



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

## **PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**DETERMINACIÓN DE PRODUCTOS DE CUIDADO PERSONAL EN LECHUGA MEDIANTE  
TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS MINIATURIZADAS SEGUIDA DE  
CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

**TESIS**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**Q. JERÓNIMO ALEJANDRO CABRERA PERALTA**

**TUTORA**

**DRA. ARACELI PATRICIA PEÑA ÁLVAREZ**

**FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**México CDMX, junio, 2017**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# **Jurado**

**PRESIDENTE:**                    **Dra. Josefina de Gyves Marciniak**

**VOCAL:**                            **Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero**

**VOCAL:**                            **Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez**

**VOCAL:**                            **Dr. Germán Buitrón Méndez**

**SECRETARIO:**                    **Dra. Martha Patricia García Camacho**

## **LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL PROYECTO:**

Laboratorio 101, Departamento de Química Analítica, División de Estudios de Posgrado,  
Edificio B, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, México, CDMX.

## **TUTORA**

---

Dra. Araceli P. Peña Álvarez

## **SUSTENTANTE**

---

Q. Jerónimo A. Cabrera Peralta

# **Agradecimientos**

A mi familia y amigos por su apoyo incondicional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Química y a la Dra. Araceli Peña Álvarez por la formación que me fue otorgada.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (No. becario: 576777).

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por los proyectos PAPIIT: IN 218116 y PAIP: 5000-9026 Fac. Química, UNAM.

*Este trabajo fue presentado en el VI Congreso Iberoamericano de Química Analítica y Encuentro Nacional de Química Ambiental (15 al 18 de noviembre de 2016, Cancún, México) y será presentado en el 19<sup>th</sup> International Symposium on Advances in Extraction Technologies (27 al 30 de junio de 2017, Santiago de Compostela, España).*

## Resumen

Los productos de cuidado personal (PCP) son compuestos que forman parte de la formulación en jabones, champús, perfumes, desinfectantes, cremas para la piel y repelentes de insectos. Estos compuestos están clasificados como “contaminantes emergentes”. Las plantas de tratamiento de aguas residuales no remueven eficientemente los residuos de PCP desechados al drenaje, por lo que éstos persisten en el efluente. La irrigación de cultivos con agua tratada produce la transferencia de PCP a los vegetales, lo que representa un peligro potencial debido a su tendencia a la bioacumulación y efectos de disrupción endócrina. Se desarrollaron y optimizaron dos metodologías para la determinación simultánea de PCP (galaxolida, tonalida, oxibenzona, 4-metil-benciliden canfor, padimato-o, 2-etilhexil metoxicinamato, octocrileno, triclosán y metiltriclosán) en hojas de lechuga mediante dispersión de matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés) seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (MSPD-GC-MS) y extracción asistida por ultrasonido-microextracción en fase sólida (UAE-SPME, por sus siglas en inglés), seguidas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (UAE-SPME-GC-MS). Se obtuvieron para MSPD-GC-MS aceptables límites de detección y cuantificación; LD (25-100 ng g<sup>-1</sup>) y LC (100-200 ng g<sup>-1</sup>), buena precisión; %CV (<22.74) y linealidad R<sup>2</sup> (>0.9729). Por otro lado, para UAE-SPME-GC-MS se obtuvieron excelentes límites de detección y cuantificación; LD (1-25 ng g<sup>-1</sup>) y LC (5-80 ng g<sup>-1</sup>), adecuada precisión %CV (<24.46) y linealidad R<sup>2</sup> (>0.9648). Se cultivó lechuga irrigada con agua fortificada con los contaminantes en estudio y se analizó aplicando la metodología desarrollada y optimizada que presentó más ventajas, UAE-SPME-GC-MS, ya que fue más sensible, rápida, fácil, y requirió menor manipulación que el método MSPD-GC-MS. En las hojas de lechuga cultivada irrigada con PCP se identificaron 5 analitos: galaxolida, tonalida, 4-metil-benciliden canfor, 2-etilhexil metoxicinamato y metiltriclosán. También se analizaron las raíces de la misma lechuga, identificando a siete de los nueve contaminantes en estudio. Las dos metodologías propuestas en este estudio son una alternativa para el análisis de PCP en lechuga a nivel de trazas que presentan ventajas frente a metodologías tradicionales de análisis, contribuyendo a la miniaturización y la química verde en Química Analítica.

# Índices

|   |    |
|---|----|
| 1. Introducción .....   | 11 |
| 2. Antecedentes .....   | 12 |
| 2.1. Contaminantes emergentes .....                             | 12 |
| 2.2. Productos de cuidado personal.....                         | 13 |
| 2.2.1. Filtros UV .....   | 14 |
| 2.2.2. Almizcles.....   | 16 |
| 2.2.3. Agentes antimicrobianos.....                             | 18 |
| 2.2.4. Repelentes de insectos.....                              | 20 |
| 2.2.5. Conservadores.....                                       | 22 |
| 2.3. Sorción de PCP a plantas .....                             | 23 |
| 2.3.1. Uso de agua tratada y biosólidos en la agricultura ..... | 23 |
| 2.3.2. Transferencia de PCP a plantas .....                     | 25 |
| 2.4. Cromatografía de gases-espectrometría de masas.....        | 26 |
| 2.4.1. Cromatografía de gases.....                              | 26 |
| 2.4.2. Espectrometría de masas .....                            | 27 |
| 2.5. Preparación de muestras .....                              | 28 |
| 2.5.1. Extracción asistida por ultrasonido .....                | 30 |
| 2.5.2. Microextracción en fase sólida.....                      | 31 |
| 2.5.3. Dispersión de matriz en fase sólida.....                 | 34 |
| 2.6. Antecedentes experimentales .....                          | 36 |
| 3. Justificación .....  | 41 |
| 4. Objetivos .....  | 41 |
| 5. Desarrollo experimental.....                                 | 42 |
| 5.1. PCP estudiados .....                                       | 42 |
| 5.2. Reactivos, materiales y equipo .....                       | 42 |
| 5.3. Pretratamiento de muestras.....                            | 46 |
| 5.4. Condiciones cromatográficas .....                          | 47 |
| 5.5. Determinación de PCP en lechuga mediante MSPD-GC-MS.....   | 47 |
| 5.5.1. Procedimiento de MSPD-GC-MS .....                        | 48 |

|  |     |
|--|-----|
| 5.5.2. Optimización de MSPD-GC-MS .....  | 49  |
| 5.5.3. Validación del método .....   | 50  |
| 5.6. Determinación de PCP en lechuga mediante UAE-SPME-GC-MS .....                     | 52  |
| 5.6.1. Procedimiento de UAE-SPME-GC-MS .....   | 52  |
| 5.6.2. Optimización de UAE.....  | 54  |
| 5.6.3. Optimización de SPME .....  | 54  |
| 5.6.4. Validación del método .....   | 55  |
| 5.7. Análisis de lechuga irrigada con agua fortificada.....                            | 57  |
| 5.8. Análisis de la raíz de las lechugas cultivadas.....                               | 58  |
| 6. Resultados y discusión .....  | 59  |
| 6.1. Derivatización.....   | 59  |
| 6.2. Determinación de PCP en lechuga mediante MSPD-GC-MS.....                          | 59  |
| 6.2.1. Optimización de MSPD-GC-MS .....  | 60  |
| 6.2.2. Validación del método .....   | 63  |
| 6.3. Determinación de PCP en lechuga mediante UAE-SPME-GC-MS .....                     | 65  |
| 6.3.1. Optimización de UAE.....  | 65  |
| 6.3.2. Optimización de SPME .....  | 66  |
| 6.3.3. Validación del método .....   | 69  |
| 6.4. Comparación de MSPD-GC-MS y UAE-SPME-GC-MS en el análisis de PCP en lechuga ..... | 73  |
| 6.5. Análisis de lechugas cultivadas en el laboratorio.....                            | 76  |
| 6.6. Análisis de la raíz de las lechugas cultivadas.....                               | 79  |
| 7. Conclusiones.....   | 82  |
| 8. Referencias.....  | 83  |
| Anexo I.....   | 90  |
| Anexo II.....  | 92  |
| Anexo III.....   | 94  |
| Anexo IV .....   | 96  |
| Anexo V .....  | 99  |
| Anexo VI .....   | 101 |
| Anexo VII .....  | 105 |

