciertos microorganismos influyen en la tasa de degradación de TBT (Seligman *et al.*, 1996; Furdek *et al.*, 2012). Además, ciertos parámetros (pH, salinidad, MOP) pueden influir en la distribución de los compuestos organoestánicos estudiados entre los distintos compartimentos ambientales (Hoch, 2001). Es sabido, que el destino ambiental de los compuestos orgánicos está determinado, en última instancia, por las características fisicoquímicas de cada compuesto y del medio que los contiene (Arias, 2008).

Se analizaron diversas variables con el fin de evaluar el rol de las propiedades fisicoquímicas sobre la distribución de los OTC en el estuario de Bahía Blanca, tanto en las muestras de agua de mar como en las de MPS.

- **pH, temperatura y salinidad**

Estos parámetros (pH, salinidad y temperatura) fueron evaluados y discutidos en el capítulo correspondiente a los sedimentos. Como se ha mencionado a lo largo de esta tesis, la salinidad y el pH del medio son factores importantes para controlar la partición de los OTC entre el sedimento y la columna de agua (Meador, 2000; Hoch *et al.*, 2002) por lo que se esperaba encontrar una correlación significativa. Sin embargo, tanto en las muestras de agua de mar como en las de MPS, no pudo evidenciarse una correlación entre estos parámetros y los analitos estudiados (TBT, DBT, MBT), así como tampoco con la temperatura del medio.

Posiblemente, al igual que en los sedimentos, este hecho obedezca a la interacción de otros factores que influyen en la distribución de los OTC en el estuario (ej. la presencia de microorganismos responsables de la biodegradación). Otra posible razón puede provenir de ingresos adicionales de DBT y MBT al estuario de Bahía Blanca, más allá de la degradación del compuesto trisustituido, que podrían estar sesgando una posible correlación. Estas posibles fuentes de DBT y MBT se han mencionado a lo largo de esta Tesis.

- **Turbidez**

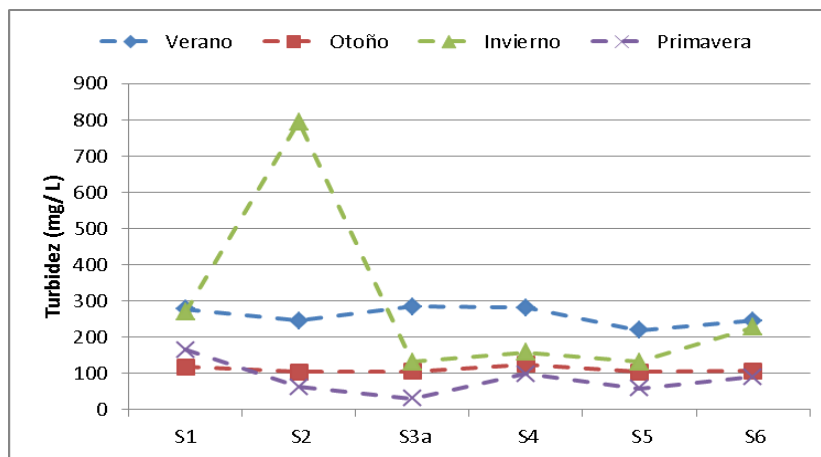
La distribución del material particulado en suspensión (MPS) presentó un comportamiento variable desde el punto de vista estacional. Se observó que, en general, los valores más altos de turbidez se registran en verano y los más bajos en la estación primaveral, oscilando entre 30,7 y 795,4 mg L<sup>-1</sup> (**Figura 4.2**). En el sitio S2 (invierno), correspondiente a la central termoeléctrica, se registró un salto brusco de esta variable fisicoquímica, probablemente como consecuencia de una descarga de efluentes realizada próxima al momento del muestreo.

Como se mencionó en el capítulo 2, el estuario de Bahía Blanca está caracterizado por una elevada turbidez y por tanto los valores registrados son típicos de este ambiente. Esto es resultado, entre otras cosas, de la resuspensión de sedimentos finos (limo-arcillosos) generada por las corrientes de marea semidiurnas, de los vientos predominantes del norte y noroeste, del aporte de las corrientes de agua dulce y, además, del dragado periódico que se realiza en el Canal Principal de Navegación (Piccolo & Perillo, 1990; Marcovecchio & Freije, 2004).

La turbidez generada por la presencia del MPS es un parámetro muy importante de estudio debido a que, como se mencionó anteriormente, representa uno de los sumideros de contaminantes más grandes en el ambiente marino. Además, debido a las corrientes de marea que caracterizan el área de estudio, el MPS es transportado a lo largo de todo el estuario de Bahía Blanca por lo que, es lógico no encontrar grandes diferencias entre los sitios muestreados, a excepción del sitio S2 (otoño) antes mencionado.

A pesar de la importancia de la turbidez en el medio, no se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre esta variable y las concentraciones de TBT, DBT y MBT presentes tanto en las muestras de agua de mar, como en las de MPS

( $p > 0,05$ ). Esta falta de correlación puede ser atribuida a la variabilidad en cuanto a los distintos procesos que dan lugar a la resuspensión de sedimentos en el área de estudio.



**Figura 4.2-** Distribución de la turbidez en los sitios estudiados del estuario de Bahía Blanca, en 2014.

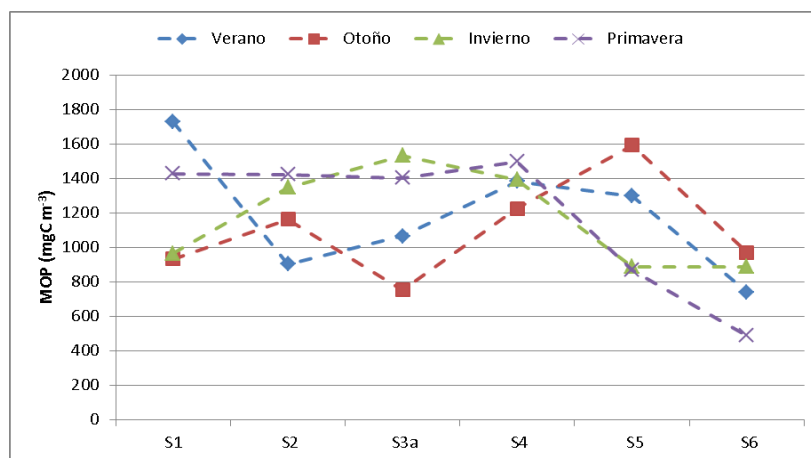
- **Materia orgánica particulada**

El contenido de materia orgánica particulada (MOP) juega un papel importante en el destino, movilidad y disponibilidad de los compuestos orgánicos de estaño en los ecosistemas marino-costeros; de hecho, la materia orgánica ha sido señalada como el componente adsorbente principal de los OTC (Berg *et al.*, 2001).

En la **Figura 4.3** se observa la distribución de la materia orgánica particulada (MOP, expresada en %) para cada sitio de muestreo a lo largo del año de estudio. Los valores oscilaron entre 490 y 1728 mg C m<sup>-3</sup>. El valor más alto de MOP% fue registrado en verano para el sitio S1 (Puerto Rosales) mientras que el valor más pequeño se obtuvo en el S6, en la estación primaveral. Los altos niveles de materiales en suspensión pudieron ser causados por los procesos de resuspensión inducidos por las corrientes de marea (Guinder, 2011). En cuanto a la distribución temporal no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las cuatro estaciones del año evaluadas (Test de Kruskal Wallis,  $p > 0,05$ ). Este comportamiento podría deberse a que existen aportes de MOP (producción fitoplanctónica, degradación de organismos, producción vegetal de las marismas, etc.) así como también, diversos aportes antrópicos (vertido continuo de efluentes domésticos/industriales, distintos cuerpos de agua que desaguan en el sistema,

etc.) que caracterizan al estuario de Bahía Blanca (Fernández Severini, 2008). Esos distintos aportes de MOP no afectan de forma importante en ninguna estación del año.

A pesar del rol importante que desempeña la materia orgánica en la adsorción de los compuestos butilados de estaño, no pudo evidenciarse una correlación estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre MOP% y las concentraciones de los compuestos organoestánicos estudiados (TBT, DBT y MBT). Esta falta de correlación probablemente sea resultado de las numerosas variables que influyen en la concentración de MOP en el estuario, así como también, aquellas variables que intervienen en la distribución de los OTC. Además, la falta de correlación podría ser consecuencia de una posible incorporación DBT y MBT al estuario de Bahía Blanca a partir de diversas fuentes antropogénicas, mencionadas a lo largo de esta Tesis.



**Figura 4.3-** Distribución de MOP en los sitios estudiados del estuario de Bahía Blanca, en 2014.

## 4.6 Distribución de los compuestos orgánicos de estaño

Se empleó el Análisis de Componentes Principales Desplegado (U-PCA), para lograr una mejor visualización en cuanto al comportamiento de los compuestos organoestánicos estudiados, tanto temporal como espacialmente, en muestras de agua de mar y MPS.

### 4.6.1 Muestras de agua de mar superficial



A partir del análisis de U-PCA se identificaron tres componentes principales, los cuales explicaron el 57,3%, el 18,2% y el 10,5 % de la varianza total, respectivamente. Las variables que contribuyen a la varianza recogidas por el modelo son: la turbidez, la MOP y las concentraciones de TBT, DBT y MBT. El resto de las variables estudiadas (salinidad, temperatura y pH) no contribuyen de manera significativa al modelo (**Figuras 4.4 a-c**). El primer componente principal está caracterizado por una contribución positiva y elevada de MOP y, en menor medida, de la concentración de DBT y la turbidez del medio. El segundo factor presenta un componente positivo e importante y corresponde a la concentración de DBT. Simultáneamente, se observa una contribución negativa e importante de la turbidez del medio y, en menor medida, de las concentraciones de MBT y TBT (MBT > TBT). El tercer factor presenta una contribución positiva con respecto a la turbidez del medio y la concentración de DBT (turbidez > DBT). Conjuntamente, presenta una contribución negativa debido a las concentraciones de TBT y MBT (TBT > MBT) y, en menor medida de MOP. Las **Figuras 4.4 d-f** ilustran los gráficos de scores de los primeros tres componentes principales.

En la **Figura 4.4 d** se puede observar que los sitios muestreados en la estación primaveral se posicionan sobre valores positivos de factor 2 debido a que son los únicos sitios para los cuales fue posible la cuantificación de DBT. Por otra parte, valores bajos de factor 2 están atribuidos a valores altos de turbidez. El sitio S2, en invierno, tiene el valor más negativo de este factor ya que presenta la turbidez más elevada de 2014. El resto de las muestras se encuentran distribuidas a lo largo de una línea definida por el vector correspondiente a la MOP, siendo el sitio S1 (verano) el que presenta el mayor contenido de MOP registrado en el año de muestreo.

En las estaciones de verano, otoño e invierno la concentración de DBT no fue lo suficientemente alta como para ser cuantificada, probablemente, debido a que este compuesto se degrada muy rápido en la columna de agua. De los tres OTC estudiados, la vida media más corta se presenta para el DBT, siendo alrededor de 10 días (Ranke & Jastorff, 2000). Particularmente, la estación primaveral se caracterizó por tener los valores más bajos en cuanto a salinidad y turbidez dentro del año de muestreo. Estas variables fisicoquímicas son importantes en los procesos de adsorción/desorción, así como también, en la distribución de los OTC en el medio. Si bien no hay discusiones claras acerca del comportamiento de DBT en el medio estuarino, y a pesar de la falta de correlación ( $p > 0,05$ ) entre dichas variables y el DBT, posiblemente estas características favorezcan la presencia de dicho analito en la columna de agua. Además, la disminución

de la turbidez es uno de los factores asociados al desarrollo de la floración de fitoplancton que caracteriza la zona de estudio (Guinder, 2011), que favorece la degradación biológica de los OTC.

En la **Figura 4.4 e** es posible observar que los sitios correspondientes a la estación otoñal presentan valores negativos y elevados de factor 3. Esto se debe al contenido de TBT que se registró para estos sitios, siendo esta la estación del año en la que se encontró la mayor cantidad de este compuesto. El factor 3 tiene una pequeña contribución de MBT, debido a que no se encontraron fluctuaciones estacionales del compuesto monosustituido a lo largo del año muestreado, por lo que no se aprecia un efecto importante en la figura. Dado que el factor 3 tiene una contribución tanto de DBT como de turbidez, se observa que a valores positivos de factor 3 se ubica el sitio S2 en invierno (alta turbidez) y los sitios muestreados en la estación primaveral (alta concentración de DBT). Los sitios correspondientes a la estación estival se posicionan en valores positivos de factor 3 debido a los altos valores de turbidez registrados en 2014. De la misma manera que en la **Figura 4.4 d**, la distribución que se observa a lo largo del factor 1 se debe al contenido de MOP.

Las concentraciones de MBT encontradas no presentaron diferencias entre las distintas estaciones del año (Test de Kruskal Wallis;  $p > 0,05$ ). Este comportamiento puede ser consecuencia, por un lado, de sus características hidrofílicas por lo que tiende a encontrarse en mayor proporción en la columna de agua (Wang *et al.*, 2008). Por otro lado, puede ser resultado de la baja tasa de degradación que caracteriza a este compuesto. Como se mencionó en el capítulo 2, los compuestos tri y dibutilados se degradan rápidamente en agua de mar, con una vida media que oscila desde unos pocos días a semanas (Ranke & Jastorff, 2000). Por su parte, el MBT no presenta degradación aparente incluso después de 280 días, lo que indica una vida media mucho mayor para el compuesto monosustituido en comparación con la del TBT y DBT (Cima *et al.*, 2003; Seligman *et al.*, 1988, Furdek *et al.*, 2012).

Como se ha observado al inicio de este capítulo, es evidente que hay un ingreso continuo de TBT a lo largo del año de muestreo. Por un lado, probablemente como resultado de la lixiviación directa de las pinturas antiincrustantes. Por otro lado, puede ser consecuencia del dragado periódico que se realiza en el estuario de Bahía Blanca. Gracias a la recirculación de TBT, producto de las corrientes de marea que caracterizan al área de estudio, todos los sitios evaluados fueron impactados con TBT. Las altas

concentraciones de TBT encontradas en otoño, podrían deberse al dragado realizado en esta estación en el Canal Principal.

En la **Figura 4.4 f** se puede visualizar que los sitios muestreados en verano se ubican en el segundo cuadrante debido a los elevados valores de turbidez registrados en esta estación, siendo las más altas de 2014 (observado también en la **Figura 4.4 e**). Como ya se dijo anteriormente, el sitio S2 (invierno) debido a su elevada turbidez se desplaza en concordancia con el vector correspondiente a esta variable. El resto de las muestras, todas correspondientes a la estación primaveral, presentan un corrimiento hacia valores positivos de factor 2, coincidiendo con el vector correspondiente a la concentración de DBT. Esta fue la única estación del año donde el DBT pudo ser cuantificado. La concentración más alta de este compuesto se registró en el sitio S3a. Por otro lado, los sitios en otoño presentan valores negativos de factor 3 dado que poseen los mayores contenidos de TBT en 2014. El sitio S2 (otoño) a pesar de no tener el mayor contenido de TBT aparece con el valor más negativo de factor 3. Esto se debe a que es el único sitio para el que se registró una concentración significativamente elevada de MBT con respecto al resto de los sitios en el año muestreado.

La elevada concentración de DBT encontrada en el sitio S3a, posiblemente sea debido a la ubicación de este sitio en el estuario de Bahía Blanca (zona aislada del canal principal) y a las aguas poco profundas y escasa circulación de las mismas que caracterizan a este sitio. Estas características favorecen la presencia y acumulación de los OTC en este sitio (Lee *et al.*, 2006).

La elevada concentración de MBT encontrada en el sitio S2, otoño, probablemente sea consecuencia de una degradación más rápida de los OTC. Como se ha mencionado anteriormente, debido a la cercanía de este sitio a la central termoeléctrica "Luis Piedra Buena" se ve favorecida la degradación térmica de los OTC, por la presencia de un efluente desde donde se descarga agua a elevada temperatura al estuario (Almeida *et al.*, 2004). Este comportamiento, también, podría ser atribuido a una importante biodegradación de los OTC debido a la cercanía de este sitio a la salida principal de las aguas residuales de la ciudad de Bahía Blanca, donde existe una actividad biológica significativa (Baldini *et al.*, 1999).

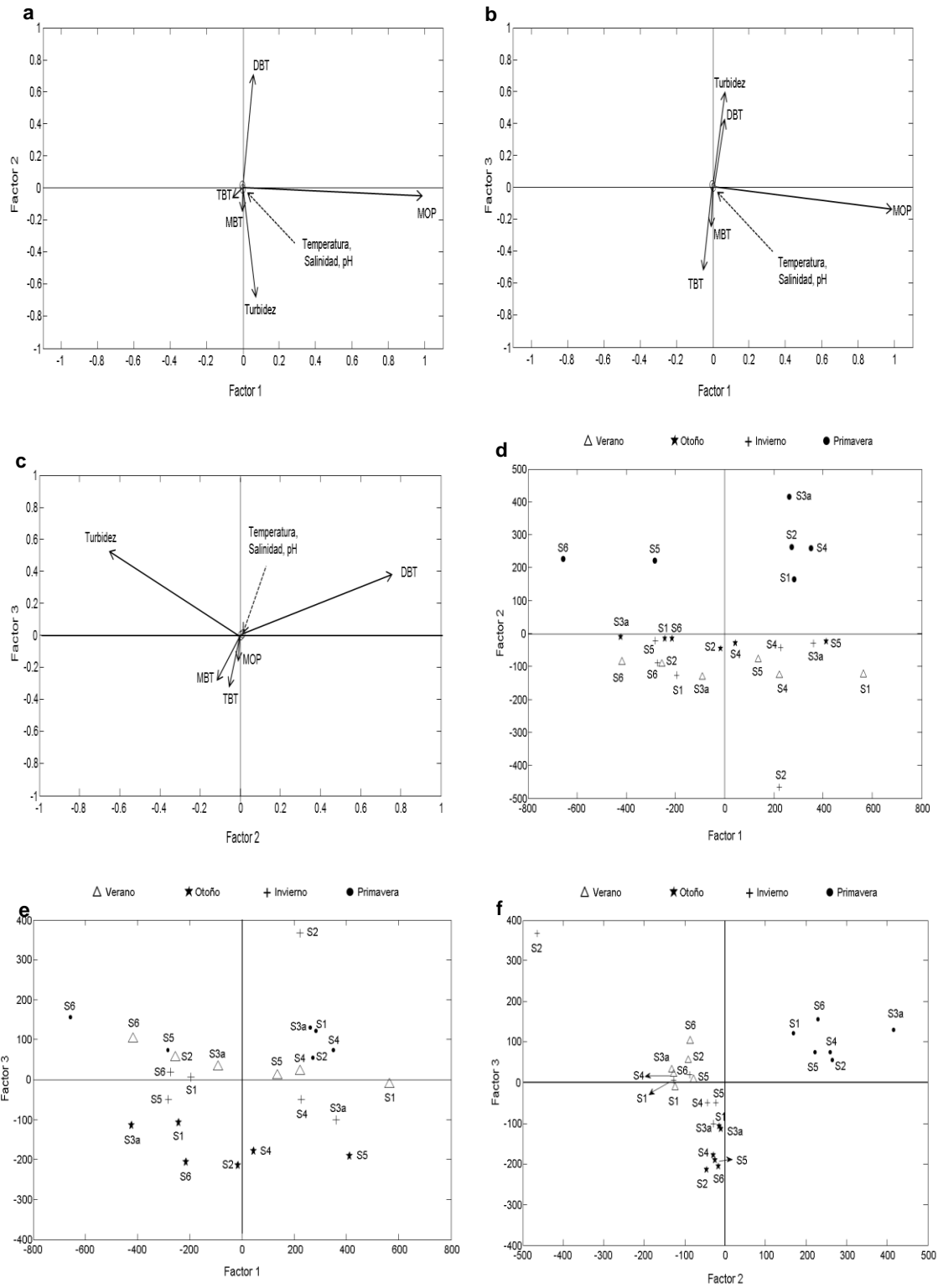


Figura 4.4- a-c Gráficos de *loadings*, d-f gráficos de *scores* para las muestras agua de mar.

- **Conclusiones parciales**

A partir del análisis de U-PCA se pudo observar que la distribución de TBT y sus productos de degradación en las muestras de agua de mar parece estar influenciada por la turbidez y la MOP del medio. Al igual que para las muestras de sedimento, se observa una variación temporal en cuanto a las concentraciones de OTC encontradas. Sin embargo, la presencia de TBT en todas las estaciones del año, muestra un ingreso continuo de este compuesto al estuario de Bahía Blanca ya sea debido a la lixiviación de pinturas anti-incrustantes o del dragado periódico realizado sobre el Canal Principal de navegación. También se pudo constatar que la vida media del DBT parece ser muy pequeña en comparación con el compuesto monosustituido y, nuevamente, se pudo observar la importancia del “*bloom* fitoplactónico” característico del período invierno/primavera.