## Índice de tablas

|   |    |
|---|----|
| Tabla 1. Toxicidad de algunas familias o compuestos utilizados en filtros UV, almizcles y agentes antimicrobianos. ....   | 21 |
| Tabla 2. Concentraciones de los filtros UV, almizcles y agentes antimicrobianos detectados con mayor frecuencia en aguas superficiales, influente y efluente de PTAR y biosólidos. .... | 37 |
| Tabla 3. Análisis de PCP en tejidos de plantas. ....  | 38 |
| Tabla 4. Estructura y propiedades fisicoquímicas de los PCP estudiados. ....  | 43 |
| Tabla 5. m/z para la identificación y cuantificación de los analitos en modo SIM. ....  | 48 |
| Tabla 6. Concentraciones evaluadas en la curva de calibración del análisis de PCP en lechuga mediante MSPD-GC-MS. ....  | 52 |
| Tabla 7. Concentraciones evaluadas en la curva de calibración del análisis de PCP en lechuga mediante UAE-SPME-GC-MS. ....  | 57 |
| Tabla 8. Resultados de la validación para la determinación de PCP en lechuga mediante MSPD-GC-MS. ....  | 64 |
| Tabla 9. Resultados de la validación para la determinación de PCP en lechuga mediante UAE-SPME-GC-MS. ....  | 71 |
| Tabla 10. Comparación de sensibilidad, precisión, linealidad y recobro de las metodologías para el análisis de PCP en lechuga mediante GC-MS. ....                                      | 74 |
| Tabla 11. Identificación de PCP en lechuga cultivada irrigada con PCP. ....   | 79 |
| Tabla 12. Identificación de PCP en la raíz de lechuga cultivada irrigada con PCP mediante UAE-SPME-GC-MS. ....  | 81 |

## Índice de figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Clasificación de los filtros UV orgánicos dependiendo de su estructura química.....   | 15 |
| Figura 2. Almizcles sintéticos más representativos de los nitroalmizcles, almizcles policíclicos y almizcles macrocíclicos.....       | 17 |
| Figura 3. Estructura química y propiedades de triclosán y metiltriclosán. ....  | 20 |
| Figura 4. Estructura química de los principales ingredientes activos utilizados en repelentes de insectos.....                        | 22 |
| Figura 5. Estructura general de los parabenos.....  | 23 |
| Figura 6. Modos de extracción en SPME.....  | 32 |
| Figura 7. Esquema del procedimiento general de la MSPD.....   | 34 |
| Figura 8. Procedimiento optimizado para la determinación de PCP en lechuga mediante MSPD-GC-MS.....                                   | 49 |
| Figura 9. Procedimiento optimizado para la determinación de PCP en lechuga mediante UAE-SPME-GC-MS.....                               | 53 |
| Figura 10. Crecimiento de lechuga cultivada control.....  | 58 |
| Figura 11. Reacción de derivatización de BP-3 y TC con MTBSTFA.....   | 59 |
| Figura 12. Análisis por MSPD-GC-MS en modo SIM de un blanco de lechuga variando el disolvente de elución. ....                        | 61 |
| Figura 13. Análisis por MSPD-GC-MS en modo SIM de lechuga comercial fortificada a 100 ng g <sup>-1</sup> con los PCP estudiados. .... | 62 |
| Figura 14. Análisis por UAE-SPME-GC-MS en modo SIM de lechuga comercial. ....   | 67 |
| Figura 15. Análisis por SPME-GC-MS en modo SIM de agua. ....  | 69 |
| Figura 16. Análisis por UAE-SPME-GC-MS en modo SIM de lechuga cultivada en el laboratorio. ....                                       | 78 |
| Figura 17. Análisis por UAE-SPME-GC-MS en modo SIM de raíz de lechuga cultivada en el laboratorio. ....                               | 80 |

# Listado de abreviaturas

|   |   |
|---|---|
| 4-MBC: 4-metil-benciliden canfor                      | MSPD: Dispersión de matriz en fase sólida           |
| 2-EHMC: 2-hetilhexil metoxicinamato                   | MTC: Metiltriclosán                                 |
| AHTN: Tonalida  | O-PABA: Padimato-o                                  |
| BP-3: Oxibenzona                                      | OCT: Octocrileno                                    |
| CAR: Carboxen   | PA: Poliacrilato                                    |
| CV: Coeficiente de variación                          | PCP: Productos de cuidado personal                  |
| DEET: N,N-dietil-m-toluamida                          | PDMS: Polidimetilsiloxano                           |
| DVB: Divinilbenceno                                   | PLE: Extracción con líquidos presurizados           |
| EUA: Estados Unidos de América                        | PTAR: Plantas de tratamiento de aguas residuales    |
| FDA: Administración de Comida y Medicamentos de EUA   | SBSE: Extracción por sorción en barra magnética     |
| GC: Cromatografía de gases                            | SIM: Monitoreo selectivo de iones                   |
| HHCB: Galaxolida                                      | SPE: Extracción en fase sólida                      |
| HPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficiencia    | SPME: Microesctracción en fase sólida               |
| IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada | TC: Triclosán                                       |
| LC: Límite de cuantificación                          | UAE: Extracción asistida por ultrasonido            |
| LD: Límite de detección                               | USEPA: Agencia de Protección Ambiental de EUA       |
| LLE: Extracción líquido-líquido                       | UPLC: Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia |
| MS: Espectrometría de masas                           | UV: Ultravioleta                                    |

# 1. Introducción

Se clasifica como “emergentes” a los contaminantes que han sido identificados recientemente por lo que no han sido cuantificados, su toxicidad no ha sido estudiada y no existen normatividades que los regulen en el medio ambiente.<sup>1,2</sup> Los productos de cuidado personal (PCP) son contaminantes emergentes provenientes de productos utilizados para la higiene personal como champús, jabones, perfumes, cremas para la piel, cosméticos, repelentes de insectos y desinfectantes. Después de su uso, los PCP terminan en las aguas residuales, sin embargo, las plantas de tratamiento de agua no los eliminan eficientemente por lo que persisten en el efluente.<sup>3</sup> La irrigación de cultivos con agua tratada, práctica común en regiones áridas y semiáridas, produce la transferencia de los PCP a las plantas, donde se bioacumulan debido sus propiedades hidrofóbicas.<sup>4</sup>

Los estudios de cultivos hidropónicos han determinado que la sorción de los PCP a las plantas depende de las propiedades fisicoquímicas de los contaminantes. En forma molecular, la sorción de los compuestos hidrofóbicos a la raíz es mayor, mientras que la sorción de los iones es más lenta. Una vez en la raíz, los compuestos menos hidrofóbicos son más propensos a migrar a las hojas de las plantas.<sup>5,6</sup>

Debido a que varios PCP han mostrado efectos de disrupción endócrina, su determinación en el medio ambiente es de suma importancia.<sup>7</sup> La determinación de compuestos a nivel de trazas en plantas presenta un desafío debido al alto contenido de pigmentos y materiales grasos que pueden producir interferencias en el análisis. Por tal motivo, un prerrequisito para la determinación de contaminantes en plantas es utilizar técnicas de preparación de muestra que eliminen estas interferencias y preconcentren a los analitos.<sup>8</sup> Las técnicas de preparación de muestra miniaturizadas son una alternativa a las tradicionales y se basan en disminuir el tamaño de muestra, eliminación o reducción del volumen de disolvente y establecer sistemas en línea; siendo además sensibles, precisas, sencillas y rápidas.<sup>9</sup>

En este trabajo se desarrollaron y optimizaron dos metodologías para la determinación de ocho PCP y el metabolito principal de uno de ellos en lechuga mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

## 2. Antecedentes

### 2.1. Contaminantes emergentes

Durante siglos, el ser humano ha realizado actividades que ocasionan la aparición de contaminantes en el medio ambiente. Se conoce como “contaminante” a toda sustancia que altera nocivamente la pureza o las condiciones normales de un medio.<sup>10</sup> Varios contaminantes han sido bien estudiados por lo que se conoce su concentración y toxicidad en el medio ambiente. Estos contaminantes son conocidos como “prioritarios” y, gracias a la amplia información acerca de ellos, se han impuesto normativas que indican el límite máximo al que puede estar cada compuesto en el medio ambiente sin causar efectos nocivos.<sup>11</sup>

Por otro lado, existen contaminantes que han sido identificados recientemente, por lo que no han sido cuantificados y su toxicidad no ha sido bien estudiada. A éstos se les conoce como “contaminantes emergentes”.<sup>1,2</sup> La presencia de un contaminante emergente en el medio ambiente no es necesariamente reciente ya que en algunos casos se encuentran desde hace décadas, pero fueron detectados hasta que el avance de las técnicas analíticas lo permitió.<sup>12,13</sup>

Dependiendo de sus características fisicoquímicas los contaminantes emergentes pueden ser clasificados en: orgánicos (ej. biotoxinas, retardantes de llama, productos farmacéuticos y de cuidado personal y pesticidas), inorgánicos (ej. trazas de metales) y contaminantes de partícula (ej. nanopartículas y microplásticos).<sup>12,13</sup>

A pesar de que no todos los contaminantes emergentes tienen el potencial de ser nocivos al medio ambiente,<sup>14</sup> varios de ellos son disruptores endócrinos,<sup>11</sup> es decir, compuestos exógenos que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, metabolismo, funcionamiento o eliminación de hormonas sanguíneas responsables del homeóstasis, reproducción o desarrollo de un organismo.<sup>15</sup> Adicionalmente, la presencia de estos compuestos en el medio ambiente es preocupante debido a que aparecen simultáneamente como una mezcla compleja, lo que podría ocasionar efectos sinérgicos no deseados.<sup>16</sup>

### 2.2. Productos de cuidado personal

Los productos de cuidado personal (PCP) son compuestos orgánicos presentes en productos de higiene usados diariamente en la vida humana como lociones, geles, cosméticos, jabones, detergentes, cremas, desodorantes y champús. En general, los PCP están diseñados para su aplicación externa por lo que después de su uso son lavados del cuerpo sin sufrir alteraciones metabólicas, terminando en las aguas residuales.<sup>7</sup>

Debido a que los PCP sólo son parcialmente degradados en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) su presencia persiste en el efluente que, en ocasiones, es descargado a las aguas superficiales (por ejemplo: ríos, lagos o lagunas) dispersando los PCP al medio ambiente.<sup>5,17,18</sup> Adicionalmente, varios PCP también tienden a sorberse en el sedimento de las PTAR, que en algunas ocasiones es utilizado como abono en la agricultura, provocando la introducción de los contaminantes al suelo y aguas subterráneas.<sup>5</sup>

Los PCP son considerados actualmente como contaminantes emergentes.<sup>10-19</sup> Aunque se ha determinado que la concentración de PCP en el medio ambiente ( $\text{ng L}^{-1}$ ,  $\mu\text{g L}^{-1}$  o  $\text{mg L}^{-1}$ )<sup>2,19</sup> suele ser menor que el nivel de aplicación, muchos de estos contaminantes son altamente hidrofóbicos ( $\log K_{ow} > 3.5$ )<sup>19</sup> por lo que se bioacumulan en plantas y animales.<sup>17</sup> Algunos PCP han demostrado efectos de disrupción endócrina<sup>7,18</sup> por lo que el estudio de su presencia y toxicidad en el medio ambiente ha aumentado en los últimos años.

A pesar de que los PCP se encuentran entre los contaminantes más detectados en aguas superficiales a nivel internacional, el estudio de su presencia y toxicidad en el medio ambiente ha sido menor al de otros contaminantes emergentes.<sup>7,18</sup> Debido a esto, es necesario desarrollar metodologías que proporcionen información confiable acerca de los PCP en el ambiente.

De acuerdo con la literatura, los PCP se dividen en cinco grupos: filtros ultravioleta, almizcles, agentes antimicrobianos, repelentes de insectos y conservadores.<sup>7-19</sup> Este trabajo se enfoca en el estudio de los primeros tres PCP. Algunos de estos compuestos no son usados solamente en los productos de cuidado personal ya que también son aplicados en pinturas, comida, plásticos y otros productos de índole industrial; por lo que su descarga al medio ambiente puede ser aún mayor de la esperada.<sup>7,18,20</sup>

### 2.2.1. Filtros UV

Los filtros ultravioleta o “filtros UV” son PCP que se encuentran en bloqueadores solares y cosméticos para la protección de la piel contra la radiación UVA (315-400 nm), UVB (280-315 nm) y/o UVC (100-280 nm).<sup>17</sup> Los filtros UV inorgánicos (por ejemplo, ZnO y TiO<sub>2</sub>) reflejan y dispersan la radiación, mientras que los orgánicos (por ejemplo, las oxibenzonas) normalmente contienen anillos aromáticos y grupos metoxi o carbonil que les permiten absorber la radiación UV.<sup>7,17,20</sup> Éstos últimos son utilizados con mayor frecuencia, en mayores cantidades y su toxicidad puede ocasionar un gran impacto ambiental<sup>20</sup> por lo que en el presente trabajo sólo se estudian los filtros UV orgánicos.

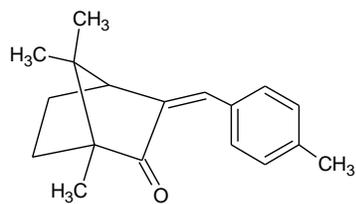
Los filtros UV pueden ser clasificados dependiendo de su estructura química en: derivados de benzofenona, derivados del ácido p-aminobenzoico, salicilatos, metoxicinamatos, derivados de alcanfor, derivados de triazina, derivados de benzotriazol, derivados de benzimidazol y derivados de otros compuestos.<sup>20,21</sup> En la **Figura 1** se muestra un ejemplo de cada uno de estos grupos.

Los filtros UV orgánicos más utilizados son: los derivados de benzofenona BP-1, BP-2 y BP-3, ácido 2-fenilbencimidazol-5-sulfónico (PBSA), 4-metil-bencideno alcanfor (4-MBC), 2-etilhexil-p-metoxicinamato (2-EHMC), isoamil metoxicinamato (IAMC), octocrileno, padimato-O (O-PABA), homosalato y octinoxato.<sup>17,18</sup> Al igual que otros PCP, los filtros UV no son utilizados exclusivamente en productos cosméticos ya que los mismos compuestos también son aplicados en productos textiles, pinturas y plásticos.<sup>13,22</sup>

Los filtros UV orgánicos normalmente se encuentran en los cosméticos en concentraciones del 0.1 al 10 %, <sup>21</sup> sin embargo, la mayoría de ellos son compuestos hidrofóbicos (log K<sub>ow</sub> 4-8) por lo que tienden a bioacumularse en organismos vivos y, debido a que presentan anillos aromáticos conjugados, son relativamente estables a la biodegradación.<sup>17,18</sup>

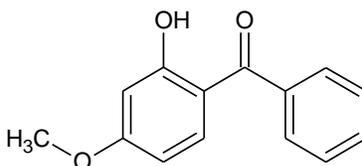
## Antecedentes

### Derivados de benzofenonas



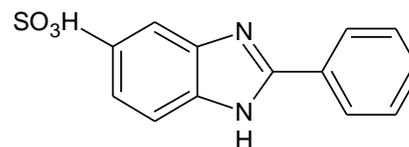
*Oxibenzona*

### Derivados de alcanfor



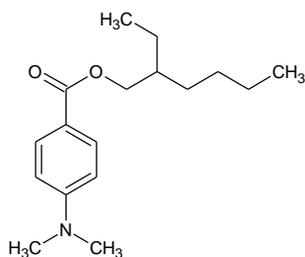
*4-metilbenciliden canfor*

### Derivados de benzimidazol



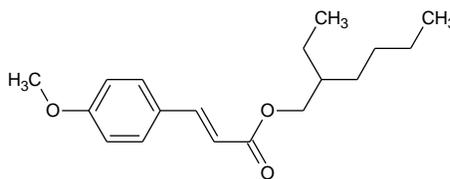
*Ácido 2-fenil-5-benzimidazol sulfónico*

### Derivados de ácido p-aminobenzóico



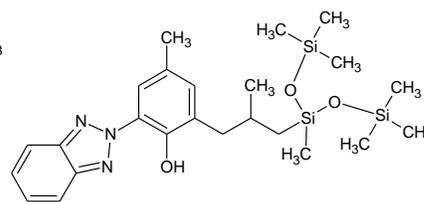
*Padimato-O*

### Metoxicinamatos



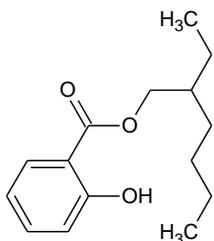
*2-etilhexil metoxicinamato*

### Derivados de benzotriazol



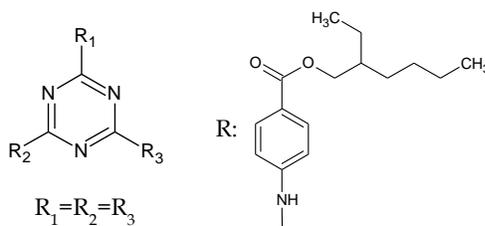
*Drometrizol trisiloxano*

### Salicilatos



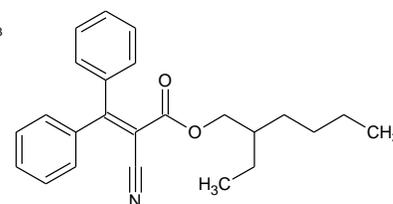
*Salicilato de 2-etilhexilo*

### Derivados de triazina



*Dietilhexil butamido triazona*

### Otros



*Octocrileno*

**Figura 1.** Clasificación de los filtros UV orgánicos dependiendo de su estructura química.

Se ha determinado que varios filtros UV orgánicos son disruptores endócrinos.<sup>7,17,18</sup> Particularmente, se ha observado que los derivados de benzofenonas producen disrupción estrogénica, androgénica y hacia otros receptores nucleares; los derivados de alcanfor hacia receptores estrogénicos, androgénicos y de progesterona; los metoxicinamatos hacia receptores estrogénicos, de hormonas tiroideas y otros receptores nucleares.<sup>23</sup> Se ha reportado que la actividad estrogénica de los filtros UV orgánicos más comunes se encuentra en el rango de compuestos utilizados por sus propiedades estrogénicas como el estradiol.<sup>18</sup> Debido a que la transformación bioquímica de los filtros UV puede cambiar los efectos de

disrupción endócrina de estos compuestos, es necesario realizar estudios de los posibles metabolitos formados en diferentes organismos.