Finalmente, se observó que toda el área de estudio parece estar impactada por la contaminación de TBT, DBT y MBT, no sólo para aquellos sitios que suponen una magnitud de impacto mayor por ser zonas de intenso tráfico marino. Probablemente este comportamiento sea debido a las corrientes de marea que caracterizan la zona de estudio, así como los procesos de dragado que se realizan periódicamente sobre el Canal Principal.

#### 4.6.2 Muestras de MPS

A partir del análisis de U-PCA (**Figura 4.5**) se identificaron dos componentes principales, los cuales explicaron el 81,8% y el 14,1 % de la varianza total. Las variables que contribuyen a la varianza recogida por el modelo son las concentraciones de TBT, DBT y MBT. El resto de las variables estudiadas (temperatura, turbidez, salinidad, MOP y pH) no presentaron una variabilidad importante (**Figura 4.5 a**). El primer componente principal está caracterizado por una contribución positiva y elevada correspondiente a la concentración de MBT. El segundo factor presenta un componente positivo y elevado con respecto a las concentraciones de TBT y DBT (DBT > TBT).

La **Figura 4.5 b** ilustra el gráfico de *scores* de los primeros dos componentes principales. Como puede observarse, los sitios de muestreo en la estación otoñal, se posicionan sobre valores positivos de factor 1 coincidiendo con concentraciones elevadas de MBT. Estas concentraciones son las más altas encontradas en 2014 para todos los sitios de estudio, a excepción del sitio S6 (invierno). Todos los sitios se ubican sobre valores negativos de factor 2 a excepción del sitio S2 que se encuentra en el primer cuadrante debido a su alta

concentración de DBT (entre dos y tres veces superior al resto de los sitios de esa misma estación).

La elevada concentración de MBT encontrada en otoño puede ser resultado de una rápida degradación del TBT y DBT liberados a la columna de agua a través de la movilización de sedimentos ocasionada por el dragado del Canal Principal (Hoch, 2001). El MBT en la columna de agua presenta una velocidad de degradación lenta y, consecuentemente, se acumula en la columna de agua.

La elevada concentración de DBT encontrada en el sitio S2 (cercano a la central termoeléctrica "Luis Piedra Buena") puede ser consecuencia de una degradación rápida del TBT. Por un lado, posiblemente debido a una mayor temperatura del agua en el momento en que se realizan las descargas puntuales de efluentes de la central (Almeida *et al.*, 2004). Por otro lado, puede ser resultado de la biodegradación de los OTC por parte de microorganismos presentes en las aguas residuales de la ciudad de Bahía Blanca (Baldini *et al.*, 1999).

Todos los sitios que presentan una concentración muy baja de MBT (o no cuantificable) se posicionan en una línea paralela al eje del factor 2. Estos sitios se diferencian entre sí por su contenido de TBT y DBT posicionándose las de mayor concentración sobre valores positivos de factor 2. De esta manera, en verano, los sitios se ubican en el segundo cuadrante, a excepción de los sitios S1 y S4 (primer cuadrante) que, además de tener un alto valor de TBT/DBT, también tienen un elevado contenido de MBT. También en el segundo cuadrante se encuentran los sitios S1 en invierno y S3a en primavera, siendo este último el de mayor contenido de TBT y DBT de todos los sitios muestreados en esta estación del año. En invierno y primavera, el resto de los sitios presentan valores negativos de factor 2 coincidentes con valores más bajos de TBT y DBT (cuarto cuadrante).

Como se observa en la **Figura 4.5 b**, en verano se encuentran los mayores valores de TBT y DBT. Esta estación se caracteriza por la presencia de numerosas embarcaciones, tanto de recreación como comerciales, que se trasladan a lo largo del estuario de Bahía Blanca por lo que son esperables altos valores de TBT. Las concentraciones de DBT encontradas en esta estación también son elevadas y parece existir una cierta correlación con los valores de TBT (coeficiente de Spearman:  $r=0,70$ ;  $p<0,05$ ). Sin embargo, este valor de correlación no es tan elevado como para suponer que todo el DBT presente proviene de la degradación de TBT. Esto sugiere que pueden existir ingresos adicionales de DBT. Como se comentó anteriormente, el DBT es uno de

los compuestos utilizado en la estabilización del PVC, material empleado para las tuberías de agua potable, de aguas residuales y de agua de drenaje, por lo que la lixiviación de DBT de los tubos de PVC al medio es otra posible fuente de ingreso de este compuesto (Hoch, 2001), además de los efluentes de la industria del PVC ya mencionados.

En el sitio S1 en invierno se registraron elevados contenidos de TBT y DBT. El alto contenido de TBT, probablemente sea resultado de la cercanía de este sitio a Puerto Belgrano (diques secos) y esta podría ser la razón por la cual S1 es el único sitio muestreado en el que la concentración de TBT es más elevada que la del compuesto disustituido.

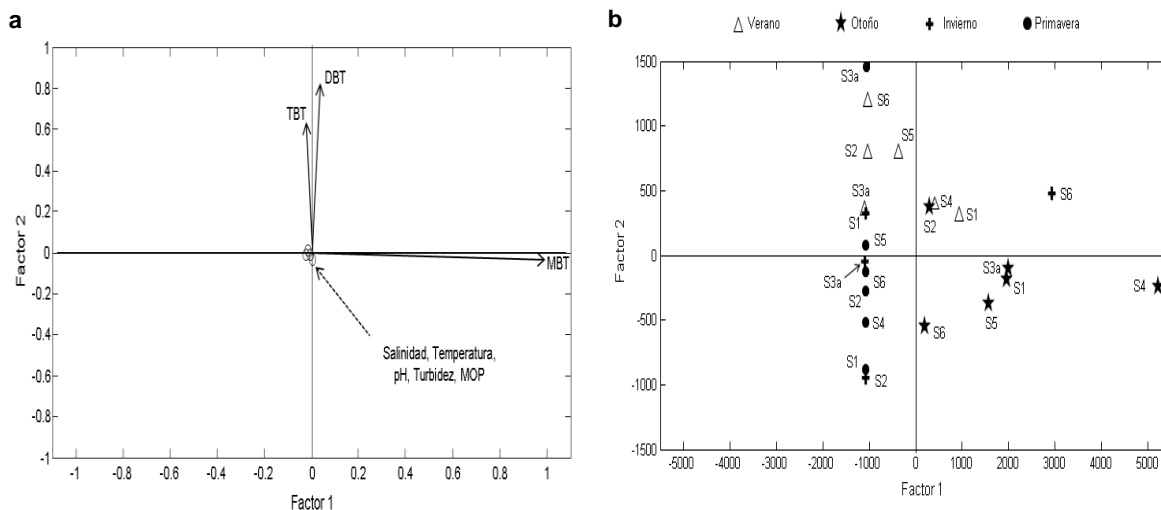
La elevada concentración de TBT encontrada en el sitio S3a, posiblemente sea debido a las numerosas embarcaciones de pesca y recreación que caracterizan este sitio de estudio. La adsorción de TBT y DBT en el MPS se ve favorecida por las características de este sitio dentro del estuario de Bahía Blanca (ubicación en una zona aislada del canal principal, aguas poco profundas y escasa circulación de las mismas) (Lee *et al.*, 2006). La correlación obtenida entre ambos compuestos (TBT y DBT) indicaría que la concentración de DBT encontrada proviene principalmente, de la degradación del compuesto trisustituido (coeficiente de Spearman:  $r=0,80$ ;  $p<0,05$ ). Este sitio parece estar impactado con los OTC en todo el año de muestreo.

En primavera el porcentaje de TBT tiende a disminuir, posiblemente producto de una importante degradación biológica como resultado del “*bloom* fitoplanctónico” característico en los meses de agosto y septiembre. La correlación que existe entre las concentraciones de TBT y DBT, en esta estación del año, confirma que los valores encontrados del compuesto disustituido proviene de la degradación de su correspondiente trisustituido (coeficiente de Spearman:  $r=0,99$ ;  $p<0,05$ ).

En el primer cuadrante se ubican los sitios que contienen altas concentraciones de los tres compuestos estudiados (TBT, DBT y MBT). Estos son los sitios S1 y S4 de verano, S2 de otoño y S6 en invierno. Las características del sitio S2 (otoño) ya fueron comentadas anteriormente. Las elevadas concentraciones de TBT encontradas en la estación estival en los sitios S1 y S4, probablemente, sean resultado de la presencia de numerosas embarcaciones comerciales que caracteriza a ambos sitios de estudio, ya que ambos son importantes puertos dentro del área de estudio. Además, en cercanía al sitio S1 se realizan descargas de aguas residuales de la ciudad de Punta Alta que podría dar lugar a elevadas concentraciones de DBT y MBT originadas por la biodegradación de

TBT. El sitio S4 se ubica en un centro industrial y en cercanía a la descarga colectora de efluentes industriales, que origina posibles fuentes de MBT y DBT.

Finalmente, las elevadas concentraciones de OTC observadas en el sitio S6 (invierno), probablemente, sean producto de las corrientes de marea, que provocan la llegada de contaminantes a sitios alejados de las fuentes principales de estos compuestos.



**Figura 4.5-** a Gráfico de *loadings*, b gráfico de *scores* para las muestras de MPS.

- **Conclusiones parciales**

A partir del análisis de U-PCA se pudo observar que las concentraciones de TBT, DBT y MBT en las muestras de MPS no parecen estar influenciadas por alguna de las variables o parámetros discutidos anteriormente. Al igual que el resto de las muestras estudiadas, se observa una variación temporal en cuanto a las concentraciones de OTC encontradas a lo largo del año muestreado. Desde un punto de vista espacial no se observó una tendencia clara sino que toda el área de estudio parece estar impactada por la contaminación de los OTC estudiados.

Otra vez, parece ser importante la degradación biológica que sufre el TBT, principalmente en el período invierno/primavera donde se produce el “*bloom* o colapso fitoplanctónico” característico del Estuario de Bahía Blanca. Finalmente, a lo largo de toda el área de estudio, parecen existir diversas fuentes adicionales de DBT y MBT más allá de la degradación del TBT. Estas fuentes parecen provenir, principalmente, de la lixiviación



de MBT y DBT desde tuberías de PVC (como las tuberías de agua potable, de aguas residuales y de agua de drenaje) y de efluentes industriales.

---

## CAPÍTULO 5: COMPUESTOS ORGANOESTÁNNICOS EN MEJILLINES

### 5.1 Optimización de la etapa de limpieza de los extractos

El proceso de “*clean-up*” o limpieza de los extractos, empleado en las muestras de mejillines, se optimizó evaluando el tipo de adsorbente a utilizar y el volumen de eluyente empleado.

En primer lugar, se estudió el uso de distintos adsorbentes: florisil, silica gel y alúmina básica, ácida y neutra, así como también, la combinación de los mismos. Los adsorbentes fueron previamente calcinados a 450°C durante varias horas. En suma a la deshidratación a 200°C durante varias horas realizada anteriormente a la construcción de las columnas. En la **Tabla 5.1** se muestra los diferentes adsorbentes empleados y la masa utilizada, así como también un breve comentario sobre los resultados respecto de la determinación de los compuestos organoestánnicos de interés. Se optó por emplear silica gel como adsorbente debido a que permitió obtener señales cromatográficas claramente definidas para los tres analitos en cuestión (TBT, DBT y MBT).

En segundo lugar, se analizó el volumen óptimo de hexano, utilizado como eluyente. Se seleccionó este disolvente debido a que también se empleó para extraer los compuestos derivatizados. Para ello se usaron cantidades variables del mismo entre 1 y 6 mL empleando una columna de silica gel como adsorbente. Se observó que, a medida que el volumen de hexano aumentaba, también lo hacía la concentración de los analitos extraídos de la columna, pero a partir del uso de 4 mL los resultados fueron similares, por lo que se optó por utilizar 4 mL de hexano para la elución.

**Tabla 5.1-** Adsorbentes estudiados para llevar a cabo la limpieza de los extractos en las muestras de mejillines.

Adsorbente	Masa (g)	Observaciones
Florisil	1	Señales cromatográficas definidas para TBT, DBT y MBT
Silica gel	1	Señales cromatográficas definidas y más altas para los tres analitos de interés
Alúmina neutra	2	Señales cromatográficas pequeñas para DBT y MBT. Cromatograma con baja relación señal/ruido
Alúmina básica	2	Señales cromatográficas extremadamente pequeñas para DBT y MBT
Alúmina ácida	2	Señales cromatográficas extremadamente pequeñas para DBT y MBT
Silica gel + Alúmina neutra	0,5-1	Elución muy lenta. Señales cromatográficas pequeñas para los tres analitos
Silica gel + Alúmina básica	0,5-1	Señales cromatográficas poco definidas para DBT y MBT
Silica gel + Alúmina ácida	0,5-1	Señales cromatográficas poco definidas para DBT y MBT
Alúmina neutra y básica	1-1	Sólo se obtuvo una señal cromatográfica para TBT
Alúmina neutra y ácida	1-1	Sólo se obtuvo una señal cromatográfica para TBT.
Alúmina ácida y básica	1-1	Señales cromatográficas extremadamente pequeñas para DBT y MBT.

## 5.2 Parámetros analíticos de los métodos propuestos: UNEP modificado y US

En la **Tabla 5.2** se observan las cifras de mérito obtenidas para las muestras de mejillín *Brachidontes rodriguezii*, al aplicar, al igual que para las muestras de sedimentos, los métodos UNEP modificado y asistido por US.

En primer término, se evaluó la sensibilidad analítica y, como puede observarse, fue mucho mayor para los tres analitos en cuestión (TBT, DBT y MBT) cuando se aplicó la energía de US en lugar de la agitación convencional (agitador orbital). Los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) obtenidos fueron similares en ambos métodos, oscilando entre 0,995 y 0,999. La evaluación de linealidad se realizó aplicando la prueba de ANOVA, y no se observó falta de ajuste al modelo lineal ( $p > 0,30$ ).

Otra de las características analíticas evaluadas fueron los límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ). Estos límites se calcularon teniendo en cuenta la relación señal/ruido:  $S/N = 3$  y  $S/N = 10$ , respectivamente. El método de referencia para los estudios de la contaminación marina (UNEP/IOC/IAEA, 1994) informó que los límites de detección para TBT, DBT y MBT fueron 5, 10 y 20 ng Sn g<sup>-1</sup> p.s., respectivamente. Con las modificaciones realizadas en el método de referencia se lograron límites de detección más bajos: 1,7; 1,9 y 4,5 ng Sn g<sup>-1</sup> p.s. para TBT, DBT y MBT, respectivamente. Mediante la aplicación de US se lograron disminuir aún más dichos valores: 1,2; 1,8 y 3,0 ng Sn g<sup>-1</sup> p.s. de TBT, DBT y MBT, respectivamente.

**Tabla 5.2-** Cifras de mérito para la determinación de los compuestos orgánicos de estaño mediante GC-MS.

Método	Analito	Intervalo lineal de trabajo	$y = b_0 + b_1 x$		R <sup>2</sup>	LOD	LOQ
			b <sub>0</sub> (S <sub>b0</sub> )	b <sub>1</sub> (S <sub>b1</sub> )			
US	TBT	9,7-1000	-0,756 (0,100)	24,439 (1,153)	0,998	1,2	5,8
	DBT	10,0-1000	-0,022 (5 E-3)	7,040 (0,327)	0,997	1,8	6,0
	MBT	17,6-1000	-0,241 (0,023)	4,910 (0,012)	0,999 <sub>5</sub>	3,0	10,6
UNEP modificado	TBT	9,4-1000	0,018 (4 E-3)	0,156 (7 E-3)	0,997	1,7	5,6
	DBT	10,5-1000	0,021 (4 E-3)	0,427 (0,015)	0,999 <sub>4</sub>	1,9	6,3
	MBT	25,1-1000	0,002 (3 E-4)	0,095 (2 E-3)	0,995	4,5	15,0

Intervalo lineal de trabajo (ng Sn mL<sup>-1</sup>); b<sub>0</sub>: ordenada al origen; b<sub>1</sub>: pendiente; S<sub>b0</sub>: desviación estándar de la ordenada al origen; S<sub>b1</sub>: desviación estándar de la pendiente; LOD-LOQ (ng Sn g<sup>-1</sup>p.s.); p.s.: peso seco

Para estimar la veracidad y precisión de los métodos estudiados, y debido a que no se contaba con un material de referencia certificado, se realizaron agregados conocidos sobre muestras de mejillines previamente liofilizadas y almacenadas a temperatura ambiente. A estas muestras se agregaron concentraciones conocidas de TBT, DBT y MBT, y fueron tratadas de igual manera que las muestras de mejillines analizadas.

La veracidad de los métodos se evaluó en términos de recuperación. Para cada concentración conocida fueron analizadas seis muestras y su promedio se presenta en la **Tabla 5.3**. De acuerdo a las recomendaciones de validación analítica (Eurachem, 1998; IUPAC, 2002) los valores aceptables de recuperación se encuentran entre el 70 y 120%. Como puede observarse, las recuperaciones obtenidas variaron entre 87% y 108% para

el método que emplea US y entre 85% y 110% para UNEP modificado; encontrándose en conformidad con las recomendaciones de validación analítica.

La precisión se evaluó en condiciones de repetitividad y se estimó como DER% (desviación estándar relativa porcentual). Al igual que en las muestras de sedimento, se observa que dicho parámetro analítico es mejor al aplicar US en lugar de agitación convencional. De todas formas, todos los resultados se encontraron en conformidad con las recomendaciones de validación de análisis (Eurachem, 1998; IUPAC, 2002), es decir, por debajo de 20% (**Tabla 5.3**).

**Tabla 5.3-** Porcentajes de recuperación (%) obtenidos en mejillines con agregados conocidos de MBT, DBT y TBT mediante la aplicación de ambos métodos.

Analito	Concentración adicionada (ng Sn g <sup>-1</sup> p.s.)	Obtenidos			
		US	% recuperación	UNEP modificado	% recuperación
TBT	10	10,3 (6,3)	96	9,3 (11,3)	89
	100	95,3 (0,9)	108	117,4 (3,8)	101
	1000	1013 (2,3)	92	803 (9,8)	95
DBT	10	10,9 (2,0)	87	10,6 (12,4)	85
	100	100,7 (4,0)	105	97,2 (16,7)	110
	1000	996 (1,0)	98	617 (1,8)	104
MBT	10	9,83 (3,1)	103	10,23 (5,3)	91
	100	110,5 (4,9)	96	112,3 (18,1)	105
	1000	912 (7,1)	85	840 (9,5)	88

DER% está incluida entre paréntesis. p.s.: peso seco; n=6

Al igual que para el resto de las muestras estudiadas, se evaluó la eficacia en la extracción de los analitos. Para ello, a muestras de mejillines liofilizadas se le adicionaron concentraciones conocidas de TeBT y las mismas se sometieron a ambos procedimientos analíticos (UNEP modificado y US) utilizando TPrT como estándar interno. De esta forma, sólo se evaluó la etapa de extracción debido a que el TeBT no sufre el proceso de derivatización. Las recuperaciones obtenidas fueron del 100% para el método basado en US y 98,7% para el método UNEP modificado. Nuevamente, queda en evidencia la aplicación de agitación orbital y ultrasónica resultan comparables en la etapa de extracción. De esta forma, podría suponerse que los porcentajes de recuperación obtenidos para cada analito (TBT, DBT y MBT) aplicando ambos métodos dependen del proceso de derivatización, y no así de la etapa de extracción.

Si bien la eficiencia de extracción fue satisfactoria para ambos métodos, a partir de todos los parámetros analíticos analizados, podemos observar que mediante la aplicación de US se logró mayor sensibilidad analítica, límites de detección más bajos, menores valores de DER% y, en general, mayores porcentajes de recuperación para los tres analitos estudiados. Por lo tanto, al igual que para las muestras de sedimento, se empleó un baño de US para llevar a cabo el pretratamiento de la muestra, en lugar de un agitador orbital.

### 5.3 Niveles de compuestos orgánicos de estaño en muestras de mejillines

A lo largo del período de muestreo se obtuvieron un total de 47 muestras de mejillines *Brachidontes rodriguezii*. TBT y sus productos de degradación fueron detectados en todas las estaciones del año. En 2013, se recolectaron un total de 23 muestras, ya que en otoño en el sitio S4 (Posta de Inflamables) todas las valvas de mejillines se encontraron vacías. En las **Tablas 5.4 y 5.5** se resumen las concentraciones de OTC halladas durante el período de muestreo. En 2013, las concentraciones de TBT oscilaron entre 1,27 y 66,53 ng Sn g<sup>-1</sup> p.s. mientras que, los niveles del primer producto de degradación (DBT) se encontraron entre 2,64 y 132,59 ng Sn g<sup>-1</sup> p.s. Los niveles de MBT oscilaron desde valores no cuantificables hasta 74,21 ng Sn g<sup>-1</sup> p.s. En 2014, las concentraciones de los compuestos orgánicos de estaño analizados oscilaron entre valores no cuantificables hasta 117,98; 129,79 y 51,35 ng Sn g<sup>-1</sup> p.s. para TBT, DBT y MBT, respectivamente.