A pesar del impacto ambiental que pueden ocasionar los filtros UV, la Administración de Comida y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) de EUA permite el uso de 16 filtros UV en la elaboración de cosméticos, mientras que el Comité Científico de Productos del Consumidor de la Unión Europea permite el uso de 27 filtros UV.<sup>23</sup>

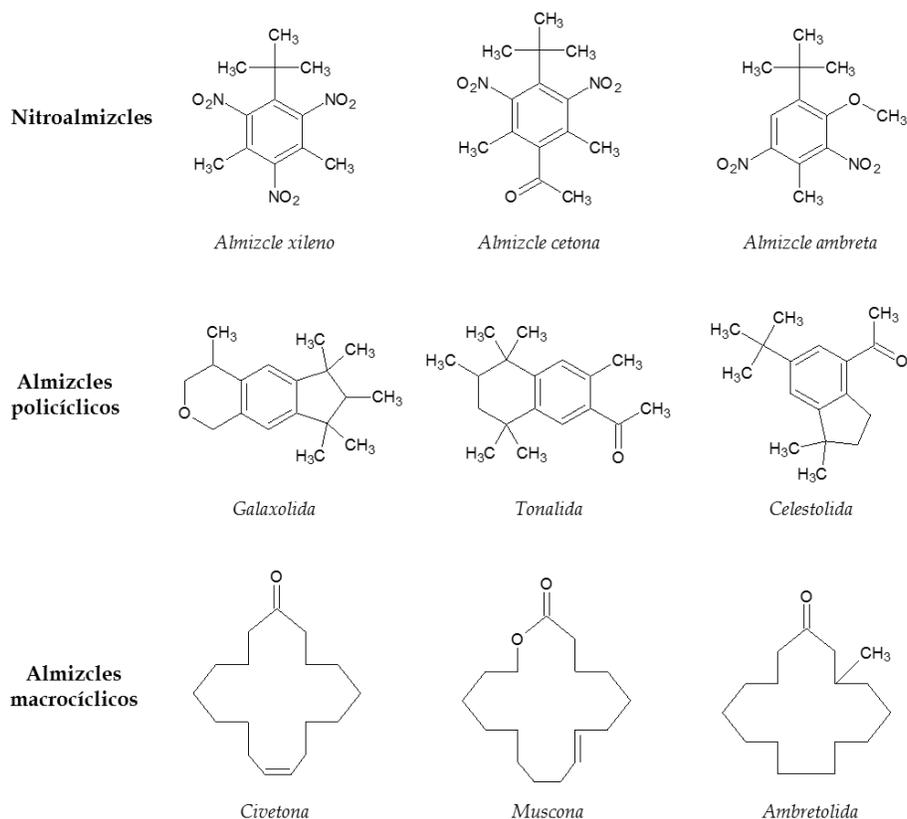
Se han determinado residuos de filtros UV orgánicos en diversas matrices como agua de río, mar y subterránea, influente y efluente de PTAR, sedimentos, pescados, leche humana y placenta.<sup>22,23</sup> Varios estudios han determinado que la descarga del efluente de PTAR a ríos, lagos y mares es la fuente principal de filtros UV en aguas superficiales, sin embargo, las actividades recreativas como la natación en albercas o cuerpos de agua naturales también es un factor importante debido al uso de bloqueadores solares.<sup>22,24</sup> Por esto, las temporadas de nado son un factor importante en la acumulación de filtros UV en tejidos de organismos acuáticos.<sup>25</sup>

### 2.2.2. Almizcles

Los almizcles son compuestos utilizados en la industria de las fragancias debido a sus propiedades aromáticas y a su habilidad de reducir la volatilidad de otros compuestos, aumentando el tiempo de vida de los aromas en diversos productos.<sup>26,27</sup> Son utilizados en cosméticos, jabones e incluso comida.<sup>28</sup> Debido a que los almizcles naturales se encuentran solamente en algunas plantas y animales, su obtención es costosa e involucra la sobreexplotación de dichas especies. Debido a esto, la síntesis de almizcles sintéticos que reemplazaran a los naturales cobró una gran importancia a inicios del siglo pasado.<sup>26</sup>

Los almizcles sintéticos se encuentran entre los compuestos más utilizados en la industria de las fragancias<sup>18</sup> y son considerados ubicuos, persistentes y, en ocasiones, tóxicos.<sup>29</sup> Los almizcles sintéticos más importantes son: nitroalmizcles, almizcles policíclicos y almizcles macrocíclicos.<sup>7-18,26,29</sup> A pesar de que los nitroalmizcles y los almizcles policíclicos presentan una estructura química diferente a la de los almizcles naturales, poseen propiedades

aromáticas similares.<sup>26</sup> En la **Figura 2** se muestran las estructuras químicas de almizcles sintéticos característicos de cada grupo.



**Figura 2.** Almizcles sintéticos más representativos de los nitroalmizcles, almizcles policíclicos y almizcles macrocíclicos.

Los primeros almizcles sintéticos fueron los nitroalmizcles: derivados de benceno sustituidos con dos o tres grupos nitro y grupos alquil, metoxi o cetonas. Los nitroalmizcles fueron los almizcles sintéticos más utilizados por muchos años debido a su bajo costo de producción, sin embargo, debido al descubrimiento de su presencia en el medio ambiente y a su toxicidad potencial (fototóxica, neurotóxica, cancerígena y estrogénica), su aplicación en la industria fue prohibida o regulada.<sup>26,30</sup> Los nitroalmizcles más utilizados son: almizcle cetona, almizcle xileno, almizcle ambreta, almizcle tibetano y almizcle mosqueno.<sup>26,29</sup>

La disminución en la producción de nitroalmizcles fue paralela al aumento de los almizcles policíclicos: compuestos tricíclicos o derivados de indano, tetralina o cumarina.<sup>26</sup> Actualmente, son los almizcles sintéticos más producidos a nivel mundial.<sup>7,17,30</sup> Debido a que se ha determinado la presencia de almizcles policíclicos en el medio ambiente en concentraciones aún mayores a las de los nitroalmizcles, estos compuestos están siendo evaluados para su posible regulación o prohibición en la industria. Los almizcles policíclicos más utilizados son: galaxolida, tonalida, celestolida, fantolida, cashmeran y traseolida.<sup>26</sup> Galaxolida y tonalida se encuentran en la lista de compuestos de alto volumen de producción de la agencia de protección ambiental (USEPA, por sus siglas en inglés) de EUA, con más de 450 toneladas producidas en EUA por año.<sup>31</sup>

La caracterización de los almizcles naturales demostró que los compuestos que contribuyen mayoritariamente a sus propiedades aromáticas tienen estructuras químicas conformadas por anillos macrocíclicos de 15 o 17 constituyentes con cetonas o lactonas. Debido a la estabilidad, fijación de aromas y olor de alta calidad de los almizcles naturales, se buscó sintetizarlos para abastecer la demanda industrial, sin embargo, la síntesis normalmente consta de varios pasos y es complicada por lo que no son muy utilizados en la actualidad. Al ser compuestos similares a los encontrados en la naturaleza, parecen ser más amigables con el medio ambiente, presentando una biodegradación mayor a la de los otros almizcles sintéticos.<sup>30</sup> Los almizcles macrocíclicos sintéticos más utilizados son: civetona, muscona, ambretolida y exaltolida.<sup>26</sup>

Debido a que los  $K_{ow}$  de los nitroalmizcles (4.0-4.4) y almizcles policíclicos (5.4-5.9) es alto,<sup>17</sup> estos compuestos tienden a bioacumularse en sedimentos y tejido graso.<sup>7,27,32</sup> Debido a que la toxicidad crónica de los almizcles sintéticos no es bien conocida se prevé que la determinación de estos contaminantes en el medio ambiente y los estudios toxicológicos correspondientes sean áreas importantes para los años siguientes.

### 2.2.3. Agentes antimicrobianos

Los agentes antimicrobianos son PCP adicionados en jabones, pastas de dientes, desodorantes y cremas para la piel que matan o previenen el crecimiento de microorganismos

(bacterias, virus, hongos o protozoarios). Los dos agentes antimicrobianos más utilizados a nivel mundial son triclosán y triclocarbán. Ambos se encuentran entre los 10 compuestos orgánicos más detectados en las PTAR.<sup>7,17,18</sup>

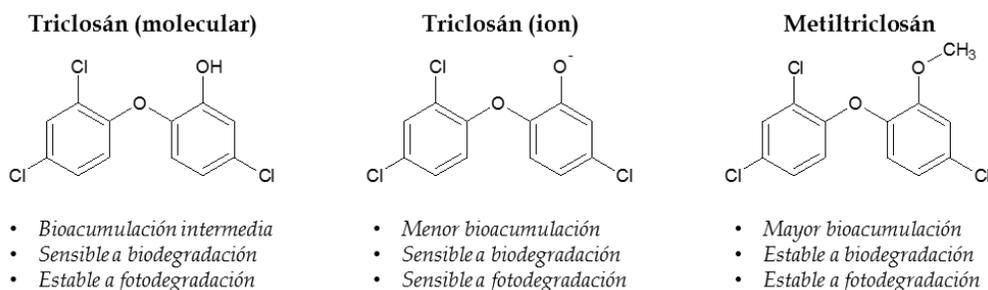
Al igual que otros PCP, triclosán y triclocarbán son compuestos hidrofóbicos detectados comúnmente en los sedimentos de las PTAR, sin embargo, ambos compuestos también han demostrado ser persistentes en el agua.<sup>17</sup> A pesar de que triclocarbán se ha encontrado con mayor frecuencia y en mayores concentraciones en agua que triclosán, la toxicidad de triclosán es mayor que la de otros desinfectantes.<sup>7</sup> Adicionalmente, triclosán se descompone en subproductos tóxicos más persistentes y con mayor toxicidad, por lo que su determinación en el medio ambiente es de gran importancia.

Triclosán es un agente microbiano de amplio espectro que ha sido detectado en agua, sedimentos, plantas y fluidos biológicos como orina, sangre y leche materna. Triclosán tiene diversos efectos tóxicos como: irritación de la piel, incremento de respuestas alérgicas, disrupción endócrina (estrogénica, antiestrogénica, androgénica y antitiroidea) incremento de la resistencia a antibióticos y formación de subproductos cancerígenos, por lo que se ha cuestionado su seguridad y efectividad, ocasionando su regulación en diversos productos.<sup>33-36</sup>

Al ser un compuesto con propiedades ácido-base ( $pK_a=7.8$ ), el impacto ambiental de triclosán depende del pH del medio.<sup>7</sup> Se ha observado que triclosán es ligeramente más tóxico en su forma molecular que como ion.<sup>37</sup> La acidez del medio también influye en la absorción de triclosán ya que, debido a que es un compuesto hidrofóbico ( $K_{ow}=4.76$ ), en forma molecular es más propenso a sorberse a sedimentos o tejidos grasos.<sup>34,35</sup>

Se ha reportado que aproximadamente el 90% de triclosán en agua que entra a las PTAR con un sistema de lodos activados es removido del agua. De este porcentaje, del 40 al 60% se debe a la biodegradación aeróbica mientras que lo restante se debe a la sorción al sedimento. Aproximadamente, el 5% de triclosán es degradado a metiltriclosán, sin embargo, este metabolito es más hidrofóbico ( $K_{ow}=5.2$ ) y persistente, por lo que es más propenso a la bioacumulación en organismos vivos.<sup>33-36,38</sup>

A pesar de la alta resistencia de triclosán a pH altos y bajos, este compuesto es fotosensible (probablemente en su forma iónica),<sup>35</sup> debido al gran coeficiente de absorción molar que presenta.<sup>34</sup> Algunos de los subproductos de la fotólisis de triclosán son clorofenoles y dioxinas,<sup>33</sup> siendo estas últimas consideradas como una de las familias de compuestos más cancerígenas.<sup>38</sup> Adicionalmente, en las PTAR que utilizan cloro para la desinfección del agua, el triclosán remanente puede formar derivados clorados que a su vez son fotodegradados a dioxinas cloradas.<sup>35</sup> En la **Figura 3** se presenta la estructura química y algunas propiedades de triclosán y metiltriclosán.



**Figura 3.** Estructura química y propiedades de triclosán y metiltriclosán.

En la **Tabla 1** se resume la toxicidad de algunas familias y compuestos utilizados en filtros UV, almizcles y agentes antimicrobianos.

### 2.2.4. Repelentes de insectos

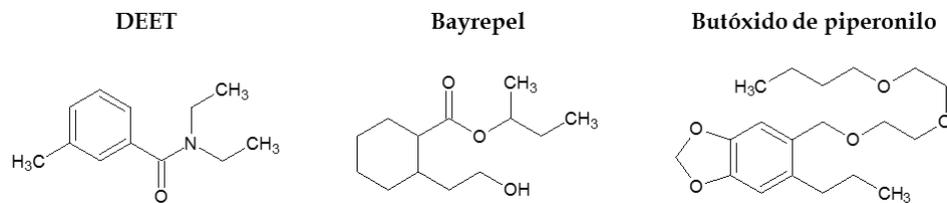
N,N-dietil-m-toluamida (DEET) es el ingrediente activo más utilizado en los repelentes de insectos, cuyo uso anual supera los 1.8 millones de kilogramos. Su funcionamiento se basa en la interferencia a los insectos en la detección del ácido láctico de su huésped. DEET ha sido detectado en agua superficial y subterránea en todo el mundo.<sup>7</sup>

## Antecedentes

**Tabla 1.** Toxicidad de algunas familias o compuestos utilizados en filtros UV, almizcles y agentes antimicrobianos.

|                        | <b>Familia/compuesto</b>         | <b>Toxicidad</b>  |
|------------------------|----------------------------------|---|
| <b>Almizcles</b>       | <b>Nitroalmizcles</b>            | Neuronal, cancerígenos, disrupción endócrina (actividad estrogénica), potencian toxicidad de otros compuestos. <sup>26,39</sup>               |
|                        | <b>Policíclicos</b>              | Quimio sensibilizadores (interfieren en el transporte membranal de compuestos metabólicos y xenobióticos). <sup>40</sup>                      |
| <b>Filtros UV</b>      | <b>Derivados de benzofenonas</b> | Disrupción endócrina (androgénica y hacia otros receptores nucleares). <sup>23</sup>  |
|                        | <b>Derivados de alcanfor</b>     | Disrupción endócrina (hacia receptores estrogénicos, androgénicos y de progesterona). <sup>23</sup>   |
|                        | <b>Metoxicinamatos</b>           | hacia receptores estrogénicos, de hormonas tiroideas y otros receptores nucleares. <sup>23</sup>  |
| <b>Antimicrobianos</b> | <b>Triclosán</b>                 | Irritación, incrementa respuestas alérgicas, disrupción endócrina (estrogénica, antiestrogénica, androgénica, antitiroidea). <sup>33-36</sup> |

Otros compuestos también usados en repelentes de insectos son bayrepel y butóxido de piperonilo. A diferencia de otros PCP, los repelentes de insectos no siempre tienden a bioacumularse en organismos vivos ya que sus  $K_{ow}$  se encuentran entre 1.6 y 4.1, por lo que algunos persisten en agua. <sup>7,17</sup> La toxicidad de estos contaminantes no ha sido bien estudiada, principalmente a largo plazo, por lo que se espera que futuras investigaciones se enfoquen en esto. <sup>18</sup> En la **Figura 4** se presenta la estructura química de los principales compuestos usados como principio activo en los repelentes de insectos.



**Figura 4.** Estructura química de los principales ingredientes activos utilizados en repelentes de insectos.

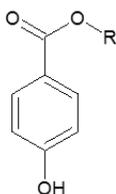
### 2.2.5. Conservadores

Los conservadores son compuestos utilizados en fármacos, comida y productos de higiene o cuidado personal para evitar su descomposición, aumentando su tiempo de vida. Los conservadores más utilizados en la actualidad son los parabenos, que son ésteres del ácido p-hidroxibenzóico. Los parabenos son utilizados ampliamente como conservadores debido a que tienen un pH neutro, son inodoros e insípidos, no causan la decoloración o endurecimiento del producto y son de bajo costo.<sup>7,17,18</sup>

Específicamente, siete parabenos son utilizados como conservadores: bencil, butil, etil, isobutil, isopropil, metil y propilparabeno. De los anteriores, metil y propilparabeno son los más utilizados y comúnmente son aplicados en un mismo producto para potenciar su efecto como conservador.<sup>7</sup> La estructura general de los parabenos se muestra en la **Figura 5**.