Como puede observarse en las **Tablas 5.4 y 5.5** todos los sitios estudiados en verano durante 2013 y los sitios S2, S4 y S5 en primavera en el segundo año de muestreo, mostraron concentraciones inferiores al límite EAC más bajo (ver sección 1.1.6), por lo que no es esperable que los mejillines estudiados sufran efectos crónicos (**Figura 5.1**). Sólo en 2014 se encontraron sitios donde la concentración de TBT fue superior al nivel EAC más alto establecido por OSPAR, por lo que es altamente probable encontrar ciertos efectos biológicos crónicos para los mejillines ubicados en estos sitios de estudio. Los sitios involucrados fueron S5 (verano), S3a (otoño) y S1 (invierno). La elevada concentración de TBT en el sitio S1 probablemente sea resultado de la cercanía de dicho sitio a Puerto Belgrano (diques secos). En los sitios S3a y S5, se observan constantemente un gran número de embarcaciones de pesca y recreación por lo que es

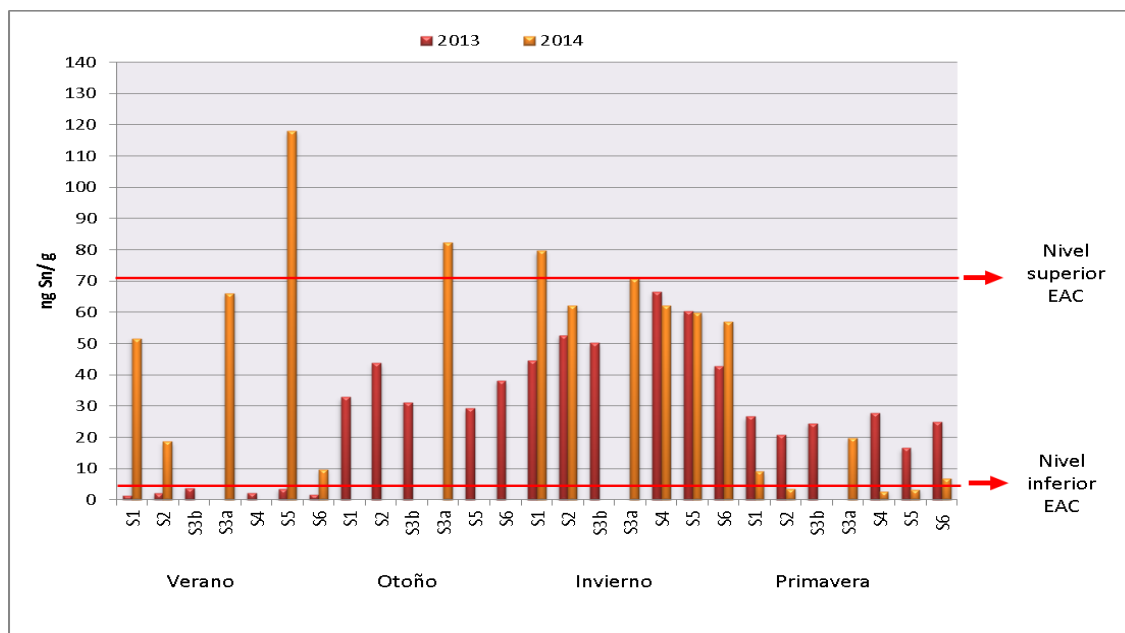
probable que se encuentren altas concentraciones de TBT en el medio, disponibles para ser bioacumuladas por los mejillines.

**Tabla 5.4-** Valores de TBT y sus productos de degradación en muestras de mejillines *Brachidontes rodriguezii*, tomadas en 2013, expresados en ng Sn g<sup>-1</sup> p.s.

Estaciones del año	Sitios	TBT	DBT	MBT	TBts <sup>a</sup>	BDI
Verano	S1	1,27 ± 0,12	3,40 ± 0,10	15,0 ± 1,0	19,6 ± 1,1	0,07
	S2	2,05 ± 0,15	2,67 ± 0,56	17,1 ± 1,5	21,8 ± 1,6	0,10
	S3b	3,71 ± 0,50	7,00 ± 1,25	17,7 ± 0,9	28,4 ± 1,6	0,15
	S4	2,24 ± 0,40	4,66 ± 0,47	17,3 ± 0,8	24,2 ± 1,0	0,10
	S5	3,49 ± 0,17	4,50 ± 0,60	17,3 ± 0,2	25,3 ± 0,6	0,16
	S6	1,67 ± 0,17	2,64 ± 0,46	17,1 ± 0,3	21,4 ± 0,6	0,08
Otoño	S1	32,9 ± 6,8	24,9 ± 0,1	74,2 ± 16,1	132 ± 17	0,33
	S2	43,8 ± 1,0	24,8 ± 0,9	53,5 ± 4,1	122 ± 5	0,56
	S3b	31,2 ± 2,0	33,1 ± 1,9	62,1 ± 5,2	126 ± 6	0,33
	S4	-	-	-	-	-
	S5	29,3 ± 2,6	41,4 ± 0,7	56,6 ± 5,0	127 ± 6	0,30
	S6	38,2 ± 3,6	50,1 ± 5,1	55,7 ± 4,1	144 ± 7	0,36
Invierno	S1	44,7 ± 4,7	49,4 ± 2,1	n.c.	94,1 ± 5,1	0,90
	S2	52,7 ± 0,2	90,1 ± 5,9	9,39 ± 0,84	152 ± 6	0,53
	S3b	50,2 ± 3,1	73,0 ± 4,0	36,7 ± 2,7	160 ± 6	0,46
	S4	66,5 ± 1,1	80,3 ± 1,5	8,18 ± 1,02	155 ± 2	0,75
	S5	60,4 ± 5,7	91,8 ± 0,8	8,50 ± 0,98	161 ± 6	0,60
	S6	42,8 ± 4,5	73,9 ± 6,4	n.c.	117 ± 8	0,58
Primavera	S1	26,7 ± 4,2	73,9 ± 8,6	36,2 ± 3,0	137 ± 10	0,24
	S2	20,7 ± 0,8	42,5 ± 3,4	47,2 ± 2,0	110 ± 4	0,23
	S3b	24,5 ± 2,7	58,8 ± 6,7	33,1 ± 2,9	116 ± 8	0,27
	S4	27,8 ± 2,3	132 ± 2	20,2 ± 2,3	181 ± 4	0,18
	S5	16,6 ± 3,8	21,4 ± 0,1	17,6 ± 1,6	55,6 ± 4,1	0,43
	S6	25,0 ± 4,3	130 ± 4	20,4 ± 2,0	175 ± 6	0,17

Los valores reportados son el promedio de tres réplicas junto con su correspondiente desviación estándar. n.c.: No cuantificado; -: ausencia de muestras; <sup>a</sup>TBts: TBT+DBT+MBT; BDI=[TBT/(DBT+MBT)]

De cualquier manera, en la mayoría de los casos estudiados, se considera que los mejillines *Brachidontes rodriguezii* se encuentran bajo posibles efectos biológicos agudos asociados a la contaminación organoestánnica ya que los niveles de TBT encontrados se ubicaron entre los valores de EAC inferior y superior. Sin embargo, hace falta una comprobación biológica de la ocurrencia de estas manifestaciones para confirmarlo.



**Figura 5.1-** Patrón de contaminación basado en la concentración de TBT, de acuerdo a la clasificación de la Comisión OSPAR (OSPAR 2004).



**Tabla 5.5-** Valores de TBT y sus productos de degradación en muestras de mejillines *Brachidontes rodriguezii*, tomadas en 2014, expresados en ng Sn g<sup>-1</sup> p.s.

Estaciones del año	Sitios	TBT	DBT	MBT	TBts <sup>a</sup>	BDI
Verano	S1	51,6 ± 1,6	99,2 ± 10,0	22,3 ± 3,0	173 ± 10	0,42
	S2	18,6 ± 0,7	60,8 ± 2,6	n.c.	79,3 ± 2,6	0,29
	S3a	66,1 ± 2,7	93,2 ± 2,6	n.c.	163 ± 4	0,68
	S4	n.c.	20,7 ± 0,9	51,4 ± 2,1	72,0 ± 2,2	-
	S5	118 ± 1	52,1 ± 1,9	19,4 ± 0,6	190 ± 2	1,65
	S6	9,66 ± 0,04	22,9 ± 0,9	n.c.	32,6 ± 0,9	0,37
Otoño	S1	n.c.	n.c.	22,6 ± 2,4	22,6 ± 2,4	-
	S2	n.c.	n.c.	19,1 ± 1,4	19,0 ± 1,4	-
	S3a	82,4 ± 0,8	n.c.	37,0 ± 3,9	119 ± 3,9	2,12
	S4	n.c.	n.c.	17,7 ± 1,8	17,7 ± 1,3	-
	S5	n.c.	n.c.	16,9 ± 2,1	16,9 ± 2,1	-
	S6	n.c.	n.c.	17,7 ± 0,3	17,7 ± 0,3	-
Invierno	S1	79,7 ± 8,3	77,0 ± 8,1	47,8 ± 4,0	204 ± 12	0,64
	S2	62,1 ± 8,9	100 ± 4	41,0 ± 2,0	203 ± 10	0,44
	S3a	70,8 ± 6,7	64,5 ± 0,4	14,4 ± 1,0	150 ± 7	0,90
	S4	62,1 ± 3,1	79,3 ± 11,0	14,0 ± 1,1	155 ± 11	0,67
	S5	59,9 ± 1,2	51,8 ± 2,4	29,3 ± 2,1	141 ± 3	0,74
	S6	57,1 ± 4,7	55,0 ± 2,1	18,6 ± 1,7	131 ± 6	0,78
Primavera	S1	9,11 ± 0,73	24,0 ± 3,0	17,5 ± 3,4	50,6 ± 4,6	0,22
	S2	3,48 ± 0,17	8,17 ± 0,90	17,3 ± 0,2	29,0 ± 1,0	0,14
	S3a	19,6 ± 0,8	14,0 ± 2,9	17,7 ± 1,1	51,3 ± 3,2	0,62
	S4	2,54 ± 0,02	4,94 ± 0,87	18,0 ± 0,8	25,4 ± 1,2	0,11
	S5	3,30 ± 0,06	4,75 ± 0,86	18,3 ± 0,4	26,4 ± 1,0	0,14
	S6	6,80 ± 0,59	11,4 ± 0,7	18,3 ± 1,2	36,5 ± 1,5	0,23

Los valores reportados son el promedio de tres réplicas junto con su correspondiente desviación estándar; n.c.: No cuantificado; <sup>a</sup>TBts: TBT+DBT+MBT; BDI=[TBT/(DBT+MBT)]

#### 5.4 Índice de degradación de TBT

En cuanto a muestras biológicas, sólo se ha empleado el índice de degradación de butilestaño (BDI) en gasterópodos (Ruiz *et al.*, 2008) y en mejillones (Kim *et al.*, 2008). El BDI se define de la misma manera que para muestras de sedimento (ver Ec. 1), (Diez *et al.*, 2002), y puede ser utilizado para estimar el grado de degradación de TBT en cada sitio muestreado.

Si bien los valores de BDI hallados oscilan entre 0,06 a 2,12 (**Tablas 5.4 y 5.5**), en su mayoría se considera que el TBT corresponde a ingresos antiguos al estuario de Bahía Blanca. En general, se encontraron valores más pequeños en 2013 que en 2014. Los valores de BDI obtenidos en las muestras de mejillines son mayores que los correspondientes a la muestras de sedimento en cada sitio de muestreo, mostrando un predominio de TBT sobre sus compuestos de degradación en las muestras biológicas. Este comportamiento confirma la gran capacidad para acumular TBT que presentan estos moluscos bivalvos (Fent, 1996b) y la aparente limitada capacidad de los *Brachidontes rodriguezii* para metabolizar TBT a sus productos de degradación (Lee, 1996; Barroso *et al.*, 2004, Diez *et al.*, 2005).

En el sitio S3a, en general, se registraron los valores más altos de BDI dentro de cada estación de año, llegando a 2,12 en otoño. Esto indica que el ingreso de TBT parece ser habitual en este sitio donde precisamente se observan, de manera regular, numerosas embarcaciones de pesca y recreación.

## 5.5 Características de las muestras estudiadas

Las especies filtradoras, como los mejillines, son los organismos más empleados como bioindicadores debido a que muestran una elevada capacidad de acumular OTC en proporción directa a los niveles ambientales (Zhou *et al.*, 2003; Harino *et al.*, 2005; Kucuksezgin *et al.* 2011). Sin embargo, la bioacumulación de TBT y sus compuestos de degradación, está fuertemente influenciada por diversos factores ambientales tales como la ubicación del sitio de muestreo, la temperatura y salinidad del agua, así como la actividad biológica del medio (Diez *et al.*, 2005; Sousa *et al.*, 2009b). Ciertos parámetros fisicoquímicos (tales como, pH, turbidez, temperatura y salinidad) son importantes para controlar la solubilidad de los OTC en el medio acuático y con ello la disponibilidad de estos compuestos para los moluscos bivalvos en estudio (Inaba *et al.*, 1995).

La discusión sobre la variabilidad de los parámetros estudiados (temperatura, salinidad y pH) a lo largo del período de muestreo (2013-2014) se realizaron en el Capítulo 3. A pesar de la importancia de estas variables, no se han encontrado correlaciones estadísticamente significativas entre las concentraciones de TBT, DBT y MBT presentes en las muestras de mejillines estudiadas y las distintos parámetro fisicoquímicos del medio ( $p > 0.05$ ). Esta falta de correlación, al igual que en las muestras

---

de sedimento, probablemente sea resultado de la presencia de otras variables que influyen en la distribución de los OTC en el estuario, como la presencia de microorganismos responsables de la biodegradación. Además, posibles ingresos adicionales de DBT y MBT en el estuario de Bahía Blanca podrían estar sesgando una posible correlación. Estas distintas fuentes son mencionadas a lo largo de toda la Tesis.

- **Índice de condición**

El índice de condición (IC) es un parámetro fisiológico que se emplea para caracterizar la aparente "salud" de un organismo (funcionalidad de su crecimiento, reproducción, secreción, etc.) bajo ciertas condiciones ambientales (Lucas & Beningerl, 1985). El IC se calculó mediante la siguiente ecuación (Freeman, 1974; Crosby & Gale, 1990; Orban *et al.*, 2002):  $IC (\%) = (\text{peso de tejido seco} / \text{peso seco de las valvas}) \times 100$ . Existen diversas ecuaciones para determinar el IC pero la fórmula planteada es recomendada por la mayoría de los autores, debido a que involucra variables estables y fácilmente medibles (Davenport & Chen, 1987 Lucas & Beninger, 1985).

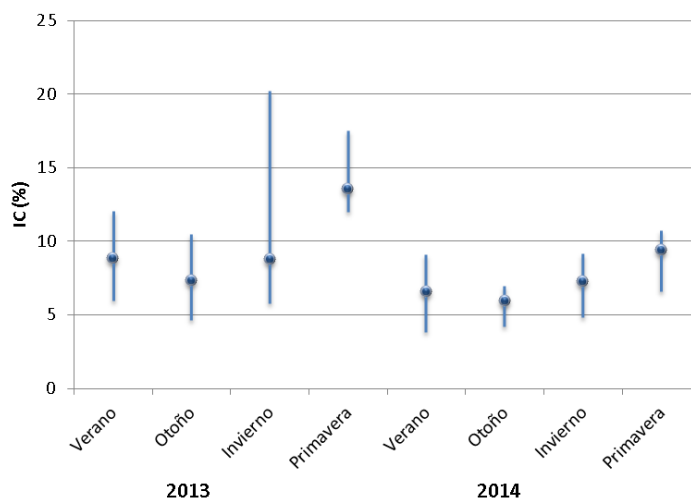
Este índice presenta fluctuaciones naturales como resultado, entre otras cosas, de la disponibilidad de alimentos, el desove, la reproducción y el grado de estrés del organismo. El aumento del IC representa un aumento de los constituyentes orgánicos del individuo asociado al crecimiento. Por el contrario, una disminución del IC refleja períodos de estrés e implica una mayor utilización de las reservas del organismo. Como resultado, el IC ha sido propuesto como un biomarcador no específico para detectar la presencia de contaminantes en los bivalvos (Oliva, 2015).

Los resultados mostraron que el IC varió entre 4,2 y 20,2 para el conjunto de mejillines analizados (**Figura 5.2**). En cuanto a los diferentes sitios estudiados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas (Test de Kruskal Wallis,  $p > 0,05$ ) para ambos años de muestreo, lo cual indicaría que los organismos presentaron condiciones fisiológicas similares, independientemente del sitio estudiado. Evaluando la variación estacional del IC, se observaron diferencias estadísticamente significativas (Test de Kruskal Wallis,  $p < 0,05$ ). En 2013 se encontró que la primavera difiere significativamente de las demás estaciones del año (verano, otoño e invierno). En 2014, la estación primaveral difiere significativamente tanto del verano como del otoño, pero no es posible afirmar (con un error menor al 5%) que hay diferencia con la estación invernal. Tanto en 2013 como en 2014, en general, se obtuvieron los valores máximos de IC en

primavera para todos los sitios de muestreo mientras que, los valores más bajos fueron obtenidos en la estación otoñal.

Algunos autores concluyen que un alto IC está asociado con una alta biomasa fitoplanctónica (estimada como clorofila *a*) ya que esta influye sobre el ciclo reproductivo de los bivalvos (Arrieche *et al.*, 2002). Otros autores sugieren que el IC, además de estar fuertemente influenciado por la biomasa fitoplanctónica, puede estar afectado por la salinidad y temperatura del medio (Karayücel & Karayücel, 1997; Yildiz *et al.*, 2006).

Si bien durante el presente trabajo no se midieron los valores de clorofila *a*, el estuario de Bahía Blanca se caracteriza por un colapso o “*bloom*” fitoplanctónico durante el invierno-primavera (Gayoso 1999; Popovich & Marcovecchio, 2008; Guinder *et al.*, 2015). Considerando la disponibilidad de alimento como un factor clave que regula el IC, los resultados muestran que el promedio de este índice comienza a aumentar en invierno llegando a los valores máximos en primavera, en concordancia con el período del año donde se produce el característico “*bloom* fitoplanctónico”.



**Figura 5.2-** Variación estacional del IC expresado como promedio, para todos los sitios estudiados.

Con respecto a la salinidad del medio, a lo largo de 2013, se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre esta variable y el IC (coeficiente de Spearman:  $r=0,90$  (otoño),  $r=0,81$  (invierno),  $r=0,77$  (primavera) y  $r=0,60$  (verano);  $p<0,05$ ). En 2014, se hallaron correlaciones significativas entre ambas variables en otoño

y verano (correlación de Spearman:  $r=0,83$ ;  $p<0,05$ ). Por otro lado, tanto en 2013 como en 2014, no se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre la temperatura del medio y el IC ( $p>0,05$ ) a excepción de la primavera 2014, donde se determinó una elevada correlación entre ambas variables (coeficiente de Spearman:  $r=0,89$ ;  $p<0,05$ ).

Es de esperar que en períodos con bajos valores de IC, donde las reservas de energía se encuentran altamente empobrecidas, aumente la concentración de contaminantes lipofílicos (TBT) en el tejido (Lehtonen *et al.*, 2016). Sin embargo, no se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre ambas variables ( $p>0,05$ ). Esta falta de correlación, probablemente, sea resultado de los diversos factores que influyen en la bioacumulación de compuestos organoestánicos, incluida la concentración de los OTC a la que se exponen los organismos, la vía de exposición (agua, alimentos, o sedimento), la forma química de los OTC (la cual dependerá principalmente del pH y la salinidad del medio) y la capacidad de los organismos para modificar y excretar los OTC (Laughlin, 1996).

- **Bioacumulación de TBT en muestras de mejillines**

Como se definió en el primer capítulo de esta Tesis, la bioacumulación es un proceso complejo de transferencia de un compuesto químico entre un organismo y el medio circundante (agua, sedimento, suelo o aire, etc.) (Environment Canada, 1995; Laughlin, 1996). Muchos factores influyen en la bioacumulación de los OTC incluida la concentración y la vía de la exposición a los compuestos organoestánicos (a través de agua, alimentos, o sedimento), la forma química en la que se encuentran los OTC, la capacidad del organismo para modificar y excretar estos compuestos, así como también de ciertos factores ambientales como la salinidad y la presencia de sólidos disueltos (Laughlin, 1996; Furdek *et al.*, 2012; Zuykov *et al.*, 2013).

Una manera ampliamente utilizada para evaluar la bioacumulación de los OTC en los organismos, principalmente TBT, es a partir del Factor de Bioacumulación (BAF). Este factor es una forma de cuantificar la habilidad de un organismo para concentrar el compuesto trisustituido y se define como la relación entre la concentración de TBT presente en el organismo y el medio circundante:  $BAF = C_b/C_m$  (Laughlin, 1996; Cao *et al.*, 2009), donde  $C_b$  es la concentración de TBT en el tejido del mejillín y  $C_m$  es la concentración de TBT en el medio (sedimento o columna de agua). Cuando este factor toma valores mayores a 1 indica que tiene lugar un proceso de bioacumulación.