Hasta ahora, no existen muchos estudios que determinen la presencia de parabenos en el medio ambiente, lo que es preocupante debido a que algunos de estos compuestos pueden causar disrupción endócrina, incluso a bajos niveles de exposición.<sup>7,17,18</sup> La toxicidad de los parabenos parece estar relacionada con el tamaño de la cadena de sus sustituyentes. El amplio uso internacional de los parabenos, así como su toxicidad potencial ha llevado a la búsqueda de compuestos más inocuos que los reemplacen como conservadores.<sup>7</sup>

## Parabenos



Donde *R* es una cadena alifática con diferente número de carbonos o diferente distribución espacial para cada parabeno

**Figura 5.** Estructura general de los parabenos.

## 2.3. Sorción de PCP a plantas

### 2.3.1. Uso de agua tratada y biosólidos en la agricultura

Como se mencionó anteriormente, las PTAR no degradan eficientemente a la mayoría de los PCP por lo que estos contaminantes persisten en el efluente o en los sedimentos generados durante el tratamiento del agua. Al irrigar sembradíos con agua tratada o utilizar los sedimentos generados como abono, los PCP son transferidos al suelo y posteriormente a las plantas, generando un riesgo para los organismos que los ingieran. Debido a que se ha reportado que el consumo anual promedio de vegetales de un ser humano en ciertos países es de 100kg, <sup>41</sup> la determinación de PCP en plantas ha cobrado una gran importancia.

La irrigación de sembradíos utilizando agua tratada es una práctica ampliamente utilizada en la actualidad para atenuar la escasez de agua producida por los efectos del cambio climático (por ejemplo, lluvias irregulares), el rápido aumento de la población y el crecimiento de la urbanización. <sup>42,43</sup> Particularmente, es una actividad muy común en regiones áridas o semiáridas en las que las principales fuentes de agua son la pluvial y la subterránea. <sup>44</sup>

Una práctica más riesgosa es la irrigación de cultivos utilizando aguas negras, es decir, aguas residuales sin tratamiento. Debido a la alta cantidad de materia orgánica presente en las aguas negras, el riego de cultivos con ésta produce un aumento en la fertilidad del suelo, sin embargo, los vegetales cultivados de esta manera pueden ocasionar diferentes infecciones al ser ingeridos, ocasionando que no sea una práctica recomendable. Adicionalmente, los contaminantes que son parcialmente eliminados en el tratamiento del agua, como los PCP, son aplicados directamente a los cultivos, aumentando el riesgo de su toxicidad. En 1994,

México fue el segundo país a nivel mundial en ocupar un mayor volumen de aguas negras en la agricultura, por lo que la presencia de contaminantes en vegetales puede ser mayor que en otros países.<sup>45</sup>

Usar agua tratada para la irrigación de cultivos es más recomendable que desecharla en aguas superficiales ya que las propiedades físicas, químicas y biológicas del efluente (como pureza, pH y presencia de microorganismos) puede afectar a la flora y fauna acuáticas. En regiones áridas cercanas a la costa como la península arábiga, la irrigación con agua tratada permite utilizar el agua desalinizado, cuya producción es cuatro veces más cara, para consumo humano.<sup>44</sup>

La irrigación de sembradíos con agua tratada no sólo presenta la desventaja de transferir los contaminantes presentes en el efluente a suelos y plantas, sino también a aguas subterráneas a través de la filtración de éstos en el suelo.<sup>46</sup> Además, es posible que se comprometa la calidad del suelo debido a que el exceso de nutrientes que proporciona el agua tratada puede disminuir la conductividad hidráulica del suelo mediante la formación de biocapas que obstaculicen el flujo de agua entre las partículas del suelo.<sup>44</sup>

En casi cada etapa del tratamiento de agua en las PTAR se generan sedimentos que deben de ser procesados antes de su desecho. Este proceso involucra la reducción del volumen del sedimento (mediante la eliminación de agua), su estabilización (para disminuir su pestilencia y la cantidad de patógenos presentes) y un tratamiento químico. Después de este proceso, el sedimento ya puede ser utilizado como abono en la agricultura. A estos sedimentos tratados se les conoce como “biosólidos”.<sup>30,47</sup>

El uso de biosólidos en la agricultura es el método de desecho más común para los sedimentos generados en las PTAR.<sup>48</sup> Debido a la gran cantidad de materia orgánica presente en los biosólidos,<sup>47</sup> éstos aportan varios macro y micronutrientes necesarios para las plantas, aumentando su eficiencia de crecimiento.<sup>4,49</sup> Gracias a la humedad y gran cantidad de nutrientes proporcionada por los biosólidos ha sido posible el cultivo de plantas en regiones poco fértiles o no propensas para la agricultura.<sup>50</sup>

### 2.3.2. Transferencia de PCP a plantas

Una vez que los PCP son transferidos al suelo mediante la irrigación con agua tratada o el uso de biosólidos, los contaminantes interactúan con el suelo antes de migrar a las raíces de las plantas. Esta interacción puede consistir en fenómenos de sorción/desorción o degradación.<sup>51</sup>

La sorción de los PCP en el suelo depende de las propiedades fisicoquímicas de los contaminantes ( $pK_a$  y  $K_{ow}$ ) y del suelo ( $pH$ , humedad, cantidad de materia orgánica y cantidad de microorganismos). Por ejemplo, en un suelo con alto contenido de materia orgánica, los contaminantes neutros más hidrofóbicos (mayor valor de  $K_{ow}$ ) se sorberán más fuerte por lo que su biodisponibilidad para las plantas podría ser menor.<sup>48</sup>

La sorción de los PCP a la raíz depende de las propiedades fisicoquímicas de los contaminantes, incluyendo la constante de Henry, solubilidad en agua,  $pK_a$  y  $K_{ow}$ .<sup>52</sup> Se ha determinado en estudios hidropónicos que el factor que determina de manera más importante la sorción de contaminantes en la raíz es el  $K_{ow}$ .<sup>53</sup> En forma molecular, la sorción de los compuestos hidrofóbicos a la raíz tiende a ser mayor que la de los hidrofílicos. Por otro lado, la sorción de compuestos catiónicos es más lenta debido a que la cinética de transferencia iónica a través de la membrana es menor. La sorción de compuestos aniónicos suele ser la menos favorable, probablemente debido al potencial eléctrico negativo de la membrana.<sup>6,51,54,55</sup>

Una vez en la raíz algunos contaminantes son transferidos a la parte aérea de la planta (tallo y hojas) a través del sistema de transpiración de la planta. Los compuestos de carácter hidrofílico son más propensos a migrar a las hojas de las plantas mientras que los hidrofóbicos suelen ser retenidos en la raíz.<sup>6,51,55</sup> En general, se ha observado que la concentración de los contaminantes emergentes en hojas es de 0.5 a 110 veces menor que la de la raíz.<sup>56</sup>

Debido a que la transpiración de las plantas aumenta con la temperatura del entorno se ha determinado que, en climas cálidos, una mayor cantidad de disruptores endócrinos migran de la raíz a la parte aérea de la planta que en climas fríos.<sup>57</sup> A pesar de que la exposición a

los PCP debida a la ingesta de las hojas parece ser baja, aún no se conocen los efectos crónicos debidos a dosis bajas de la mezcla de estos contaminantes o sus metabolitos.<sup>58</sup>

### 2.4. Cromatografía de gases-espectrometría de masas

Para determinar los productos de cuidado personal (PCP) a nivel de trazas en muestras complejas, se requiere de una técnica analítica instrumental sensible, precisa, rápida y robusta. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas cumple con estos requisitos.