Para poder comparar el BAF de ambos años de muestreo se seleccionó, para el cálculo del BAF, el contenido de TBT en sedimentos, aunque también se realizó el cálculo en relación al agua de mar para 2014. En la **Tabla 5.6** se presentan los valores de BAF. Se puede observar que en 2013 el 56,5 % de las muestras parecen haber acumulado TBT a través de los sedimentos, presentando valores de BAF >1. Por el contrario, en 2014, sólo 4 muestras presentaron valores de BAF mayor a la unidad. Esto parecería indicar que el mejillín *Brachidontes rodriguezii* presenta una menor capacidad de acumular TBT cuanto mayor es la contaminación presente en el sedimento, posiblemente mostrando una saturación con respecto al compuesto trisustituido debido a que, grandes cantidades de TBT limitan la capacidad de filtración los bivalvos (Gomez Ariza *et al.*, 1999; Furdek *et al.*, 2012), y/o el mejillín elimina el TBT a una velocidad mayor cuanto más elevada es la concentración que se encuentra en el medio que lo rodea. Tal como se observó en el Capítulo 3 de esta Tesis, en 2014 se registró un aumento de TBT a lo largo del área de estudio.

En ambos años de muestreo, los valores más altos de BAF fueron obtenidos en invierno, lo que puede ser consecuencia no sólo de la menor concentración de TBT encontrada en los sedimentos, en dicha estación del año; sino también, de la limitada capacidad que pueden presentar *Brachidontes rodriguezii* para metabolizar TBT debido a las bajas temperaturas registradas, generando así un efecto de bioacumulación (Furdek *et al.*, 2014).

Debido a que los organismos responden de manera distinta a las fuentes habituales de este compuesto: agua, sedimentos o alimentos (Gomez-Ariza *et al.*, 1999), y dado que el agua es considerada la mayor fuente de TBT para los mejillines (Furdek *et al.*, 2012), en 2014 se determinó el BAF teniendo en cuenta la concentración de TBT en la columna de agua de mar y, al igual que con los sedimentos de 2014, registrándose valores mayores a la unidad en un número muy pequeño de muestras en las estaciones de verano e invierno.

**Tabla 5.6-** Valores de BAF calculados para los mejillines recolectados en el el Estuario de Bahía Blanca.

Estaciones del año	Sitios	2013		2014	
		BAF <sub>s</sub>	BAF <sub>s</sub>	BAF <sub>s</sub>	BAF <sub>a</sub>
Verano	S1	0,11	<b>1,79</b>	0,69	
	S2	0,12	0,30	0,27	
	S3b-a	0,28	0,26	0,88	
	S4	0,09	0,00	0,00	
	S5	0,45	<b>1,09</b>	<b>2,09</b>	
	S6	0,19	0,20	0,45	
Otoño	S1	<b>1,15</b>	0,00	0,00	
	S2	<b>2,07</b>	0,00	0,00	
	S3b-a	<b>1,46</b>	0,34	0,36	
	S4	-	0,00	0,00	
	S5	<b>1,66</b>	0,00	0,00	
	S6	<b>1,49</b>	0,00	0,00	
Invierno	S1	<b>2,27</b>	n.c.	0,76	
	S2	<b>4,21</b>	n.c.	<b>1,43</b>	
	S3b-a	<b>5,94</b>	n.c.	0,80	
	S4	<b>8,63</b>	<b>4,47</b>	<b>1,30</b>	
	S5	<b>3,86</b>	<b>4,37</b>	0,53	
	S6	<b>4,16</b>	n.c.	0,65	
Primavera	S1	0,93	n.c.	0,40	
	S2	0,89	n.c.	0,06	
	S3b-a	0,67	0,55	0,36	
	S4	<b>1,33</b>	n.c.	0,03	
	S5	0,58	n.c.	0,06	
	S6	<b>1,20</b>	n.c.	0,15	

s: sedimento, a: agua de mar. nc: No calculado, el compuesto estuvo por debajo del LOD en las muestras de sedimento.  
 -: sin muestras de mejillines. El valor de 0,00 indica que el compuesto estuvo presente en los sedimentos pero en los mejillines estuvo por debajo del LOD

## 5.6 Distribución de los compuestos orgánicos de estaño en muestras de mejillines

Se empleó el Análisis de Componentes Principales Desplegado (U-PCA), para lograr una mejor visualización en cuanto al comportamiento de los compuestos organoestánicos estudiados, tanto temporal como espacialmente, en muestras de mejillines *Brachidontes rodriguezii*.

### 5.6.1 Muestras de mejillines *Brachidontes rodriguezii* tomadas en 2013

A partir del análisis de U-PCA se identificaron tres componentes principales, los cuales explicaron el 72,4 %, el 18,0 % y el 8,6 % de la varianza total, respectivamente. Las variables que contribuyen a la varianza recogida por el modelo son: la temperatura y las concentraciones de TBT, DBT y MBT. El resto de las variables estudiadas (salinidad, pH, IC y contenido de materia orgánica) no presentaron una variabilidad apreciable (**Figuras 5.3 a-c**). El primer componente principal está caracterizado por una contribución positiva y elevada de la concentración de DBT y, en menor medida, de TBT. Al mismo tiempo, se observa una pequeña contribución negativa de la concentración de MBT y la temperatura del medio (MBT > temperatura). El segundo factor presenta una contribución positiva y elevada de la concentración de MBT y, en menor medida, de TBT. El tercer factor presenta una contribución positiva y elevada de la concentración de TBT y una contribución negativa, considerablemente menor, debido a la temperatura y las concentraciones de MBT y DBT. Las **Figuras 5.3 d-f** ilustran los gráficos de scores de los primeros tres componentes principales. En estas figuras se puede observar que las muestras parecen agruparse en función de la estación del año en la que se recolectaron.

En verano, los sitios se encuentran muy agrupados entre sí indicando poca variabilidad entre las muestras dentro de dicha estación del año (**Figuras 5.3 d-f**). La posición de los sitios en el tercer cuadrante se corresponde con los valores más bajos de TBT y DBT obtenidos en todo el año de muestreo, así como también con los valores más altos de temperatura registrados en 2013. Las bajas concentraciones de TBT encontradas en verano podrían indicar que los mejillines *Brachidontes rodriguezii*, al igual que otras especies de moluscos bivalvos, tienen una mayor capacidad de eliminar TBT del organismo (ya sea por degradación o excreción) cuanto mayor es la temperatura del medio que los rodea (Hsia & Liu, 2003; Chandrinou *et al.*, 2007). A su vez, la correlación obtenida entre las concentraciones de DBT y TBT (coeficiente de Spearman:  $r = 0,80$ ;  $p = 0,05$ ) indicaría que los valores de DBT encontrados en esta estación del año se corresponden, principalmente, a la degradación del TBT.

En otoño, la ubicación de los sitios coincide con los valores más elevados de MBT, siendo el sitio S1 el que presenta la mayor concentración de este compuesto (**Figuras 5.3 d y f**). Los altos niveles de MBT podrían ser resultado de una exposición directa de los mejillines a fuentes adicionales de este compuesto (Kannan *et al.*, 1995). Como se ha mencionado anteriormente, una de las mayores aplicaciones de MBT es su uso en la estabilización del PVC, por lo que es posible la lixiviación de MBT desde este material

---



(utilizado en tuberías) al medio acuático (Hoch, 2001). En el área de estudio, por un lado, se realizan descargas de aguas residuales de las ciudades de Bahía Blanca (cercanía al sitio S2), General Daniel Cerri (cercanía al sitio S5) y Punta Alta (cercanía al sitio S1). Por otro lado, se llevan a cabo descargas colectoras de efluentes industriales (cercanía a los sitios S3b y S4), principalmente de una de las plantas más importantes de fabricación de PVC. De esta forma, es posible hallar elevadas concentraciones de MBT en el medio, disponibles para ser filtradas y/o eventualmente acumuladas por los mejillines presentes en la zona. Si bien se esperaba que el sitio S2, en la estación otoñal, se posicionara entre el sitio S5 y el origen de coordenadas, definido por los factores 2 y 3, sufre un desplazamiento por su mayor contenido de TBT con respecto al resto de los sitios (**Figuras 5.3 f**). El sitio S2, es frecuentado por grandes embarcaciones comerciales y de cargas generales, particularmente en otoño, dando lugar a elevadas concentraciones de TBT en el medio. De esta forma, el compuesto trisustituido se encuentra disponible para las muestras de mejillines ubicados en este sitio.

En la **Figura 5.3 e** la posición de los sitios en la estación otoñal parece corresponder a valores bajos de DBT. A excepción del ya mencionado sitio S2 que sufre un desplazamiento por su elevado contenido de TBT. La presencia de DBT en el medio, resultado de la degradación del compuesto trisustituido en esta estación del año (coeficiente de Spearman entre DBT y temperatura:  $r = -0,81$ ;  $p = 0,05$ ), hace que el compuesto disustituido pueda estar disponible para ser filtrado por los mejillines.

En la **Figura 5.3 d** puede observarse que en invierno los sitios están ubicados en orden creciente, desde el origen de coordenadas, de acuerdo a la concentración de DBT. Si bien se esperaba que el sitio S3b se ubicara entre los sitios S1 y S6, sufre un desplazamiento debido a que es el único sitio que presenta un valor considerable de MBT, en esta estación del año. El alto contenido de MBT encontrado en los mejillines de este sitio, indicaría un ingreso adicional de este compuesto. El sitio S3b se ubica en cercanía al canal colector de efluentes industriales, que origina posibles fuentes de MBT ya mencionadas.

En la **Figura 5.3 f** se puede observar que, en invierno, los sitios se ubican en el segundo cuadrante, coincidiendo con los valores más altos de TBT (valores elevados de factor 3) y al mismo tiempo, con los valores más bajos de MBT y temperatura registrados a lo largo del año de muestreo. Sin embargo, al igual que lo observado en la **Figura 5.3 d**, el sitio S3b sufre un gran desplazamiento hacia el primer cuadrante debido a su elevada concentración de MBT en comparación con el resto de los sitios. Además, en la **Figura**

---

**5.3 d**, se puede observar que la concentración de DBT es máxima en la estación invernal para los sitios S5, S2 y S4.

Debido a las bajas temperaturas registradas en invierno, los bivalvos presentan una capacidad limitada para metabolizar los OTC, generando así un efecto de bioacumulación (Furdek *et al.*, 2012) y, a su vez, bajo estas temperaturas, la velocidad de filtración decrece desde TBT a MBT (Tang *et al.*, 2010).

Además, a partir de la **Figura 5.3 e** se puede observar que en la estación invernal los sitios se posicionan en la dirección del componente principal relacionado con la concentración de TBT, siendo el sitio S4 el que presenta la mayor concentración de este compuesto. Este sitio se caracteriza por la presencia de grandes buques de carga y por tanto, son de esperar altas concentraciones de TBT en el medio, disponibles para ser filtradas, y eventualmente acumuladas, por los mejillines ubicados a sus alrededores. Se hubiera esperado que el sitio S1 se posicione en cercanías de los sitios S3b y S6, sin embargo sufre un desplazamiento hacia valores bajos de factor 1 debido a que contiene una concentración notablemente más baja de DBT que cualquiera de los sitios en la estación invernal.

En primavera, a partir de la **Figura 5.3 d** se puede observar que los sitios se posicionan en concordancia con las concentraciones obtenidas de TBT y DBT (S5 < S2 < S3b < S1 << S6 < S4). Sin embargo, el sitio S2 presenta un pequeño desplazamiento por su elevado contenido de MBT, con respecto al resto de los sitios. Finalmente, los sitios S4 y S6 que se encuentran marcadamente alejados de los demás sitios de estudio, presentan una elevada concentración de DBT, siendo las más altas de todo el año muestreado. Esta última característica también puede ser evidenciada en la **Figura 5.3 e**. En la estación primaveral, la concentración encontrada de TBT es una de las más bajas del año de muestreo, después de la estación estival. Como se ha mencionado en la discusión sobre los sedimentos superficiales tomados en 2013, el “*bloom*” fitoplanctónico que caracteriza al estuario de Bahía Blanca y tiene lugar en agosto/septiembre (Guinder, 2011), parece producirse más cerca del invierno. Este *bloom* provoca la degradación de TBT, por actividad biológica, al compuesto dibutilado. Este proceso da lugar a una disminución en la concentración de TBT en los sedimentos y parece estar reflejada en los mejillines recogidos en la estación primaveral. Esto ocurre como consecuencia de un cierto período de tiempo que necesitan los moluscos bivalvos para reflejar la contaminación ambiental que los rodea. Este tiempo no está claramente definido y está influenciado por diversos factores biológicos y ambientales. Además, se encontró una correlación estadísticamente

---

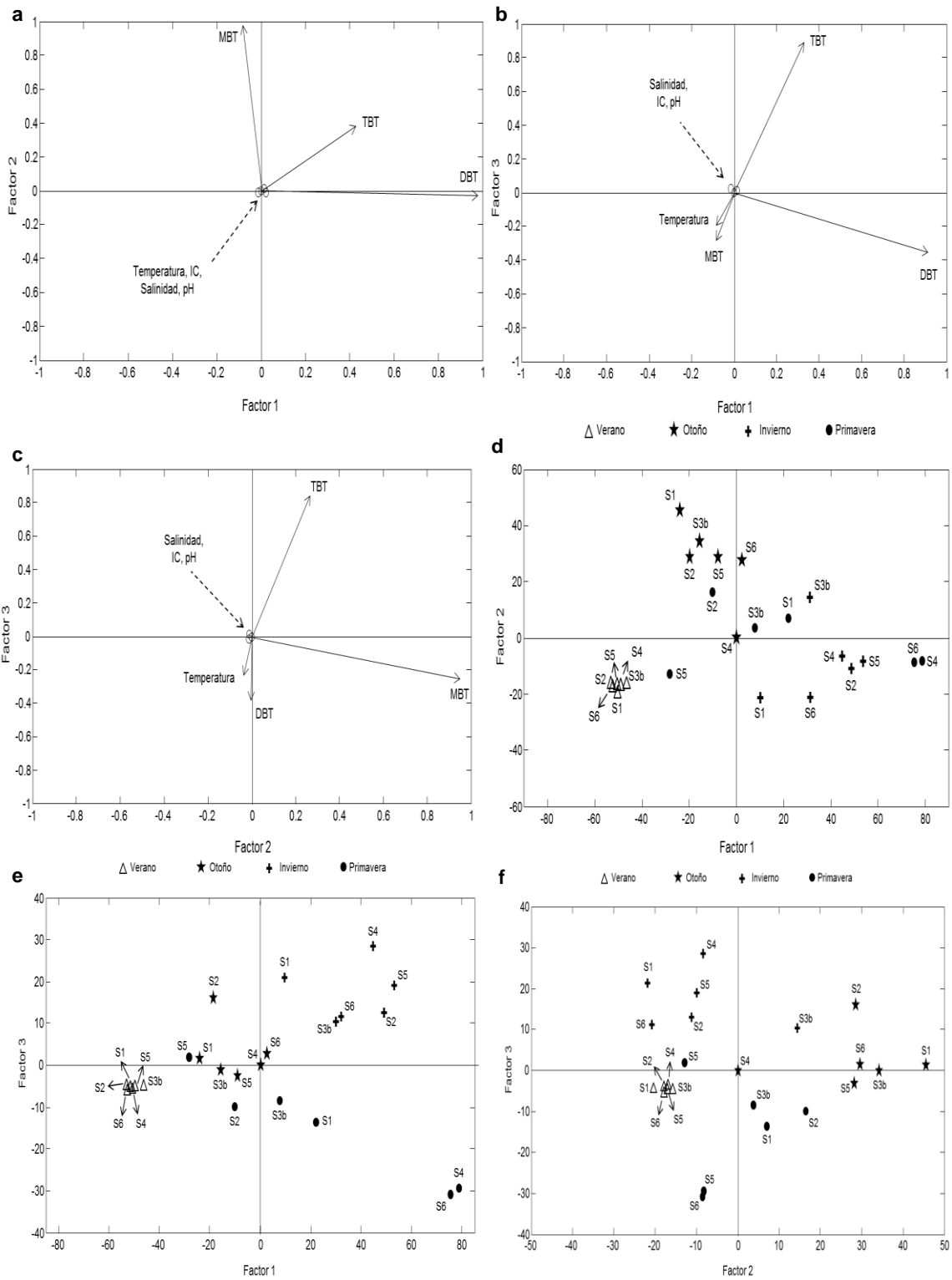
significativa entre las concentraciones de TBT y DBT encontradas en primavera (coeficiente de Spearman:  $r=0,94$ ;  $p=0,04$ ), mostrando que los valores registrados del compuesto disustituido provienen de la degradación de TBT.

El alto contenido de MBT encontrado en el sitio S2 (primavera) probablemente sea resultado de la temperatura del agua y actividad biológica presente en este sitio dando lugar a una degradación más rápida del TBT en el medio que rodea a las muestras de mejillines.

Como se ha mencionado en el capítulo correspondiente a sedimentos, el sitio S6 presenta varias características especiales, provocando un proceso de degradación de DBT menos eficiente que en otros sitios estudiados dentro estuario de Bahía Blanca. Altos niveles de DBT, de esta forma, está expuesto a ser filtrado por los mejillines, señalando nuevamente la importancia de las corrientes de marea para trasladar TBT y sus productos de degradación de las principales zonas de origen a estas zonas remotas.

La elevada concentración de DBT encontrada en las muestras de mejillines en el sitio S4 en primavera, probablemente sea debido a un ingreso adicional de dicho compuesto (lixiviación de DBT desde los tubos de PVC).

En la **Figura 5.3 f** se puede observar, al igual que en la **Figura 5.3 d**, que el sitio S5 en primavera se posiciona más alejado del resto de los sitios, correspondiéndose con los valores más bajos de TBT, DBT y MBT dentro de esta estación. Esto fue explicado anteriormente por lo que no merece una mayor revisión.



**Figura 5.3-** a–c Gráficos de *loadings*, d–f gráficos de *scores* para las muestras de mejillines *Brachidontes rodriguezii* tomadas en 2013.

### 5.6.2 Muestras de mejillines *Brachidontes rodriguezii* tomadas en 2014

A partir del análisis de U-PCA se identificaron tres componentes principales, los cuales explicaron el 78,01 %, el 14,99 % y el 5,27 % de la varianza total, respectivamente. Las **Figuras 5.4 a-c** muestran los gráficos de *loadings* obtenidos después de aplicar U-PCA. Las variables que más contribuyen a la varianza recogida por el modelo son las concentraciones de TBT, DBT y MBT. El resto de las variables estudiadas (temperatura, salinidad, pH, IC y contenido de materia orgánica) no presentaron una variabilidad tal que pueda influir en el modelo (**Figuras 5.4 a-c**). El primer componente principal está caracterizado por una contribución positiva y elevada de TBT y DBT. El segundo factor presenta un componente positivo y elevado con respecto a la concentración de DBT y presenta una contribución negativa y elevada de la concentración de TBT. El tercer factor presenta una contribución positiva con respecto a la concentración de MBT y, en menor medida, de DBT. Simultáneamente, presenta una pequeña contribución negativa debido a TBT.

Las **Figuras 5.4 d-f** ilustran los gráficos de *scores* de los primeros tres componentes principales. El patrón de distribución observado de acuerdo al primer y segundo componente principal (**Figura 5.4 d**) ubica en el cuarto cuadrante todos los sitios que tienen alta concentración de TBT: S5 en verano, S3a en otoño y todos los sitios en invierno, a excepción de los sitios S2 y S4 que se encuentran en el primer cuadrante a causa de su elevado contenido de DBT. Se esperaría que los sitios S1 y S3a en verano se posicionarán en el cuarto cuadrante, sin embargo se encuentran ubicados en el primer cuadrante debido a su alto contenido de DBT. El sitio S2 (verano) se posiciona sobre valores positivos de factor 2, dado su contenido de DBT. El resto de los sitios presentan bajos valores de TBT y DBT por lo tanto se ubican en valores negativos de factor 1.

En el sitio S5 (verano) se registró la concentración de TBT más elevada de 2014. Característica que también puede ser observada en las **Figura 5.4 e y f**, donde este sitio se posiciona en concordancia con el vector correspondiente a TBT. El sitio S5 se caracteriza por la presencia de numerosas embarcaciones de pesca y recreación, lo que favorece el ingreso de TBT al medio y, de esta manera se encuentra disponible para ser filtrado por los mejillines presentes en el sitio de estudio.

La concentración de TBT encontrada en el sitio S3a (otoño) fue la segunda más alta del año de muestreo (después de S5 en verano). Es notorio que en cada estación del año, este sitio presentó el valor más alto o uno de los más altos de TBT. Esto puede

deberse a que se trata de un sitio con presencia continua de numerosas embarcaciones de pesca y recreación.

Los altos valores de TBT registrados en invierno están en concordancia con las elevadas concentraciones del compuesto trisustituido obtenidas en la estación otoñal para las muestras de agua. Como ya se mencionó, una explicación probable de este comportamiento podría estar relacionada con el período de tiempo que los moluscos necesitan para reflejar la contaminación ambiental que los rodea. Además, como se señaló, en invierno, la razón por la cual la concentración de DBT en los mejillines es alta obedece a que los moluscos tienen una capacidad limitada para metabolizar los OTC cuando se registran bajas temperaturas, generando un efecto de bioacumulación (Furdek *et al.*, 2012).

Los sitios S1, S2 y S3a en verano presentan concentraciones elevadas de DBT. Al igual que con TBT, esto puede ser el reflejo de la contaminación por DBT registrada en el agua en la estación anterior (primavera). De hecho, todos los mejillines en verano presentan altos contenidos de DBT aunque, en menor medida, los correspondientes a los sitios S4 y S6 en los cuales parece tener lugar un proceso de degradación más acelerado que en el resto de los sitios. Esto se puede visualizar con mayor claridad en la **Figura 5.4 f** en la cual estos sitios se encuentran directamente relacionados con el factor 2. También presentan una contribución de factor 2 relativamente importante los sitios S2 y S4 en invierno debido a la concentración de DBT que se registró para estos sitios. Este comportamiento fue mencionado en la **Figura 5.4 d**. Cabe destacar que el resto de los sitios la estación invernal contienen concentraciones elevadas de DBT, sin embargo, en la **Figura 5.4 f** aparecen a valores negativos de factor 2 debido a que presentan concentraciones elevadas de TBT.

A partir de las **Figuras 5.4 d y f** se puede observar que todos los sitios en otoño se posicionan sobre valores negativos de factor 2, en concordancia con valores bajos de TBT y DBT. En la estación otoñal no fue posible la cuantificación de estos compuestos, siendo el MBT el único compuesto determinado. Este comportamiento puede ser atribuido al dragado realizado en dicha estación del año, dando lugar a una mayor concentración de TBT en el medio y, posiblemente, originando una saturación del mejillín con respecto al TBT presente en el ecosistema debido a que, grandes cantidades de TBT limitan la capacidad de filtración los bivalvos (Gomez Ariza *et al.*, 1999; Furdek *et al.*, 2012). Una excepción a este comportamiento, es el ya discutido sitio S3a que sufre un

desplazamiento hacia valores positivos de factor 2 por ser el único sitio donde TBT pudo ser cuantificado en esta estación del año (**Figura 5.4 d**).

En la estación primaveral, al igual que en otoño, los sitios se ubican sobre valores negativos de factor 2 en concordancia con los bajos valores de OTC registrados en esta estación del año para todos los sitios de muestreo (**Figuras 5.4 d y f**). El sitio S1 sufre un pequeño desplazamiento en concordancia con el vector correspondiente a la concentración de DBT (**Figura 5.4 f**) siendo el sitio con mayor contenido de DBT en primavera. La elevada correlación encontrada entre TBT y DBT en la estación primaveral (coeficiente de Spearman:  $r=0,89$ ;  $p=0,05$ ), indica que las concentraciones de DBT obtenidas provienen de la degradación del compuesto trisustituido. Las bajas concentraciones de TBT y DBT encontradas en esta estación, probablemente, sean producto de un proceso de degradación causado por el fitoplancton presente en el área de estudio que presenta un colapso de la floración en agosto/septiembre (Gunder, 2011).

En la **Figura 5.4 d** se puede observar que todos los sitios en la estación invernal se posicionan sobre valores positivos de factor 1 y la distribución está determinada por la combinación de los dos componentes principales importantes (las concentraciones de TBT y DBT). El sitio S2 registró la concentración más alta de DBT en todo el año de muestreo. Como se ha mencionado anteriormente, en este sitio la degradación térmica y biológica del TBT a su correspondiente dibutilado se ve altamente favorecida debido a su cercanía a la central termoeléctrica y a la salida principal de la descarga de aguas residuales de la ciudad de Bahía Blanca, respectivamente.

Como se mencionó anteriormente, el factor 3 parece estar directamente relacionado con la concentración de MBT. En las **Figuras 5.4 e y f** se puede observar que las mayores contribuciones de factor 3 se corresponden a los mejillines del sitio S4 en verano y los sitios S1 y S2 en invierno y, en menor medida, los del sitio S3a en otoño, el sitio S5 en invierno y el sitio S1 en verano. Los altos niveles de MBT podrían ser resultado de una exposición directa de los mejillines a fuentes adicionales de este compuesto (Kannan *et al.*, 1995). Como se ha mencionado, en cercanía al sitio S4 se llevan a cabo descargas colectoras de efluentes industriales, principalmente de una de las plantas más importantes de fabricación de PVC. El PVC, además es utilizado en tuberías de agua potable, de aguas residuales y de agua de drenajes. En el área de estudio, por un lado, se realizan descargas de aguas residuales de las ciudades de Bahía Blanca (cercanía al sitio S2), General Daniel Cerri (cercanía al sitio S5) y Punta Alta (cercanía al sitio S1). Así, es

probable que los mejillines filtren y/o bioacumulen altos contenidos de MBT en las zonas mencionadas.

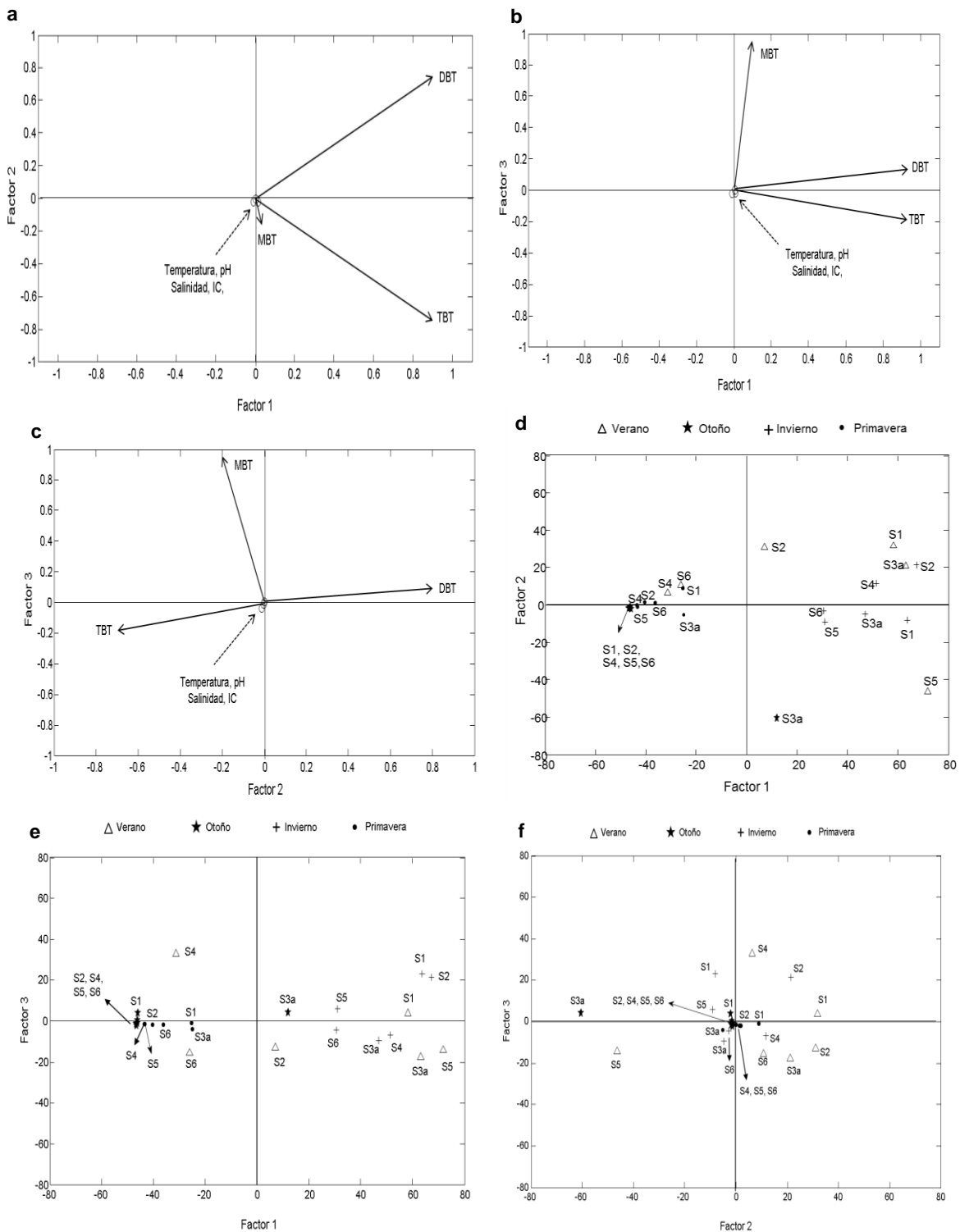
- **Conclusiones parciales**

La presencia de TBT, DBT y MBT parece estar influenciada por ciertas condiciones ambientales, principalmente la temperatura de la columna de agua. Este parámetro también parece afectar la velocidad de filtración y el metabolismo de los organismos estudiados. Al igual que el resto de las muestras estudiadas, se observa una cierta variación temporal en cuanto a las concentraciones de OTC encontradas a lo largo del año muestreado.

En cuanto a la variabilidad espacial, se pudo notar, al igual que en el resto de las muestras analizadas, que toda el área de estudio parece estar impactada por TBT y sus productos de degradación, probablemente como resultado de las corrientes de marea que caracterizan la zona de estudio, así como los procesos de dragado que se realizan periódicamente sobre el Canal Principal. Una vez más, la biodegradación que sufre el TBT principalmente en el período invierno/primavera donde se produce el “*bloom* fitoplanctónico” característico del Estuario de Bahía Blanca, parece ser significativa e influyente sobre las muestras biológicas estudiadas. Adicionalmente, parecen existir diversas fuentes adicionales de DBT y MBT, ya mencionadas a lo largo de esta Tesis, que contribuyen a las concentraciones encontradas de ambos compuestos en los mejillines *Brachidontes rodriguezii*

En algunos casos, se observó que los mejillines parecen reflejar después de un cierto período de tiempo la contaminación ambiental que los rodea. Si bien este tiempo no está claramente definido, el mismo está influenciado por varios factores tales como temperatura, salinidad, oxígeno disuelto y disponibilidad de alimentos, entre otros.





**Figura 5.4-** a–c Gráficos de *loadings*, d–f gráficos de *scores* para las muestras de mejillines *Brachidontes rodriguezii* tomadas en 2014

## CAPÍTULO 6: COMPARACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE OTC EN LAS DISTINTAS MUESTRAS ESTUDIADAS

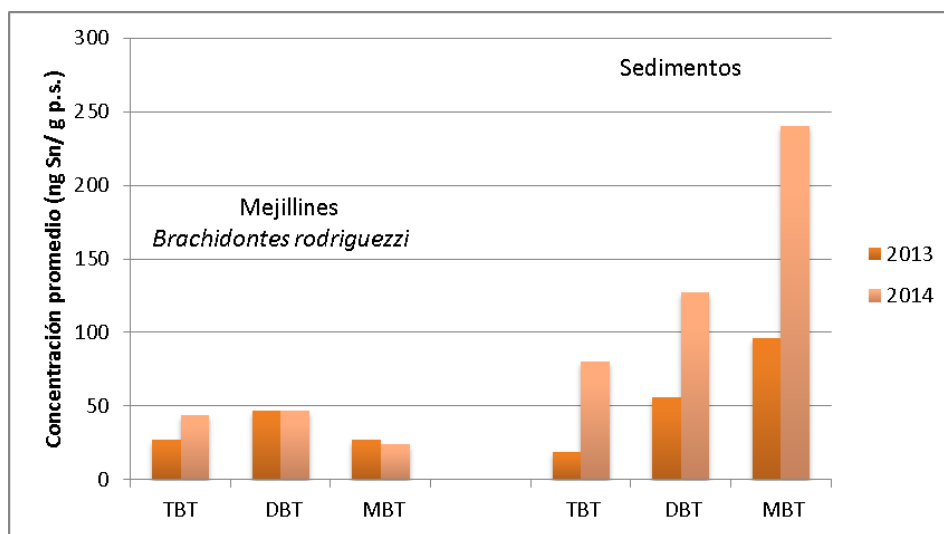
Como se ha discutido con anterioridad, la principal vía de ingreso del compuesto trisustituido (TBT) en el medio marino es a través de la lixiviación directa de pinturas antiincrustantes. Una vez en la columna de agua, el TBT tiende a ser bioacumulado por organismos del medio (Gomez-Ariza *et al.*, 1999) y/o a adsorberse en el material particulado en suspensión. A continuación, tiene lugar el proceso de sedimentación, donde los organismos bentónicos pueden entrar en contacto con los OTC presentes en los sedimentos (Diez *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006). De esta forma, el TBT puede ser retirado de la columna de agua para acumularse en el sedimento y la biota, que actúan de esta manera como trampas para estos contaminantes. Estos procesos (adsorción y absorción) son un importante mecanismo de control sobre la distribución y el destino de los compuestos organoestánicos en el ambiente (Hoch, 2001). A su vez, la persistencia de los compuestos orgánicos de estaño en el medio, está íntimamente relacionada con las características del medio acuático, tales como, temperatura, salinidad, pH, material en suspensión, población microbiana, entre otros.

### 6.1 Muestras de sedimento y mejillines tomadas en 2013 y 2014

En la **Figura 6.1** se puede observar las concentraciones totales de TBT y sus productos de degradación –DBT y MBT– en 2013 y 2014, en las muestras de mejillines *Brachidontes rodriguezii* y sedimentos superficiales. En las muestras biológicas, la acumulación de TBT es mayor en 2014 que en 2013 sugiriendo una contaminación mayor en el último año de muestreo. Si bien las concentraciones promedio totales de DBT son similares en los dos años, en los mejillines analizados tanto en 2013 como en 2014, se observó una correlación significativa entre las concentraciones totales de DBT y TBT (coeficiente de Spearman:  $r=0,74$ ;  $p<0,05$ ) lo que sugiere que el compuesto disustituido presente en estos organismos proviene, principalmente, de la degradación de TBT. La falta de correlación con el compuesto monosustituido (MBT) podría indicar, por un lado, que el DBT es liberado desde el mejillín antes de degradarse o que el compuesto disustituido tiene una lenta velocidad de degradación en los mejillines *Brachidontes rodriguezii* (Furdek *et al.*, 2012). Además, la falta de correlación puede ser resultado de

una exposición directa de los mejillines a fuentes adicionales de este MBT (Kannan *et al.*, 1995).

En las muestras de sedimentos superficiales, al igual que en las muestras de mejillines, parece existir un ingreso mayor de TBT en 2014 que en 2013. Esto puede ser consecuencia, por un lado, de una entrada continua de este contaminante orgánico al estuario de Bahía Blanca y por otro, puede ser resultado de la resuspensión, transporte y redistribución de sedimentos de fondo a lo largo del área de estudio debido a los dragados periódicos que se realizan en el Canal Principal de Navegación, y a partir del cual se exponen al medio sedimentos con altos niveles de TBT antiguos (Santos *et al.*, 2004). De la misma manera, se observan ingresos adicionales de DBT y MBT, ya mencionados a lo largo de esta Tesis. Esto se pone en evidencia con la falta de correlación que se obtuvo, en los dos años de muestreo, entre las concentraciones totales encontradas de TBT, DBT y MBT en las muestras de sedimento ( $p > 0,05$ ).



**Figura 6.1-** Concentraciones totales de cada OTC estudiado en las muestras de sedimento y mejillines en 2013 y 2014.

## 6.2 Muestras tomadas en 2014

En la **Figura 6.2** se puede observar la distribución promedio de los compuestos orgánicos de estaño estudiados en las distintas matrices evaluadas durante 2014. Se puede notar la semejanza entre las muestras de sedimento y MPS en cuanto al

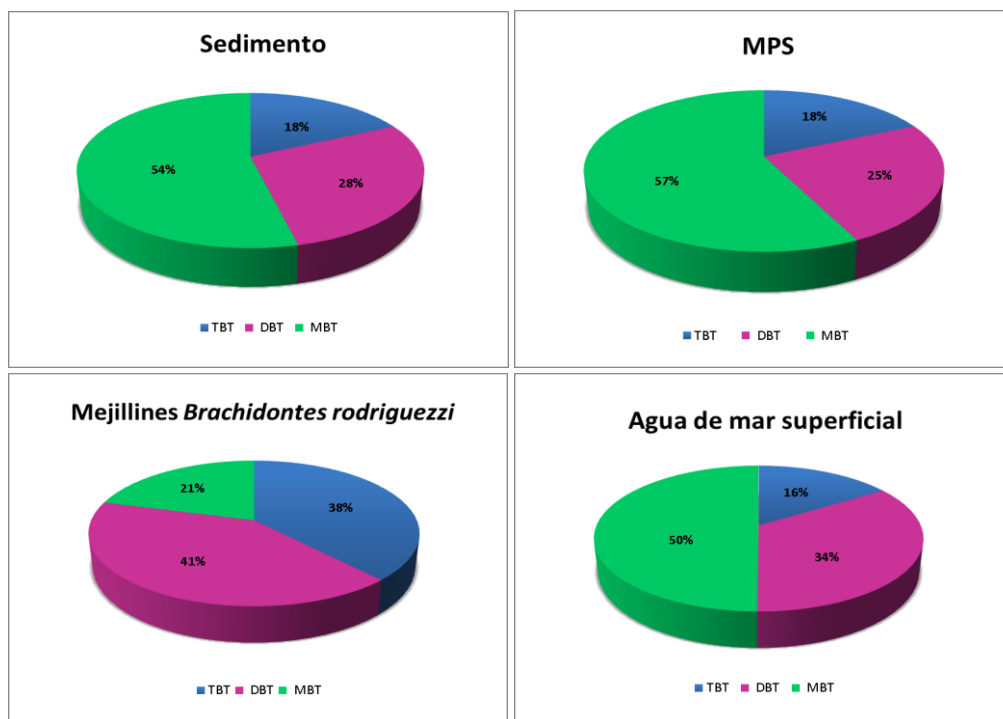
porcentaje de cada compuesto en cada muestra. El MBT es el organoestánnico que se encuentra en mayor proporción mientras que el TBT se presenta en menores porcentajes. El bajo porcentaje de TBT encontrado indicaría que se trata de TBT antiguo y se corrobora de esta manera, lo planteado anteriormente para las muestras de sedimento 2013 y 2014. Probablemente, estos sedimentos sean expuestos al medio como resultado del dragado constante que se lleva a cabo en el Canal Principal que, como hemos discutido a lo largo de esta Tesis, provoca la removilización de los sedimentos de fondo, y por tanto podría incidir en el transporte y la recirculación de los OTC (Buggy & Tobin, 2006). Además, se puede esperar que las descargas del material dragado contengan altos niveles de TBT (Santos *et al.*, 2004) debido a que, en condiciones anaeróbicas (sedimentos del fondo), la vida media de TBT parece estar en el orden de decenas de años (Dowson *et al.*, 1993).

En las muestras de mejillines *Brachidontes rodriguezii* los compuestos que se encuentran en mayor proporción son los organoestánnico tri y disustituido (TBT y DBT). Dicho comportamiento es consecuencia del carácter lipofílico que caracteriza a estos compuestos y por tanto, tienden a encontrarse en mayor medida en muestras biológicas.

El MBT es el compuesto organoestánnico que se encuentra en mayor proporción en la columna de agua. Como se ha observado con anterioridad, probablemente este comportamiento sea producto de su carácter hidrofílico (Wang *et al.*, 2008), en suma a una menor tasa de degradación del MBT que sus correspondientes butilados (TBT y DBT), lo que proporciona una mayor vida media en el medio acuático para dicho organoestánnico que para sus correspondientes tri y disustituido.

Se observaron las correlaciones entre las concentraciones promedios de los OTC en las distintas muestras estudiadas. No se encontraron correlaciones significativas ( $p > 0,05$ ) en cuanto a las concentraciones promedio de TBT halladas en las muestras de agua de mar y en las de mejillín, así como tampoco entre las muestras de sedimento y mejillines. Estos resultados sugieren que la acumulación de TBT en los mejillines *Brachidontes rodriguezii* puede no provenir de la columna de agua ni de los sedimentos del medio (Lee *et al.*, 2006), sino que puede ser resultado de su alimentación, pudiendo acumular TBT a través de partículas disueltas y en suspensión (plancton y MPS contaminados). Si bien no se encontró una correlación significativa entre las concentraciones obtenidas de TBT en el MPS con el resto de las matrices estudiadas, algunos autores proponen que la gran afinidad de los OTC por el MPS puede conducir a

una sobrestimación de la verdadera contaminación (Morabito, 1995). Por su parte, el fitoplancton puede desempeñar un papel fundamental en la transferencia de contaminantes en los organismos superiores debido a que, puede concentrar grandes cantidades de contaminantes desde la columna de agua de mar y se hallan en la base de la mayoría de las cadenas alimentarias marinas (Fisher & Reinfelder, 1995; Coelho *et al.*, 2002).