#### 2.4.1. Cromatografía de gases

De acuerdo con la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés), la cromatografía se define como un método de separación física en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases: una que se encuentra fija (fase estacionaria) y otra que se mueve en una dirección definida (fase móvil).<sup>59</sup> Los componentes de una mezcla son transportados por la fase móvil hacia la fase estacionaria y, debido a que cada compuesto tiene una afinidad diferente a ambas fases, se produce su separación.<sup>60</sup>

Específicamente, la cromatografía de gases (GC, por sus siglas en inglés) utiliza un gas inerte (normalmente H<sub>2</sub>, He o N<sub>2</sub>) como fase móvil y un sólido o líquido como fase estacionaria. La cromatografía gas-líquido es la más utilizada.<sup>61</sup> En GC no existe una interacción entre los compuestos a separar y la fase móvil, la retención de los compuestos depende de su afinidad a la fase estacionaria y de su presión de vapor.<sup>60,61</sup>

En GC, los analitos deben de encontrarse en fase gaseosa para ser separados por lo que es necesario que sean volátiles o semivolátiles (presión de vapor de 60 torr o mayor). La volatilidad de una especie depende de su tamaño y polaridad: a mayor masa molecular y polaridad, la volatilidad será menor. Moléculas grandes no polares pueden ser más volátiles que moléculas pequeñas polares, por lo que se deben de tomar en cuenta ambos parámetros al evaluar la volatilidad de una especie. Los compuestos con masa molecular alta pueden ser analizados siempre y cuando sean termoestables a la temperatura de trabajo.<sup>62</sup>

Las ventajas de la CG son: análisis rápidos (normalmente de algunos minutos), alta eficiencia de separación (debido al amplio uso de columnas capilares), sensibilidad ( $\mu\text{g mL}^{-1}$  o  $\text{ng mL}^{-1}$ ), no destructiva, análisis cuantitativos precisos (coeficientes de variación de 1-5 %), requiere de pequeños volúmenes de muestra ( $\mu\text{L}$ ) y es más barata que otras técnicas de análisis instrumental.<sup>63</sup> La GC hace posible el análisis cuantitativo de compuestos volátiles y semivolátiles en una gran variedad de mezclas complejas (como el análisis simultáneo de más de cien compuestos en una muestra de petróleo) gracias a la alta eficiencia obtenida por el uso de columnas capilares.<sup>61</sup>

### 2.4.2. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés), es una técnica analítica de alta sensibilidad utilizada para la identificación de especies no conocidas a nivel de pico o femtomoles y cuantificación de analitos conocidos. La MS se basa en la ionización de los átomos o moléculas de una muestra y su posterior análisis como iones gaseosos dependiendo de su relación masa/carga ( $m/z$ ).<sup>64</sup> Debido a que la colisión de los iones con moléculas del aire provocaría alteraciones en la trayectoria y fragmentaciones no deseadas, la fuente de ionización y el analizador másico deben estar en alto vacío, con excepción de las fuentes de ionización diseñadas especialmente para trabajar a presión atmosférica.<sup>64,65</sup>

La ionización electrónica (anteriormente conocida como “impacto electrónico”) es una de las técnicas de ionización más utilizadas en MS. Consiste en la colisión de los átomos o moléculas de la muestra con electrones acelerados, generados por un filamento incandescente. Normalmente, la energía de los electrones es de 70 eV. Como la energía de ionización de la mayoría de los compuestos orgánicos está por debajo de 15-20 eV, la energía de los electrones se encuentra en exceso, ocasionando la fragmentación de las moléculas. Se ha observado que la ionización electrónica a 70 eV produce espectros de masas reproducibles e independientes del instrumento utilizado por lo que se han creado grandes bases de datos de espectros de masas para facilitar la identificación de compuestos en una muestra.<sup>64</sup>

El cuadrupolo es un analizador másico ampliamente utilizado en GC-MS. Consiste en cuatro barras metálicas paralelas con distancias diagonales idénticas entre sí. A estas barras se les

aplica un voltaje constante y uno oscilante de radiofrecuencia, lo que genera un campo eléctrico que afecta la trayectoria de los iones a través del analizador másico. Al controlar el campo eléctrico generado es posible permitir que sólo los iones  $m/z$  determinadas lleguen al detector.<sup>64,65</sup>

Existen dos modos de adquisición de iones en el cuadrupolo: escaneo completo (“SCAN”) y monitoreo selectivo de iones (SIM, por sus siglas en inglés). En el modo SCAN se detectan todos los iones dentro de un intervalo de  $m/z$  determinado, creando un espectro de masas por cada “escaneo” realizado. Una configuración común en el cuadrupolo es realizar de 1 a 2 escaneos por segundo, sin embargo, el número máximo de escaneos por unidad de tiempo depende de cada equipo. Por otro lado, el modo SIM puede proporcionar una alta selectividad al análisis, ya que sólo detecta  $m/z$  específicos en un rango de tiempo determinado. De este modo, el cuadrupolo puede seleccionar los iones característicos de un compuesto en su tiempo de retención. Como resultado, el ruido disminuye junto con las posibles interferencias a los analitos, aumentando la sensibilidad y selectividad del análisis.<sup>62,66</sup>

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) combina las ventajas de ambas técnicas: la separación rápida y eficiente propia de GC y la determinación estructural precisa característica de MS.<sup>66</sup> El acoplamiento con MS proporciona a la GC una sensibilidad igual o mejor que la alcanzada con otros detectores, siendo capaz de detectar desde ng hasta pg de compuestos.<sup>62</sup> Debido a que GC y MS son técnicas muy compatibles (ambas se realizan en fase gaseosa a flujos y temperaturas similares), el acoplamiento entre los instrumentos solamente requiere un conducto conocido como “línea de transferencia”, a través del que pasa el extremo de la columna, conectándola con la cámara de ionización. En la línea de transferencia se realiza el cambio de presión atmosférica propia del GC al alto vacío requerido en MS.<sup>62,63</sup>

### **2.5. Preparación de muestras**

Los vegetales son matrices complejas que no pueden ser analizadas directamente mediante técnicas instrumentales debido a que la gran cantidad de interferencias que presentan dificulta su análisis, principalmente en la determinación de compuestos a nivel de trazas. Por lo tanto,

es necesario realizar un tratamiento de la muestra antes del análisis instrumental. La preparación de muestra consiste en la transformación de una muestra a un formato en el que sea más favorable su análisis.<sup>67</sup> Su elección depende de las propiedades fisicoquímicas de la matriz y analitos en cuestión, así como de la técnica instrumental a utilizar.<sup>8,68</sup>

La preparación de muestra puede consistir en procesamiento preliminar (homogeneización, ajuste de humedad o dilución de la muestra), limpieza de la muestra, concentración de los analitos y/o la modificación química de los compuestos estudiados. La limpieza es importante en matrices que presentan compuestos que interfieren con el análisis instrumental u ocasionan problemas de solubilidad y adsorción de los analitos en el extracto en la muestra. Después de esta limpieza, normalmente se realiza la preconcentración de los analitos para facilitar su determinación a nivel de trazas. Finalmente, la modificación química de una muestra (conocida como “derivatización”) se realiza para favorecer la disolución de los analitos en un medio o para favorecer su detección o separación.<sup>8</sup>

La preparación de muestra es el paso con mayor impacto ambiental de cualquier metodología analítica ya que requiere del uso abundante de disolventes, reactivos y energía.<sup>69</sup> Debido a ésto, existe una tendencia a la miniaturización de la preparación de muestra, generando metodologías más amigables con el medio ambiente que evitan el uso de reactivos tóxicos, disminuyen o eliminan el consumo de disolventes y reducen la energía y el tiempo requeridos para el análisis.<sup>69,70</sup> Adicionalmente, se suelen combinar estas técnicas miniaturizadas en una misma metodología, haciendo posible el análisis de una gran variedad de muestras.<sup>71</sup>

Comparado con la determinación de contaminantes en agua, suelos o sedimento, los tejidos de plantas presentan un desafío mayor debido a la presencia de pigmentos, grasas y materiales cerosos que pueden ocasionar interferencias en el análisis.<sup>51</sup> El desarrollo en la preparación de muestra de matrices sólidas y semisólidas ha sido más limitado que el de matrices líquidas y viscosas. El análisis de este tipo de matrices normalmente comienza con la extracción exhaustiva de los analitos de la matriz, sin embargo, estas extracciones suelen ser poco selectivas, por lo que es necesario realizar la purificación del extracto y preconcentrar a los analitos antes del análisis instrumental.<sup>68,72</sup>

Ejemplos de técnicas de preparación de muestra miniaturizadas para muestras sólidas son extracción con líquidos presurizados, extracción asistida con microondas, extracción asistida con ultrasonido, extracción con fluidos supercríticos y dispersión de matriz en fase sólida; para muestras líquidas extracción en fase sólida, microextracción en fase sólida, extracción con barra magnética, microextracción en gota y microextracción líquido-líquido dispersiva; para fases gaseosas purga y trampa, análisis de espacio de cabeza, entre otras.<sup>67</sup>

En este trabajo se utilizó la dispersión de matriz en fase sólida y la extracción asistida por ultrasonido-microextracción en fase sólida como técnicas de extracción y preconcentración, por lo que se describirán más detalladamente.