**Figura 6.2-** Distribución promedio de los OTC en las cuatro muestras estudiadas (sedimento, mejillines, agua de mar, MPS) en el estuario de Bahía Blanca, en 2014.

Entre las muestras de agua de mar y sedimento no se encontraron correlaciones significativas ( $p > 0,05$ ) respecto a la concentración total de TBT, así como tampoco con respecto a los niveles de DBT y MBT obtenidos. Sin embargo, algunos autores, indican que esta falta de correlación, principalmente para el TBT, podría ser resultado de la influencia de descomposición bacteriana y de las corrientes de mareas que caracterizan el área de estudio (Lee *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008). Probablemente, las características naturales del estuario de Bahía Blanca (altas concentraciones de nutrientes y materia orgánica durante la mayor parte del año) así como las corrientes de mareas

características, podrían enmascarar la correlación entre las muestras evaluadas (agua de mar y sedimento).

## CONCLUSIONES

✓ Se logró desarrollar, optimizar y evaluar una nueva metodología analítica para llevar a cabo el análisis de especiación de los compuestos orgánicos de estaño en distintas muestras del ambiente marino. Para muestras de mejillines *Brachidontes rodriguezii*, sedimento y MPS se llevaron a cabo modificaciones en la metodología propuesta por UNEP/IOC/IAEA (1994) y Delucchi (2007). Los cambios más importantes fueron trabajar a bajas temperaturas durante el desarrollo del procedimiento y la aplicación de energía de US tanto en la etapa de extracción como derivatización. Al aplicar US en lugar de agitación convencional (orbital) se logró reducir el tiempo de análisis, mejorar la sensibilidad analítica para los tres analitos estudiados, disminuir los límites de detección, obtener mayores porcentajes de recuperación y menores valores de DER %. Los porcentajes de extracción fueron similares al aplicar US o agitación convencional. Para muestras de agua de mar, se llevó a cabo una extracción líquido-líquido logrando buenos porcentajes de recuperación y extracción de los analitos estudiados.

✓ Se logró, por primera vez, la determinación de MBT en distintas muestras (sedimentos superficiales, mejillines, columna de agua de mar y MPS) del estuario de Bahía Blanca. Además, se destaca los estudios realizados en mejillines nativos (*Brachidontes rodriguezii*), agua de mar y MPS debido a que no se habían estudiado anteriormente.

✓ A partir del tratamiento estadístico llevado a cabo ha quedado demostrado que existe una variabilidad temporal con respecto a las concentraciones de TBT, DBT y MBT en el estuario de Bahía Blanca, a lo largo del período muestreado. La distribución y las concentraciones encontradas de estos compuestos orgánicos de estaño están influenciadas por condiciones ambientales, tales como período de lluvias, contenido de materia orgánica y granulometría de las muestras de sedimento, distribución de la salinidad, pH y temperatura de la columna de agua.

✓ Particularmente, en la columna de agua de mar se observó que las concentraciones encontradas de MBT no presentaron diferencias entre las distintas

estaciones del año muestreadas. Este comportamiento puede atribuirse al carácter hidrofílico del compuesto monosustituido y, a la lenta tasa de degradación a Sn inorgánico que caracteriza al MBT en medio acuático. Además, se evidenció la corta vida media que caracteriza al DBT en la columna de agua.

✓ Si bien todos los sitios estudiados han sido impactados por la contaminación de TBT y sus productos de degradación, en general no se ha observado que los niveles más altos de TBT se correspondan con los sitios cercanos a zonas de intenso tráfico marino. De esta forma, el sitio S6 (Villarino Viejo) a pesar de encontrarse en la zona más interna del estuario y rodeado de tierras agrícolas/rurales, presentando escasa o nula actividades de pesca, presentó altas concentraciones de OTC en todos los tipos de muestra estudiados. Posiblemente, producto de las corrientes de marea que son eficaces en la transmisión de material particulado que traslada TBT y sus productos de degradación de las principales zonas de origen a estas zonas remotas, donde la sedimentación de las partículas se ve favorecida por la hidrodinámica del sistema estuarino. A esto se suman los periódicos dragados que se realizan sobre el Canal Principal, que da lugar a la removilización los sedimentos de fondo, y por tanto podría incidir en el transporte y la recirculación de los OTC. De esta forma, los resultados obtenidos describen la importancia del transporte y el comportamiento de sedimentación de partículas a lo largo de todo el estuario de Bahía Blanca. Resalta esta importancia la fuerte tendencia que mostraron los OTC de adsorberse sobre el MPS.

✓ Se estima que el ingreso de TBT en el estuario de Bahía Blanca es antiguo y se encuentra bajo un proceso de degradación general y probablemente acelerado. Principalmente, como resultado del gran contenido de nutrientes y alta biomasa fitoplanctónica que caracteriza al área de estudio. Particularmente se distinguió a lo largo del período de muestreo la importancia que presenta el colapso de la floración de diatomeas (“*bloom* fitoplanctónico”) en agosto/septiembre en el proceso de degradación biológica que sufre el compuesto trisustituido.

✓ A través de las muestras de agua de mar, queda en evidencia un ingreso continuo de TBT en 2014. Por un lado, probablemente, como resultado de la lixiviación directa de las pinturas antiincrustantes y, por otro lado, puede ser consecuencia del dragado



continuo que se realiza en el estuario de Bahía Blanca. El dragado provoca la resuspensión de sedimentos de fondo (anóxicos) a lo largo del área de estudio y se exponen al medio sedimentos con altos niveles de TBT antiguos (Santos et al., 2004). En función de lo discutido a lo largo de la Tesis el dragado parece ser el principal responsable de las concentraciones de TBT encontradas en las muestras evaluadas.

✓ A lo largo del área de estudio, parecen existir fuentes adicionales de DBT y MBT, más allá de la degradación natural a partir de TBT. Teniendo en cuenta que en el polo industrial localizado en el estuario de Bahía Blanca se producen y procesan plásticos (PVC y otros polímeros) y que la gran mayoría de las cañerías de distribución de agua y de desagüe están fabricadas de PVC, es posible que los OTC usados en dichos plásticos hayan podido pasar al ambiente por lixiviación o a través de los efluentes industriales, así como de las aguas residuales domésticas y de los lodos de depuradora que se descargan en el estuario planteando una posible fuente adicional de compuestos orgánicos de estaño.

✓ A la luz de los resultados obtenidos, parecería que los mejillines *Brachidontes rodriguezii* tardan un cierto período de tiempo para reflejar la contaminación ambiental que los rodea. Además, la acumulación de TBT parece no provenir de la columna de agua ni de los sedimentos del medio (Lee et.al., 2006), sino de su alimentación, pudiendo acumular TBT a través de partículas disueltas y en suspensión. También se observó, que los mejillines presentan una menor capacidad de acumular TBT cuanto mayor es la contaminación presente en el medio que lo rodea (sedimento y/o agua de mar), posiblemente indicando una saturación con respecto a TBT frente a tiempo elevado de exposición, o que eliminan el TBT del organismo a una velocidad mayor cuanto más elevada es la concentración a la que son expuestos.

✓ En cuanto al uso del mejillín *Brachidontes rodriguezii* como organismo centinela son necesarios estudios futuros sobre la especie, que evalúen más a fondo su biología (ej.: sus ciclos reproductivos, etapa de desove, capacidad enzimática, etc.) debido a la importancia que tienen las condiciones fisiológicas del organismo en la bioacumulación de los contaminantes presentes en el medio que habitan.

En función del trabajo llevado a cabo en esta Tesis, queda demostrado que el estuario de Bahía Blanca se encuentra impactado por TBT y sus productos de degradación -DBT y MBT- y, si bien la presencia del compuesto trisustituido parece ser antigua, es importante continuar con el monitoreo de especiación en la zona de estudio. Al mismo tiempo, es menester llevar a cabo trabajos multidisciplinarios, donde se evalúen no sólo los niveles de los compuestos potencialmente contaminantes sino también los efectos biológicos que estos compuestos, principalmente TBT, tienen sobre los mejillines *Brachidontes rodriguezii* que habitan en el estuario de Bahía Blanca. Además, se hace evidente la necesidad de un estudio más amplio sobre la bioacumulación y transferencia de estos compuestos butilados a otros niveles de la cadena trófica. Adicionalmente, sería interesante un estudio más profundo sobre los factores ambientales característicos del estuario de Bahía Blanca, principalmente la floración fitoplanctónica, la salinidad, turbidez y MOP, que mostraron ser influyentes en la distribución y el comportamiento de los OTC en la zona de estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

Abel, PD (2000) TBT – towards a better way to regulate pollutants. *Science of the Total Environment*, 258:1-4.

Abidli, S; Lahbib, Y; Rodríguez González, P; Garcia Alonso, JI & El Menif, NT (2013) Imposex and butyltin burden in *Bolinus brandaris* (Mollusca, Gastropoda) and sediment from the Tunisian coast. *Hydrobiologia* 714(1): 13-24.

Adami, ML; Tablado, A & Gappa, JL (2004) Spatial and temporal variability in intertidal assemblages dominated by the mussel *Brachidontes rodriguezii* (d'Orbigny, 1846). *Hydrobiologia*, 520(1-3): 49-59.

Albalat, A; Potrykus, J; Pempkowiak, J & Porte, C (2002) Assessment of organotin pollution along the Polish coast (Baltic Sea) by using mussels and fish as sentinel organisms. *Chemosphere*, 47(2): 165-171.

Allsopp, M.; Santillo D & Johnston, P (2000) Hazardous chemicals in PVC flooring. Greenpeace Research Laboratories Technical Note 14/00, November 2000: 10 pp. [published under cover title "Poison Underfoot: Hazardous Chemicals in PVC Flooring and Hazardous Chemicals in Carpets, ISBN 90-73361-68-0]

Allsopp, A; Santillo, D & Johnston, P (2001) Hazardous chemicals in carpets. Greenpeace Research Laboratories Technical Note 01/2001, January 2001: 14 pp. [published under cover title "Poison Underfoot: Hazardous Chemicals in PVC Flooring and Hazardous Chemicals in Carpets, ISBN 90-73361-68-0]

Almeida, AC; Wagener, ADL Maia, CB & Miekeley, N (2004) Speciation of organotin compounds in sediment cores from Guanabara Bay, Rio de Janeiro (Brazil) by gas chromatography–pulsed flame photometric detection. *Applied Organometallic Chemistry*, 18(12): 694-704.

Alonso Felipe, JV (2011) Evaluación de efectos de biocidas contenidos en recubrimientos “antifouling “(AF coatings) en ecosistemas marinos. Tesis de Maestría. Universidad Politécnica de Madrid- Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Minas, Madrid, España.

Alzieu, CL; Sanjuan, J; Deltriel, JP & Borel, M (1986) Tin contamination in Arachon Bay: Effects on oyster shell anomalies. *Marine Pollution Bulletin*, 17: 494-498.

Alzieu, C (1991) Environmental problems caused by TBT in France: assessment, regulations, prospects. *Marine Environmental Research*, 32: 7–17.

Alzieu, C (2000a) Environmental impact of TBT: the French experience. *Science of the Total Environment*, 258: 99-102.

Alzieu, C (2000b) Impact of tributyltin on marine invertebrates. *Ecotoxicology*, 9: 71-76.

Alzieu, C (2003) Le bassin d'Arcachon et le tributylétain: conchyliculture et peintures antisalissures. *Océanis*, 27: 239-255.

Anderson, R (1987) *Sample, Pretreatment and Separation*, John Wiley & Sons, London.

Antizar-Ladislao, B (2008) Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT) contaminated marine environment: a review. *Environment International*, 34: 292–308.

Arias, AH (2008) Comportamiento de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en aguas, sedimentos y organismos de la zona interna del estuario de Bahía Blanca. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

Arnold, CG; Weidenhaupt, A; David, MM; Müller, SR; Haderlein, SB & Schwarzenbach, RP (1997) Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environmental Science & Technology*, 31(9): 2596-2602.

Arnold, CG; Berg, M; Müller, SR; Dommann, U & Schwarzenbach, RP (1998) Determination of organotin compounds in water, sediments, and sewage sludge using perdeuterated internal standards, accelerated solvent extraction, and large-volume-injection GC/MS. *Analytical Chemistry*, 70 (14): 3094-3101.

Arrieché, D; Licet, B; García, N; Lodeiros, C & Prieto, A (2002) Índice de condición, gonádico y de rendimiento del mejillón marrón *Perna perna* (Bivalvia: Mytilidae): del Morro de Guarapo-Venezuela. *Interciencia*, 27(11): 613-619.

Ayanda, OS; Fatoki, OS; Adekola, FA & Ximba, BJ (2012) Fate and remediation of organotin compounds in seawaters and soils. *Chemical Science Transactions*, 1(3): 470-481.

Baldini, MD; Cubitto, MA; Chiarello MN & Cabezalí CB (1999) Water quality for aquaculture development in Bahía Blanca estuary. Argentina. *Bacteriological studies. Revista Argentina de Microbiología*, 31: 19-24 (PMID:10327456).

Bancon-Montigny, C; Lespes, G & Potin-Gautier, M (2000) Improved routine speciation of organotin compounds in environmental samples by pulsed flame photometric detection. *Journal of Chromatography A*, 896(1): 149-158.

Bao, VW; Leung KMY; Qiu, J-W & Lam, MHW (2011) Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. *Marine Pollution Bulletin*, 62: 1147-1151.

Barnes, RD; Bull, AT & Poller, RC (1973) Studies on the persistence of the organotin fungicide fenitrothion acetate (triphenyltin-acetate) in the soil and on surfaces exposed to light. *Pesticide Science*, 4: 305-317.

Barroso, CM; Mendo, S & Moreira, MH (2004) Organotin contamination in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from Portuguese coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*, 48(11): 1149-1153

Batley, GE (1996) The distribution and fate of tributyltin in the marine environment. In: de Mora, S. J. (Ed.), *Tributyltin: a Case Study of an Environmental Contaminant*, Cambridge Environmental Chemistry Series. Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 139-165.

Becker, G; Janák, K; Colmsjö, A & Östman, C (1997) Speciation of organotin compounds released from poly (vinyl chloride) at increased temperature by gas chromatography with atomic emission detection. *Journal of Chromatography A*, 775(1): 295-306.

Bennett, RF (1996) Industrial manufacture and applications of tributyltin compounds. In: De Mora, S.J. (Ed.), *Tributyltin: a Case Study of an environmental Contaminant*, Cambridge Environmental Chemistry Series, Cambridge Univ. Press, Cambridge, pp. 21-61.

Berg, M; Arnold, CG; Müller, SR; Mühlemann, J & Schwarzenbach, RP (2001) Sorption and desorption behavior of organotin compounds in sediment-pore water systems. *Environmental Science & Technology*, 35(15): 3151-3157.

Blunden, SJ & Chapman, A (1986) Organotin compounds in the environment. In: Craig, P.J. (Ed.), *Organometallic Compounds in the Environment*, Longman, London, pp. 111-159.

Blunden, SJ; Hobbs, LA & Smith, PJ (1984) The environmental chemistry of organotin compounds. In: Bowen, H.J.M. (Ed.), *Environmental Chemistry*. The Royal Society of Chemistry, London, pp.49-77.

Blunden, SJ & Evans, CJ (1990) Organotin compounds. In: Hutzinger, O. (Ed.), *The Handbook of Environmental Chemistry. Vol 3, Part E, Anthropogenic Compounds*. Springer, Berlin, pp. 1-44.

Botté, SE (2005) El rol de la vegetación en el ciclo biogeoquímico de metales pesados, en humedales del estuario de Bahía Blanca. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

Boxall, ABA; Comber, SD; Conrad, AU; Howcroft, J & Zaman, N (2000) Inputs, monitoring and fate modelling of antifouling biocides in UK estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, 40: 898–905.

Braga Castro I, Arroyo MF, Gomes Costa P & Fillmann G (2012) Butyltin Compounds and Imposex Levels in Ecuador. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 62: 68–77.

Bryan, GW; Gibbs, PE; Burt, GR & Hummerstone, G (1987) The effects of tributyltin (TBT) accumulation on adult dog-whelks *Nucella lapillus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 67: 525–544.

Buggy, CJ & Tobin, JM (2006) Seasonal and spatial distributions of tributyltin in surface sediment of the Tolka Estuary, Dublin, Ireland. *Environmental Pollution*, 143(2): 294-303.

Cao, D; Jiang, G; Zhou, Q & Yang, R (2009) Organotin pollution in China: an overview of the current state and potential health risk. *Journal of environmental management*, 90: S16-S24.

Caprari, JJ (2006) Capítulo 12: Pinturas Antiincrustantes. En: Darrigran & Damborenea (Eds.) *Bio-invasión del mejillón dorado en el continente americano*. Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP), La Plata, Argentina.

Carpinteiro Botana, J (2005) Contribución a la determinación de contaminantes polares en muestras medioambientales mediante microextracción en fase sólida y cromatografía de gases. Tesis de grado. Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Química, Santiago de Compostela, España.

Carvalho, PN; Pinto, LF; Basto, MCP & Vasconcelos, MTSD (2007) Headspace solid-phase micro-extraction and gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry method for butyltin analysis in sediments: Optimization and validation. *Microchemical Journal*, 87: 147–153.

Ceulemans, M & Adams, FC (1995) Evaluation of sample preparation methods for organotin speciation analysis in sediments—focus on monobutyltin extraction. *Analytica Chimica Acta*, 317(1): 161-170.

Chagot, D; Alzieu, C; Sanjuan, J & Grizel, H (1990) Sublethal and histopathological effects of trace levels of tributyltin fluoride on adults oysters *Crassostrea gigas*. *Aquatic Living Resources*, 3: 121-130.

Chambers, LD; Stokes, KR; Walsh, FC & Wood, RJ (2006) Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surface and Coatings Technology*, 201(6): 3642-3652.

Champ, MA (2000) A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Science of the Total Environment*, 258: 21-71.

Champ, MA & Seligman, PF (1996) An introduction to organotin compounds and their use in antifouling coatings. In: Champ, M.A., Seligman, P.F. (Eds.), *Organotin-Environmental Fate and Effects*. Chapman & Hall, London, pp.1-25.

Chandrinou, S; Stasinakis, AS; Thomaidis, NS; Nikolaou, A & Wegener, JW (2007) Distribution of organotin compounds in the bivalves of the Aegean Sea, Greece. *Environment International*, 33: 226–32.

Cima, F; Craig, PJ & Harrington, C (2003) Organotin compounds in the environment, In: Craig, P.J., *Organometallic compounds in the environment*, John Wiley & Sons, Chichester, pp. 101–149.

Clayton, CA; Hines, JW & Elkins, PD (1987). Detection limits with specified assurance probabilities. *Analytical Chemistry*, 59(20): 2506-2514.

Coelho, MR; Bebianno, MJ & Langston, WJ (2002) Routes of TBT uptake in the clam *Ruditapes decussatus* II. Food as vector of TBT uptake. *Marine environmental research*, 54(2): 193-207.

Colosio, C; Tomasini, M; Cairoli, S; Foa, V; Minoia, C; Marinovich, M; & Galli, CL (1991) Occupational triphenyltin acetate poisoning: a case report. *British Journal of Industrial Medicine*, 48(2): 136-139.

Commendatore, MG & Esteves, JL (2004) Natural and anthropogenic hydrocarbons in sediments of the Chubut River (Patagonia, Argentina). *Marine Pollution Bulletin*, 48: 910–918.

Crosby, MP & Gale, LD (1990) A review and evaluation of bivalve condition index methodologies with a suggested standard method. *Journal of Shellfish Research*, 9(1): 233-237.

Cuadrado, DG; Ginsberg, SS & Gómez, EA (2007) Geomorfología. En: Piccolo MC & Hoffmeyer (ed.) 3era edición. Ecosistemas del estuario de Bahía Blanca. Instituto Argentino de Oceanografía, Bahía Blanca, Argentina, ediUNS, ISBN 987-9281-96-9.

Dafforn, KA; Lewis, JA & Johnston, EL (2011) Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine Pollution Bulletin*, 62(3): 453-465.

Davenport, J & Chen, X (1987) A comparison of methods for the assessment of condition in the mussel (*Mytilus edulis* L.). *Journal of Molluscan Studies*, 53(3): 293-297.

de Carvalho Oliveira, R & Santelli, RE (2010) Occurrence and chemical speciation analysis of organotin compounds in the environment: a review. *Talanta*, 82(1): 9-24.

Delucchi, F; Tombesi, NB; Freije RH & Marcovecchio, JE (2007) Butyltin Compounds in Sediments of the Bahia Blanca Estuary, Argentina. *Environmental Monitoring and Assessment*, 132: 445–451.

Delgado Filho, VS; Lopes, PFI; Podratz, PL & Graceli, JB (2011) Triorganotin as a compound with potential reproductive toxicity in mammals. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 44(9): 958-965.

de Mora, S (2000) Contamination and pollution in the Marine Environment. *Issues in Environmental Science and Technology* N° 13 Chemistry in the Marine Environment. The Royal Society of Chemistry: 81-92.

de Mora, SJ; Fowler, SW; Cassi, R & Tolosa, I (2003) Assessment of organotin contamination in marine sediments and biota from the Gulf and adjacent region. *Marine Pollution Bulletin*, 46(4): 401-409.

de Oliveira, CR; Moscardi dos Santos, D; dos Santos Madureira, LA & Rodrigues de Marchi, MR (2010) Speciation of butyltin derivatives in surface sediments of three southern Brazilian. *The Journal of Hazardous Materials*, 181: 851–856.

Dietz, C; Sanz, J; Sanz, E & Olivas, RM (2007) Current perspectives in analyte extraction strategies for tin and arsenic speciation. *Journal of Chromatography A*, 1153: 114–129.

Diez, S; Abalos, M & Bayona, JM (2002) Organotin contamination in sediments from the Western Mediterranean enclosures following 10 years of TBT regulation. *Water Research*, 36(4): 905-918.

Diez, S; Lacorte, S; Viana, P; Barceló, D & Bayona, JM (2005) Survey of organotin compounds in rivers and coastal environments in Portugal 1999–2000. *Environmental Pollution*, 136(3): 525-536.

---



Domini, C; Vidal, L; Cravotto, G & Canals, A (2009) A simultaneous, direct microwave/ultrasound-assisted digestion procedure for the determination of total Kjeldahl nitrogen. *Ultrasonics Sonochemistry*, 16: 564-569.

dos Santos, DM; Sant'Anna, BS; Sandron DC; de Souza, SC; Cristale, J; de Marchi, MRR; & Turra, A (2010) Occurrence and behaviour of butyltins in intertidal and shallow subtidal surface sediments of an estuarine beach under different sampling conditions. *Estuar Coast Shelf Sci*, 88: 322–8.

Dowling, TM & Uden, PC (1993). Alkyltin speciation in sea water with on-line hydride conversion and gas chromatography—atomic emission detection. *Journal of Chromatography A*, 644(1): 153-160.

Dowson PH, Bubb JM, Lester JN (1993) Temporal Distribution of Organotins in the Aquatic Environment: Five Years After the 1987 UK Retail Ban on TBT Based Antifouling Paints. *Marine Pollution Bulletin*, 26: 487-494.

Ebdon, L; Hill, SJ & Rivas, C (1998) Organotin compounds in solid waste: a review of their properties and determination using high-performance liquid chromatography. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 17(5): 277-288.

Eguía López, E (2000) Patentes antiincrustantes de base vinílica y de clorocaucho aplicadas sobre estructuras artificiales en la Bahía de Santander. *Estudios e Investigaciones marinas*, vol. 1 n° 1.

Elías, R; Iribarne, O; Bremec, CS & Martínez, DE (2007) Comunidades bentónicas de fondos blandos. En: Piccolo, MC & Hoffmeyer, MS (ed.), 3era edición. *Ecosistemas del estuario de Bahía Blanca*. Instituto Argentino de Oceanografía, Bahía Blanca, Argentina, ediUNS, ISBN 987-9281-96-9.

Environment Canada: Toxic Substances Management Policy. Persistence and Bioaccumulation Criteria -Final report. EN 40-499/21995E.Ottawa, Canada 1995.

EURACHEM (1998) The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics .LGC (Teddington) Ltd, London 75 pp.

Evans, SM; Leksono, T & McKinnel, PD (1995) Tributyltin Pollution: A diminishing problem following legislation limiting the use of TBT - based anti-fouling paints. *Marine Pollution Bulletin*, 30 (1): 14-21.

Farrington, JW; Goldberg, ED; Risebrough, RW; Martin, JH & Bowen, VT (1983) US "Mussel Watch" 1976-1978: an overview of the trace-metal, DDE, PCB, hydrocarbon and artificial radionuclide data. *Environmental Science & Technology*, 17(8): 490-496.

---

Fent, K (1996a) Organotins in municipal wastewater and sewage sledge. In: Champ, M.A., Seligman, P.F. (Eds.), Organotins-Environmental Fate and Effects. Chapman & Hall, London, pp. 1-25.

Fent, K (1996b) Ecotoxicology of organotin compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, 26(1): 3-117.

Fent, K (2003) Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters*, 140: 353-365.

Fernández-Escobar, I & Bayona, JM (1997) Supercritical fluid extraction of priority organotin contaminants from biological matrices. *Analytica Chimica Acta*, 355(2): 269-276.

Fernández Severini MD (2008) Distribución y toxicidad de algunos metales pesados en el zooplancton de la zona interior del estuario de Bahía Blanca. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

Fisher, N & Reinfelder, JR (1995). The trophic transfer of metals in marine systems. In A. Tessier, & D. R. Turner (Eds.), Metal speciation and bioavailability to aquatic systems (pp. 661). Cheshchester, UK: John Wiley.

Flores, M; Bravo, M; Pinochet, H; Maxwell, P & Mester, Z (2011) Tartaric acid extraction of organotin compounds from sediment samples. *Microchemical Journal*, 98: 129–134.

Forsyth, DS; Weber, D & Cleroux, C (1992) Determination of butyltin, cyclohexyltin and phenyltin compounds in beers and wines. *Food Additives & Contaminants* 9: 161-169.

Forsyth, DS; Sun, WF & Dalgligh, K (1994) Survey of organotin compounds in blended wines. *Food Additives & Contaminants*, 11: 343-350.

Forsyth, DS & Jay, B (1997) Organotin leachates in drinking water from chlorinated polyvinyl chloride (CPVC) pipe. *Applied Organometallic Chemistry*, 11: 551-558.

Foster, PL (1977) Copper exclusion as a mechanism of heavy metal tolerance in a green alga. *Nature*, 269: 322–323.

Freeman, KR (1974) Growth, mortality and seasonal cycle OS *Mytilus edulis* in two Nova Scotian embayments. Department of the Environment, Fisheries and Marine Service, Canada, Technical Report No. 500, 112 pp.

Freije, RH; Zavatti, JR; Gayoso, AM & Asteasuain, RO (1980) Producción primaria, pigmentos y fitoplancton el estuario de Bahía Blanca. 1) Zona interior-Puerto Cuatreros. Instituto Argentino de Oceanografía Contribución Científica N° 46, 13 pp.

---

Freije, RH; Asteasuain, RO; Schmidt, AS & Zavatti, JR (1981) Relación de la salinidad y temperatura del agua con la condiciones hidrometeorológicas en la porción interna del estuario de Bahía Blanca. Instituto Argentino de Oceanografía, Contribución Científica N° 57, 20 pp.

Freije, RH & Marcovecchio, JE (2007) Oceanografía Química. En: Píccolo, M.C. & Hoffmeyer, M.S (eds.), 3era edición. Ecosistema del Estuario de Bahía Blanca, Instituto Argentino de Oceanografía, Bahía Blanca, Argentina, ediUNS, ISBN 987-9281-96-9.

Freije, RH; Spetter, CV; Marcovecchio, JE; Popovich, CA; Botté, SE; Negrin, VL; Arias, AH; Delucchi, F & Asteasuain, RO (2008) Water chemistry and nutrients of the Bahía Blanca Estuary. En: Neves, R., Baretta, J. y Mateus, M. (eds.), Perspectives on Integrated Coastal Zone Management in South America, Part C: From shallow water to the deep fjord: the study sites, IST Press, pp. 241-254.

Furdek, M; Vahčić, M; Ščančar, J; Milačić, R; Kniewald, G & Mikac, N (2012) Organotin compounds in seawater and *Mytilus galloprovincialis* mussels along the Croatian Adriatic Coast. Marine Pollution Bulletin, 64(2): 189-199.

Gallego-Gallegos, M; Garrido, ML; Muñoz Olivas, R; Baravalle, P; Baggiani, C & Cámara, C (2010) A new application of imprinted polymers: Speciation of organotin compounds. Journal of Chromatography A, 1217: 3400–3407.

Gayoso, AM (1998) Long-term phytoplankton studies in the Bahía Blanca Estuary, Argentina. ICES Journal of Marine Science, 55: 655-660.

Gayoso, AM (1999) Seasonal succession patterns of phytoplankton in the Bahía Blanca Estuary (Argentina). Botánica Marina, 42(4): 367–375.

Gelós, EM; Marcos, AO; Spagnuolo, JO & Schilizi, RA (2007) Textura y mineralogía de sedimentos. En: Píccolo, M.C. & Hoffmeyer, M.S (eds.), 3era edición. Ecosistema del Estuario de Bahía Blanca, Instituto Argentino de Oceanografía, Bahía Blanca, Argentina, ediUNS, ISBN 987-9281-96-9.

Gibbs, PE & Bryan, GW (1986) Reproductive failure in population of the dogwhelk, *Nucella lapillus*, caused by imposex induced by tributyltin from antifouling paints. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 66: 767-777.

Gibbs, PE; Pascoe, PL & Bryan, GW (1991) Tributyltin-induced imposex in stenoglossan gastropods: pathological effects on the female reproductive system. Comparative Biochemistry and Physiology, 100: 231-235.

Gomez-Ariza, JL; Morales, E & Giraldez, I (1999) Uptake and elimination of tributyltin in clams, *Venerupis decussata*. *Marine Environmental Research*, 47(4): 399-413.

Guard, HE; Cobet, AB & Coleman, WM (1981) Methylation of trimethyltin compounds by estuarine sediments. *Science*, 213: 770-771.

Guinder, VA (2011) Dinámica del fitoplancton en el estuario de Bahía Blanca y su relación con las variables ambientales en el marco del cambio climático global. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

Guinder, VA; Molinero, JC; Popovich, CA; Marcovecchio, JE & Sommer, U (2012) Dominance of the planktonic diatom *Thalassiosira minima* in recent summers in the Bahía Blanca Estuary, Argentina. *Journal of Plankton Research*, 34 (11): 995-1000.

Guinder, VA; López-Abbate, MC; Berasategui, AA; Negrin, VL; Zapperi, G; Pratolongo, PD; Fernández Severini, MD & Popovich, CA (2015) Influence of the winter phytoplankton bloom on the settled material in a temperate shallow estuary. *Oceanologia*, 57(1): 50-60.

Harino, H; O'Hara, SCM; Burt, GR; Chesman, BS & Langston, WJ (2005) Distribution of organotin compounds in tissues of mussels *Mytilus edulis* and clams *Mya arenaria*. *Chemosphere*, 58: 877-81.

Harino, H; Ohji, M; Wattayakorn, G; Adulyanukosol, K; Arai, T & Miyazaki, N (2007) Accumulation of Organotin Compounds in Tissues and Organs of Stranded Whales Along the Coasts of Thailand. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 53: 119-125.

Harrison, RM & de Mora, SJ (1996) *Introductory Chemistry for the Environmental Sciences*. 2nd edition. Cambridge Environmental Chemistry Series/7. Cambridge University Press, Reino Unido. ISBN 0521 4845 02. 373 pp.

Herzke, D; Schlabach, M & Mariussen, E (2007) Literature survey of polyfluorinated organic compounds, phosphor containing flame retardants, 3-nitrobenzanthrone, organic tin compounds, platinum and silver. *Universita NILU*.

Hindell, JS & Quinn, GP (2000) Effects of sewage effluent on the population structure of *Brachidontes rostratus* (Mytilidae) on a temperate intertidal rocky shore. *Marine and Freshwater Research*, 51: 543-551.

His, E & Robert, R (1985) Développement des véligères de *Crassostrea gigas* dans le bassin d'Arcachon. Etudes sur les mortalités larvaires. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches maritimes*, 47: 63-88.

Hoch, M (2001) Organotin compounds in the environment-an overview. Applied Geochemistry, 16: 719-743.

Hoch, M; Alonso-Azcarate, J & Lischick, M (2002) Adsorption behavior of toxic tributyltin to clay-rich sediments under various environmental conditions. Environmental toxicology and chemistry, 21(7): 1390-1397.

Hoch, M; Alonso-Azcarate, J & Lischick, M (2003) Assessment of adsorption behavior of dibutyltin (DBT) to clay-rich sediments in comparison to the highly toxic tributyltin (TBT). Environmental Pollution, 123(2): 217-227.

Hoch, M & Schwesig, D (2004) Parameters controlling the partitioning of tributyltin (TBT) in aquatic systems. Applied geochemistry, 19(3): 323-334.

Hong, HK; Takahashi, S; Min, BY & Tanabe, S (2002) Butyltin residues in blue mussels (*Mytilus edulis*) and arkshells (*Scapharca broughtonii*) collected from Korean coastal waters. Environmental Pollution, 117(3): 475-486.

Horiguchi, T; Shiraishi, H; Shimizu, M & Masatoshi, M (1997) Imposex in sea snails, caused by organotin (tributyltin and triphenyltin) pollution in Japan: a survey. Applied Organometallic Chemistry, 11: 451-455.

Hsia, MP & Liu, SM (2003). Accumulation of organotin compounds in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, collected from aquaculture sites in Taiwan. Science of the total environment, 313(1): 41-48.

Hu, JY; Zhen, HJ; Wan, Y; Gao, JM; An, W; An, LH; Jin, F & Jin, XH (2006) Trophic magnification of triphenyltin in a marine food web of Bohai Bay, north China: Comparison to tributyltin. Environmental Science & Technology, 40: 3142-3147.

Ikonomou, MG, Fernandez, MP; He, T & Cullon, D (2002). Gas chromatography–high-resolution mass spectrometry based method for the simultaneous determination of nine organotin compounds in water, sediment and tissue. Journal of Chromatography A, 975(2), 319-333.

Inaba, K; Shiraishi, H & Soma, Y (1995) Effects of salinity, pH and temperature on aqueous solubility of four organotin compounds. Water research, 29(5): 1415-1417.

IUPAC (2002) (International Union of Pure and Applied Chemistry) Analytical, applied, clinical, inorganic, and physical chemistry divisions. Interdivisional working party for harmonization of quality assurance schemes for analytical laboratories. Pure and Applied Chemistry, 835–855, 74 pp.

Jacobsen, JA & Asmund, G (2000) TBT in marine sediments and blue mussels (*Mytilus edulis*) from central-west Greenland. *Science of the total environment*, 245: 131-136.

Kannan, K; Tanabe, S; Iwata, H & Tatsukawa, R (1995) Butyltins in muscle and liver of fish collected from certain Asian and Oceanian countries. *Environmental Pollution*, 90(3): 279-290.

Karayücel, S & Karayücel, I (1997) Influence of environmental factors on condition index and biochemical composition in *Mytilus edulis* L. in cultivated-raft system, in two Scottish Sea Lochs. *Journal of Black Sea/Mediterranean Environment*, 3: (3).

Kennedy, VH.; Sánchez, AL; Oughton, DH & Rowland, AP (1997) Use of Single and Sequential Chemical Extractants to Assess Radionuclide and Heavy Metal Availability from Soils for Root Uptake. *Analyst* 122; 89R-100R.

Kerk, V; Der, GJM & Luijten, JGA (1954) Investigations on organo-tin compounds. III. The biocidal properties of organo-tin compounds. *Journal of Applied Chemistry*, 4(6): 314-319.

Kim, NS; Shim, WJ; Yim, UH; Ha, SY & Park, PS (2008) Assessment of tributyltin contamination in a shipyard area using a mussel transplantation approach. *Marine pollution bulletin*, 57(6): 883-888.

Konieczka, P; Sejerøe-Olsen, B; Linsinger, PJ & Schimmel, H (2007) Determination of tributyltin (TBT) in marine sediment using pressurised liquid extraction–gas chromatography–isotope dilution mass spectrometry (PLE–GC–IDMS) with a hexane–tropolone mixture. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388: 975–978.

Kucuksezgin, F; Aydin-Onen, S; Gonul, LT; Pazi, I & Kocak, F (2011) Assessment of organotin (butyltin species) contamination in marine biota from the Eastern Aegean Sea, Turkey. *Marine Pollution Bulletin*, 62: 1984-1988.

Langston, WJ; Burt, GR & Mingjiang, Z (1987) Tin and organotin in water, sediments, and benthic organisms of Poole Harbour. *Marine Pollution Bulletin*, 18(12): 634-639.

Langstone, WJ & Pope, ND (1995) Determinants of TBT adsorption and desorption in estuarine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 31: 62-43.

Laughlin, RB; French, W & Guard, HE (1986) Accumulation of bis (tributyltin) oxide by the marine mussel *Mytilus edulis*. *Environmental Science & Technology*, 20(9): 884-890.

Laughlin JrRB (1996) Bioaccumulation of TBT by aquatic organisms. In Organotin (pp. 331-355). Springer Netherlands.

Lawson, G (1986) Organometallic compounds in polymers-their interactions with the environment. In: Craig, P.J. (Ed.), Organometallic Compounds in the Environment. Principles and Reactions. Longman, London, pp. 308-344.

Lee, RF (1996) Metabolism of tributyltin by aquatic organisms. In Organotin (pp. 369-382). Springer Netherlands.

Lee, CC; Hsieh, CY & Tien, CJ (2006) Factors influencing organotin distribution in different marine environmental compartments, and their potential health risk. Chemosphere, 65(4): 547-559.

Lehtonen, KK; Turja, R; Budzinski, H & Devier, MH (2016) An integrated chemical-biological study using caged mussels (*Mytilus trossulus*) along a pollution gradient in the Archipelago Sea (SW Finland, Baltic Sea). Marine Environmental Research: 119, 207-221.

Lewis, JA (1999) 10th International Congress on Marine Corrosion and Fouling, University of Melbourne, February 1999. Additional Papers (No. DSTO-GD-0287). Defence Science and Technology Organisation Victoria (Australia) Aeronautical and Maritime Research Lab.

Liu, Y; Lopez-Avila, V; Alcaraz, M & Beckert, WF (1994) Off-line complexation/supercritical fluid extraction and gas chromatography with atomic emission detection for the determination and speciation of organotin compounds in soils and sediments. Analytical Chemistry, 66(21): 3788-3796.

Livingstone, DR (1991) Towards a specific index of impact by organic pollution for marine invertebrates. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 100(1): 151-155.

López-Abatte, MC (2014) Espectro trófico y consumo del microzooplancton en dos áreas con diferente presión antrópica del interior del Estuario de Bahía Blanca, Argentina. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur, Bahía blanca, Argentina.

López Gappa, JJ; Tablado, A & Magaldi, NH (1993) Seasonal changes in an intertidal community affected by sewage pollution. Environmental Pollution, 82: 157-165.

Louppis Artemis, P; Georgantelis, D; Paleologos, EK & Kontominas, MG (2010) Determination of tributyltin through ultrasonic assisted micelle mediated extraction and GFAAS: Application to the monitoring of tributyltin levels in Greek marine species. Food Chemistry, 121: 907-911.

Luan, TG; Jin, J; Chan, SMN; Wong, YS; Tam, NFY (2006) Biosorption and biodegradation of tributyltin (TBT) by alginate immobilized *Chlorella vulgaris* beads in several treatment cycles. *Process Biochemistry*, 41: 1560-1565.

Lucas, A & Beninger, PG (1985) The use of physiological condition indices in marine bivalve aquaculture. *Aquaculture*, 44(3): 187-200.

Magi, E; Liscio, C; Pistarino, E; Santamaria, B; Di Carro, M; Tiso, M; ... & Cosulich, ME (2008) Interdisciplinary study for the evaluation of biochemical alterations on mussel *Mytilus galloprovincialis* exposed to a tributyltin-polluted area. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 391(2): 671-678.

Marcovecchio, JE; Botté, SE; Delucchi, F; Arias, A; Fernández Severini, M; De Marco, S; Tombesi, N; Andrade, S; Ferrer, L & Freije, RH (2008) Pollution processes in Bahía Blanca estuarine environment. En: Neves, R., Baretta, J.W. y Mateus, M. (eds.). *Perspectives on integrated coastal zone management in South America*. IST Press. Scientific Publishers, Lisboa, Portugal, pp. 301-314.

Marcovecchio, JE; Freije RH; Botté, S; Spetter, C; Arias, A; Fernández Severini, M; Buzzi, N; De Marco, S; Negrin, V; Simonetti, P; Guinder, V; Popovich, C & Pereyra, M (2014) Programas de monitoreo en estuarios: estudios a largo plazo. En: Marcovecchio J.E. & Freije, H.R. (Eds), *Procesos Químicos en estuarios*. Editorial de la Universidad Tecnológica Nacional, Buenos Aires, pp. 415-432.

Martin, FM & Donard, OFX (1995) Aqueous ethylation of organotin compounds in simple solution for speciation analysis by cryofocussing and detection by atomic absorption spectrometry - comparison with hydride generation. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 351: 230-236.

Matthews, G (1996) *PVC: Production, Properties and Uses*. The Institute of Materials, London: 379 pp.

Meador, JP (2000) Predicting the fate and effects of tributyltin in marine systems. *Reviews of environmental contamination and toxicology*, 166: 1-48.

Meyer, A; Strajhar, P; Murer, C; Da Cunha, T & Odermatt, A (2012) Species-specific differences in inhibition of human and zebrafish 11b hydroxysteroid dehydrogenase 2 by thiram and organotins. *Toxicology*, 301: 72-78.

Michaud, MH & Pelletier, E (2006) Sources and fate of butyltins in the St. Lawrence Estuary ecosystem. *Chemosphere*, 64: 1074-1082.



Michel, P & Averty, B (1999) Distribution and fate of tributyltin in surface and deep waters of the northwestern Mediterranean. *Environmental Science & Technology*, 33(15): 2524-2528.

Morabito, R (1995) Speciation of organotin compounds in environmental matrices. *Microchemical Journal*, 51(1): 198-206.

Namiesnik, J; Moncheva, S; Park, YS; Ham, KS; Heo, BG; Tashma, Z; Katrich, E & Gorinstein, S (2008) Concentration of bioactive compounds in mussels *Mytilus galloprovincialis* as an indicator of pollution. *Chemosphere*, 73(6): 938-944.

Neng, NR; Santalla, RP & Nogueira, JMF (2014) Determination of tributyltin in environmental water matrices using stir bar sorptive extraction with in-situ derivatisation and large volume injection-gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 126: 8–11.

Nesci, S; Ventrella, V; Trombetti, F; Pirini, M & Pagliarani, A (2011) Tributyltin (TBT) and mitochondrial respiration in mussel digestive gland. *Toxicology in Vitro*, 25: 951–959.

Nichols, JA (1988) Antifouling paints: use on boats in San Diego Bay and a way to minimize adverse impacts. *Environmental Management*, 12: 243–247.

Nishikimi, A; Kira, Y; Kasahara, E; Sata, EF; Kanno, T; Utsumi, K & Inoue, M (2001) Tributyltin interacts with mitochondria and induces cytochrome c release. *Biochemical Journal*, 356: 621–626.

O'Connor, TP (2002) National distribution of chemical concentrations in mussels and oysters in the USA. *Marine Environmental Research*, 53(2): 117-143.

Ohji, M; Arai, T; Midorikawa, S; Harino, H; Masuda, R & Miyazaki, N (2007) Distribution and fate of organotin compounds in Japanese coastal waters. *Water, Air, & Soil Pollution*, 178: 255-65.

Okoro, HK; Fatoki, OS; Adekola, FA; Ximba, BJ & Snyman, RG (2016). Spatio-temporal variation of organotin compounds in seawater and sediments from Cape Town harbour, South Africa using gas chromatography with flame photometric detector (GC-FPD). *Arabian Journal of Chemistry*, 9(1), 95-104.

Oliva, AL (2015) Acumulación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs) en sedimentos y mejillines (*Brachidontes rodriguezii*) del Estuario de Bahía Blanca. Tesis Doctoral. Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina.

Olushola Sunday, A; Abdullahi Alafara, B & Godwin Oladele, O (2012) Toxicity and speciation analysis of organotin compounds. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 24(4): 216-226.

OMI (1999) *Sistemas antiincrustantes: hacia una solución no tóxica. La OMI al Día*. Organización Marítima Internacional. Londres, Reino Unido. Mayo 1999, 32 pp.

Orban, E; Di Lena, G; Navigato, T; Casini, I; Marzetti, A & Caproni, R (2002) Seasonal changes in meat content, condition index and chemical composition of mussels (*Mytilus galloprovincialis*) cultured in two different Italian sites. *Food Chemistry*, 77(1): 57-65.

Ordenanza n° 4/98. Prefectura Naval Argentina (PNA) (1998) *Normas para la Prevención de la Contaminación de las Aguas Proveniente de Embarcaciones Deportivas y de Placer. Disposiciones para los Clubes Náuticos, Guarderías, Puertos Recreativos y Astilleros de Embarcaciones, Régimen para la protección del medio ambiente. Tomo 6*, Buenos Aires.

OSPAR (2004). *OSPAR/ICES Workshop on the evaluation and update of background reference concentrations (B/RCs) and ecotoxicological assessment criteria (EACs) and how these assessment tools should be used in assessing contaminants in water, sediment and biota*, Final report, OSPAR commission.

Pagliarani, A; Nesci, S; Trombetti, F & Ventrella, V (2010) Organotin effects on membrane-bound ATPase activities. En: Chin, H.F. (ed.). *Organometallic Compounds: Preparation Structure and Properties*. Nova Science Publishers Inc, New York, pp. 225-253.

Pérez-Roa, RE & Anderson, MA (2007) *Biofouling: la carga indeseada*. Universidad de Wisconsin-Madison (USA)

Perillo, GME & Piccolo, MC (1991) Tidal response in the Bahía Blanca estuary, Argentina. *The Journal of Coastal Research*, 7(2): 437-449.

Perillo, GME (1995) Definitions and geomorphologic classifications of estuaries, Chapter 2. En: Perillo G.M.E. (ed.), *Geomorphology and sedimentology of estuaries. Developments in sedimentology 53*, 17-47, Elsevier Science BV, Amsterdam.

Perillo, GME; Piccolo, MC; Parodi, ER & Freije, RH (2001) The Bahía Blanca Estuary ecosystem: a review. En: Seelinger, U., Lacerda, L. y Kjerve, B. (eds.), *Coastal Marine Ecosystems of Latin America*, Springer Verlag, pp. 205-217.

Perillo, GME (2007) ¿Por qué Bahía Blanca es un estuario?. En: Piccolo, MC & Hoffmeyer, MS (ed.), 3era edición. Ecosistemas del estuario de Bahía Blanca. Instituto Argentino de Oceanografía, Bahía Blanca, Argentina, ediUNS, ISBN 987-9281-96-9.

Perillo, GME; Piccolo, MC; Palma, ED; Pérez, DE & Pierini, JO (2007) Oceanografía física En: Piccolo, MC & Hoffmeyer, MS (ed.), 3era edición. Ecosistemas del estuario de Bahía Blanca. Instituto Argentino de Oceanografía, Bahía Blanca, Argentina, ediUNS, ISBN 987-9281-96-9.

Piccolo, MC & Perillo, GME (1990) Physical characteristics of the Bahía Blanca estuary (Argentina). Estuarine, Coastal and Shelf Science, 31: 303-317.

Piccolo, MC; Perillo, GME y Melo, WD (2008) The Bahía Blanca Estuary: an integrated overview of its geomorphology and dynamics. En: Neves, R., Baretta, J. y Mateus, M. (eds.), Perspectives on Integrated Coastal Zone Management in South America, Part C: From shallow water to the deep fjord: the study sites, IST Press, pp. 219-229

Pinochet, H; Tessini, C; Bravo, M; Quiroz, W & De Gregori, I (2009) Butyltin compounds and their relation with organic matter in marine sediments from San Vicente Bay-Chile. Environmental Monitoring and Assessment, 155: 341-53.

Policloruro de vinilo (PVC). Instituto do PVC, Vila Olímpia-São Paulo: Cappuccino. Recuperado de <http://www.eis.uva.es/~macromol/curso03-04/PVC/historiaPVC.html>. [Consulta, Martes 2 de Febrero de 2016].

Popovich, CA; Spetter, CV; Marcovecchio, JE & Freije, RH (2006) Nutrient availability during winter diatom bloom in a turbid and shallow estuary (Bahía Blanca, Argentina). Journal of Coastal Research, 95-102.

Popovich, CA (2007) Fitoplancton. En: Piccolo, M.C. & Hoffmeyer, M.S (eds.), 3era edición. Ecosistema del Estuario de Bahía Blanca, Instituto Argentino de Oceanografía, Bahía Blanca, Argentina, ediUNS, ISBN 987-9281-96-9.

Popovich, CA & Marcovecchio, JE (2008) Spatial and temporal variability of phytoplankton and environmental factors in a temperate estuary of South America (Atlantic coast, Argentina). Continental Shelf Research, 28: 236-244.

Pribyl DW (2010) A critical review of the conventional SOC to SOM conversion factor. Geoderma, 156 (3): 75-83.

Prieto, A; Zuloaga, O; Usobiaga, A; Etxebarria, N; Fernández, LA; Marcic, C & de Diego, A (2008) Simultaneous speciation of methylmercury and butyltin species in

environmental samples by headspace-stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1185: 130–138.

Quevauviller, P; Bruchet, A & Donard OFX (1991) Leaching of organotin compounds from poly(vinyl chloride) (PVC) material. *Applied Organometallic Chemistry*, 5: 125-129.

Quintas, PY; Oliva, AL; Buzzi, N; Arias, AH; Domini, CE; Alvarez, MB; Garrido, M & Marcovecchio, JE (2014) “Compuestos organoestánicos presentes en ambiente marino-costero: aspectos generales” en el libro *Geoquímica de la Superficie Argentina*. Editorial de la Universidad Nacional del Sur. Ediuns, 2014. ISBN 978-987-655-027-7, 183-209 pp.

Rajendran, RB.; Tao, H; Nakazato, T & Miyazaki, A (2000) A quantitative extraction method for the determination of trace amounts of both butyltin and phenyltin compounds in sediments by gas chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analyst*, 125: 1757-1763.

Randall, L & Weber, JH (1986) Adsorptive behavior of butyltin compounds under simulated estuarine conditions. *Science of the Total Environment*, 57: 191-203.

Ranke, J & Jastorff, B (2000) Multidimensional risk analysis of antifouling biocides. *Environmental Science and Pollution Research*, 7(2): 105-114.

Reader, S & Pelletier, E (1992) Biosorption and degradation of butyltin compounds by the marine diatom *Skeletonema costatum* and the associated bacterial community at low temperature. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 48: 599-607.

Reed, RH & Moffat, L (1983) Copper toxicity and copper tolerance in *Enteromorpha compressa* (L) Grev.. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 69: 85–103.

Regoli, L; Chan, HM; de Lafontaine, Y & Mikaelian, I (2001) Organotins in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) and sediments of the Quebec City Harbour area of the St. Lawrence River. *Aquatic toxicology*, 53: 115-126.

Rosenberg, E (2005) Speciation of tin (pp. 422-463). John Wiley & Sons, Ltd.

Rudel, H (2003) Case study: bioavailability of tin and tin compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 180-9.

Ruiz, JM; Barreiro, R; Couceiro, L & Quintela, M (2008) Decreased TBT pollution and changing bioaccumulation pattern in gastropods imply butyltin desorption from sediments. *Chemosphere*, 73(8): 1253-1257.

Safa, F & Hadjmohammadi, MR (2005) Simultaneous optimization of the resolution and analysis time in micellar liquid chromatography of phenyl thiohydantoin amino acids using Derringer's desirability function. *Journal of Chromatography A*, 1078: 42-50.

Salazar, MH & Salazar, SM (1991) Assessing site-specific effects of TBT contamination with mussel growth rates. *Marine Environmental Research*, 32: 131-150.

Salazar, MH & Salazar, SM (1996) Mussels as bioindicators: effects of TBT on survival, bioaccumulation, and growth under natural conditions. In *Organotin* (pp. 305-330). Springer Netherlands.

Salomons, W & Förstner, U (1984) *Metals in the hydrocycle* (p. 349).

Salomons, W; Förstner, U & Mader, P (Eds.) (1995) *Heavy metals. Problems and Solutions*, Springer-Verlag, Berlin.

Santos MM, Vieira N, Reis-Henriques MA, Santos AM, Gomez-Ariza JL, Giraldez I, Ten Hallers-Tjabbes CC (2004) Imposex and butyltin contamination off the Oporto Coast (NW Portugal): a possible effect of the discharge of dredged material. *Environ int* 30(6): 793-798.

Segovia-Martínez, L; Bouzas-Blanco, A; Campíns-Falcó, P & Seco-Torrecillas, A (2010) Improving detection limits for organotin compounds in several matrix water samples by derivatization-headspace-solid-phase microextraction and GC-MS. *Talanta*, 80: 1888-1893.

Seligman, PF; Valkirs, AO; Stang, PM & Lee, RF (1988) Evidence for rapid degradation of tributyltin in a marina. *Marine pollution bulletin*, 19: 531-534.

Seligman PF, Maguire RJ, Lee RF, Hinga KR, Valkirs AO, Stang PM (1996) Persistence and fate of tributyltin in aquatic ecosystems. In: Champ, M.A., Selignam, P.F., *Organotin – Environmental Fate and Effects*, Chapman and Hall, London, pp. 429-457.

Sherman, L (2011) PLAEN - Plásticos, Envasado y Afines, Estabilizantes Térmicos: El cambio a las alternativas está en marcha: Tendencias y Nuevos Desarrollos. Los factores clave en Estaño Organicos. SpecialChem. Recuperado de: <http://plaen.blogspot.com.ar/2011/06/estabilizantes-termicos-el-cambio-las.html> [Consulta, Martes 2 de Febrero de 2016].

Shim, WJ; Oh, JR; Kahng, SH; Shim, JH & Lee, SH (1999) Horizontal distribution of butyltins in surface sediments from an enclosed bay system, Korea. *Environmental Pollution*, 106(3): 351-357.

Shlens, J (2009) A tutorial on Principal Component Analysis. New York: Center for neural Science, New York University

Sousa, A; Laranjeiro, F; Takahashi, S; Tanabe, S & Barroso, CM (2009a) ImPOSEX and organotin prevalence in a European post-legislative scenario: Temporal trends from 2003 to 2008. *Chemosphere*, 77: 566–573.

Sousa, A; Ikemoto, T; Takahashi, S; Barroso, C & Tanabe, S (2009b) Distribution of synthetic organotins and total tin levels in *Mytilus galloprovincialis* along the Portuguese coast. *Marine pollution bulletin*, 58(8): 1130-1136.

Strickland, JDH & Parsons, TR (1968) A practical handbook of seawater analysis. Stevenson, J.C. (ed.). Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, Bulletin 167, 311 pp.

Suzuki, S; Matsuda, R & Saito, Y (1992) Molecular species of tri-n-butyltin compounds in marine products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1437-1443.

Szpunara, J; Ceulemans, M; Schmit, VO; Adams, FC & Łobiński, R (1996) Microwave-accelerated speciation analysis for butyltin compounds in sediments and biomaterials by large volume injection capillary gas chromatography quartz furnace atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 332: 225–232.

Tack, FMG & Verloo, MG (2001) Guidelines for sampling in Flanders (Belgium). *Science of the Total Environment*, 264(1-2): 187-191.

Takahashi, S; Mukai, H; Tanabe, S; Sakayama, K; Miyazaki, T & Masuno, H (1999) Butyltin residues in livers of humans and wild terrestrial mammals and in plastic products. *Environmental Pollution*, 106: 213-218.

Takeuchi, M; Mizuishi, K & Hobo, T (2000) Determination of Organotin Compounds in Environmental Samples. *Analytical Sciences*, 16(4): 349-359.

Tanabe, S; Prudente, MS; Kan-Atireklap, S & Subramanian, A (2000) Mussel watch: marine pollution monitoring of butyltins and organochlorines in coastal waters of Thailand, Philippines and India. *Ocean & Coastal Management*, 43(8): 819-839.

Tang, CH; Hsu, CH & Wang, WH (2010) Butyltin accumulation in marine bivalves under field conditions in Taiwan. *Marine environmental research*, 70(2): 125-132.

Ten Halls-Tjabbes, CC (1997) Tributyltin and policies for antifouling. *Environmental Technology*, 18(12): 1265-1268.

Tessier, A & Turner, DR (1995), eds. "Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems", John Wiley & Sons, Chichester.

Thomas, KV (2001) The environmental fate and behaviour of antifouling paint booster biocides: a review. *Biofouling*, 17: 73–86.

Thomas, K (2009) The use of broad-spectrum organic biocides in marine antifouling paints. In: Hellio, C., Yebra, D. (Eds.), *Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp. 522–553.

Titley-O'Neal, CP; Munkittrick, KR & Macdonald, BA (2011) The effects of organotin on female gastropods. *Journal of Environmental Monitoring*, 9: 2360-88.

Tolosa, I; Readman, JW; Blaevoet, A; Ghilini, S; Bartocci, J & Horvat, M (1996). Contamination of Mediterranean (Cote d'Azur) coastal waters by organotins and Irgarol 1051 used in antifouling paints. *Marine Pollution Bulletin*, 32(4), 335-341.

Town, RM & Filella, M (2002) Implications of natural organic matter binding heterogeneity on understanding lead (II) complexation in aquatic systems. *Science of the Total Environment*, 300(1): 143-154.

Tsang, CK; Lau, PS; Tam, NFY & Wong, YS (1999) Biodegradation capacity of tributyltin by two *Chlorella* species. *Environmental Pollution*, 105: 289-297.

Tsunoi, S; Matoba, T; Shioji, H; Harino, H & Tanaka, M (2002) Analysis of organotin compounds by grignard derivatization and gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 962(1): 197-206.

Ure, AM (1996) Single Extraction Schemes for Soil Analysis and Related Applications. *Science of The Total Environment*, 178: 3-10.

UNEP/IOC/IAEA (1994) (United Nations Environment Programme/ Intergovernmental Oceanographic Commission/ International Atomic Energy Agency) Determination of organotins in environmental samples. Reference methods for marine pollution studies, no. 59. UNEP, pp 23–30.

Unger, M A; MacIntyre, WG & Huggett, RJ (1988) Sorption behavior of tributyltin on estuarine and freshwater sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 7(11): 907-915.

Üveges, M; Rodríguez-González, P; García, AJI; Sanz-Medel, A & Fodor, P (2007) Isotope dilution analysis mass spectrometry for the routine measurement of butyltin compounds in marine environmental and biological samples. *Microchemical Journal*, 85: 115–21.

Vallarino, EA; Rivero, MS; Gravina, MC & Elías, R (2002) The community-level response to sewage impact in intertidal mytilid beds of the Southwestern Atlantic, and the

use of the Shannon index to assess pollution. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 37: 25-33.

Vasic, V; Momic, T; Petkovic, M & Krstic, D (2008) Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase as the target enzyme for organic and inorganic compounds. *Sensors*, 8: 8321-8360.

Vella, AJ; Mintoff, B & Axiak, V (2000) Analytical aspects of the gas chromatographic determination of tributyltin and metabolites in environmental samples. *Science of the Total Environment*, 258(1): 81-88.

Villez, K; Steppe, K & De Pauw, DJ (2009) Use of Unfold PCA for on-line plant stress monitoring and sensor failure detection. *Biosystems Engineering*, 103(1): 23-34.

Voulvoulis, N; Scrimshaw, MD & Lester, JN (1999) Alternative antifouling biocides. *Applied Organometallic Chemistry*, 13: 135-143.

Wang, X; Hong, H; Zhao, D & Hong, L (2008) Environmental behavior of organotin compounds in the coastal environment of Xiamen, China. *Marine Pollution Bulletin*, 57: 419-424.

Wasik, A & Ciesielski, T (2004) Determination of organotin compounds in biological samples using accelerated solvent extraction, sodium tetraethylborate ethylation, and multicapillary gas chromatography–flame photometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(5) 1357-1363.

Weidenhaupt, A; Arnold, C; Müller, SR; Haderlein, SB & Schwarzenbach, RP (1997) Sorption of organotin biocides to mineral surface. *Environmental Science & Technology*, 31: 2603-2609.

WHO, 1990. World Health Organization, 1990. Tributyltin Compounds. United Nations Environment Programme-World Health Organization, Environmental Health Criteria 116, World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Wu, W; Roberts, RS; Chung, YC; Ernst, WR & Havlicek, SC (1989) The extraction of organotin compounds from polyvinyl chloride pipe. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 18: 839-843.

Xiao, Q; Hu, B & He, M (2008) Speciation of butyltin compounds in environmental and biological samples using headspace single drop microextraction coupled with gas chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1211: 135-141.

Yáñez, J; Riffo, P; Mansilla, HD; Bravo, M; Quiroz, W & Santander, P (2016). Speciation analysis of organotin compounds (OTCs) by a simultaneous hydride



generation–liquid/liquid extraction and GC–MS determination. *Microchemical Journal*, 126, 460-465.

Yildiz, H; Palaz, M & Bulut, M (2006) Condition Indices of Mediterranean Mussels (*Mytilus galloprovincialis* L. 1819) Growing on Susspended Ropes in Dardanelles. *Journal of Food Science and Technology*, 4(3): 221-224.

Yngve, V (1940) US Patent 2219463.

Young, DR; Alexander, GV & McDermott-Ehrlich, DU (1979) Vessel-related contamination of Southern California harbours by copper and other metals. *Marine Pollution Bulletin*, 10: 50-56.

Yu, ZH; Sun, JQ; Jing, M; Cao, X; Lee, F & Wang, XR (2010) Determination of total tin and organotin compounds in shellfish by ICP-MS. *Food Chemistry*, 119(1): 364-367.

Zhou, QF; Li, ZY; Jiang, GB & Yang, RQ (2003) Preliminary investigation of a sensitive biomarker of organotin pollution in Chinese coastal aquatic environment and marine organisms. *Environmental Pollution*, 125: 301-4.

Zuykov, M; Pelletier, E & Harper, DAT (2013) Bivalve mollusks in metal pollution studies: From bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere* 93 (2): 201-208.