### **2.5.1. Extracción asistida por ultrasonido**

Se conoce como ultrasonido a las ondas vibracionales con una frecuencia de 20 kHz a 500 MHz. El ultrasonido es utilizado en campos diversos como comunicación animal, detección de defectos en sólidos, localización bajo el agua, escaneo fetal y tratamiento de tumores. En química, se utiliza ultrasonido de 10-100 kHz para procesar materiales orgánicos e inorgánicos.<sup>73</sup> Las aplicaciones más comunes son preparación de muestras, rompimiento celular, homogeneización, reducción de tamaño de partícula, estudio de suelos, aceleración de reacciones químicas, rompimiento de espumas y atomización.<sup>74</sup>

La extracción asistida por ultrasonido (UAE, por sus siglas en inglés) es una técnica de preparación de muestras utilizada para la extracción de compuestos de matrices sólidas y semisólidas. Su funcionamiento se basa en la transmisión de energía eléctrica a un transductor que la convierte en vibraciones mecánicas. Posteriormente, las vibraciones son amplificadas creando ondas de presión en el líquido que a su vez generan microburbujas en el medio que se comprimen y contraen sucesivamente, aumentando de tamaño en cada ciclo. Cuando el diámetro de las microburbujas produce inestabilidad en las mismas, colapsan violentamente produciendo ondas de choque a una temperatura y presión aproximada de 5000 °C y 500 atm, respectivamente, que producen la degradación de la matriz y la extracción de los analitos; este fenómeno es conocido como “cavitación”.<sup>73,75</sup>

El ultrasonido puede ser generado mediante dos técnicas: magnetostrictiva o piezoeléctrica. La magnetostrictiva consiste en la conversión de energía eléctrica en mecánica (o vibracional) utilizando un espiral magnético unido a una pieza vibrante como níquel y Terfenol-D (una aleación de terbio, disprosio y hierro). La técnica piezoeléctrica se basa en la conversión de energía eléctrica en energía eléctrica de alta frecuencia por medio de cristales piezoeléctricos unidos a la parte del sistema que transmite el ultrasonido (por ejemplo, una sonda). Ambas técnicas utilizan posteriormente un transductor que convierte la energía eléctrica o mecánica en ondas vibracionales, que son potenciadas utilizando un amplificador que aumenta la amplitud de la onda. Finalmente, se utiliza una sonda para transmitir las ondas ultrasónicas al líquido de extracción.<sup>73</sup>

Varios factores pueden afectar la UAE como la amplitud de la onda, tamaño de la muestra, presión y temperatura de extracción, viscosidad, tensión superficial y presión de vapor del líquido de extracción y cantidad de gases disueltos en el medio. Estos parámetros varían según la aplicación por lo que es necesario determinar las condiciones óptimas empíricamente.<sup>73,75</sup>

La UAE es utilizada en la extracción de compuestos de frutas, vegetales y tejidos biológicos, ya que la aplicación del ultrasonido es capaz de romper membranas y paredes celulares, liberando el contenido de la célula al medio de extracción.<sup>75,76</sup> La UAE es una técnica de extracción exhaustiva por lo que normalmente es necesaria la purificación y preconcentración de los analitos antes del análisis instrumental.

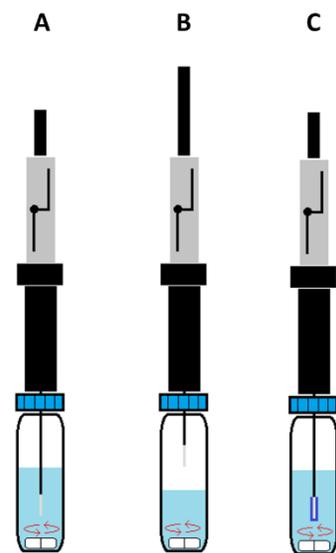
### **2.5.2. Microextracción en fase sólida**

La microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) es una técnica miniaturizada que se basa en la extracción y preconcentración de los analitos en un sorbente de bajo volumen (normalmente menor a 1  $\mu\text{L}$ ). Existen varios modos en SPME, sin embargo, el más utilizado consiste en una fibra de sílice recubierta con una capa delgada de un polímero o líquido inmovilizado.<sup>77,78</sup> La SPME combina el muestreo, extracción y, en algunas ocasiones, la introducción de los analitos al instrumento de análisis.<sup>79</sup>

La fibra recubierta se encuentra en una aguja similar a la de una jeringa. Para manipular la fibra fácilmente, ésta se monta en un dispositivo conocida como “*holder*”. La muestra a analizar normalmente se coloca en un vial cerrado con una tapa horadada equipada con una septa de teflón. Para extraer a los analitos, se perfora la septa con la aguja y se expone la fibra a la muestra o a sus vapores. Después de la extracción, se retracta la fibra a la aguja y se retira el *holder* del vial.<sup>80</sup> La desorción de la fibra se suele realizar térmicamente en el inyector de un cromatógrafo de gases, sin embargo, en algunas ocasiones, se realiza en un disolvente para su posterior análisis instrumental.<sup>8</sup>

Existen tres modos de extracción en SPME: inmersión directa, extracción en espacio de cabeza y extracción con membrana (**Figura 6**). El modo de inmersión directa consiste en exponer la fibra a una muestra líquida o gaseosa. La cantidad extraída de un analito ( $n_e$ ) depende de su coeficiente de distribución entre el sorbente y la muestra ( $K_{e/s}$ ), el volumen del sorbente y la muestra ( $V_e$  y  $V_s$ , respectivamente) y de la concentración del analito en la muestra ( $C_s$ ).<sup>79</sup> Matemáticamente, esta relación se expresa como:

$$n_e = \frac{K_{e/s} V_s V_e}{K_{e/s} V_e + V_s} C_s \quad (1)$$



**Figura 6.** Modos de extracción en SPME: A. Inmersión; B. Espacio de cabeza; C. Membrana.

Debido a que el volumen de la muestra es considerablemente más grande que el volumen del sorbente, se puede considerar que  $V_s \gg K_{e/s}V_e$ , por lo que la **Ecuación (1)** puede ser simplificada a:

$$n_e = K_{e/s}V_eC_s \quad (2)$$

La **Ecuación (2)** muestra que la cantidad extraída del analito es independiente del volumen de la muestra. Por ello, la SPME en inmersión directa puede ser utilizada en análisis ambientales “en sitio” como ríos, lagos o aire. La desventaja principal de este modo de extracción es que la inmersión de la fibra en matrices complejas puede ocasionar la sorción irreversible de interferencias, disminuyendo la eficiencia de extracción y el tiempo de vida de la fibra.<sup>79</sup>

El modo espacio de cabeza o *headspace* consiste en exponer la fibra a los vapores de una muestra sólida o líquida para extraer los analitos volátiles y semivolátiles. Este modo de extracción consiste en un sistema trifásico: la muestra, el sorbente y el gas inerte en el espacio de cabeza. La cantidad del analito extraído al equilibrio ( $n_{e,eq}$ ) depende del coeficiente de distribución entre la muestra y el sorbente ( $K_{e/s}$ ), el coeficiente de distribución entre el gas inerte y la muestra ( $K_{g/s}$ ), el volumen de la muestra, el sorbente y el gas inerte ( $V_s$ ,  $V_e$  y  $V_g$ , respectivamente) y de la concentración del analito en la muestra ( $C_s$ ).<sup>78</sup> Matemáticamente, esta relación se expresa como:

$$n_{e,eq} = \frac{K_{e/s}V_eC_sV_s}{K_{e/s}V_e + K_{g/s}V_g + V_s} \quad (3)$$

Una de las ventajas de la extracción en espacio de cabeza es que las muestras complejas pueden ser extraídas sin dañar a la fibra ya que éstas no entran en contacto.

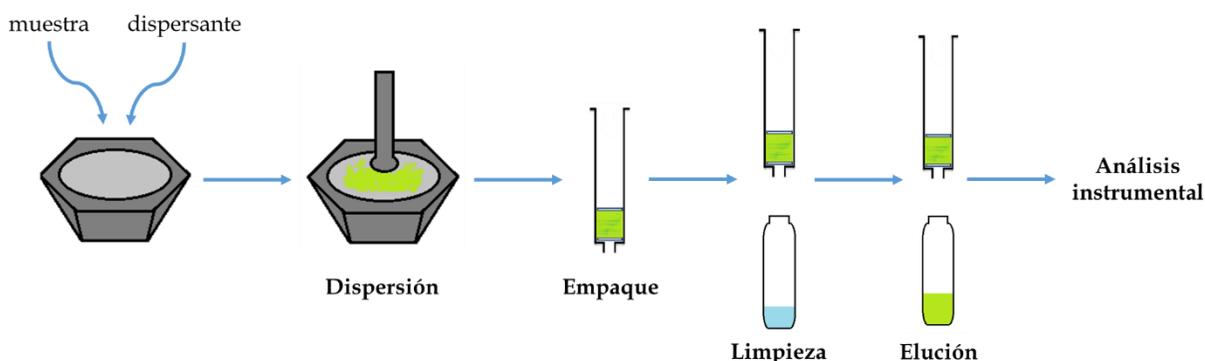
El modo de extracción con membrana es utilizado para la extracción de analitos no volátiles en muestras líquidas complejas que pueden dañar al sorbente o contener interferencias de alta masa molecular. En estos casos se utilizan membranas o materiales de acceso restringido que recubren y protegen a la fibra, resultando en análisis más reproducibles y precisos.<sup>77</sup> En este modo de extracción, la extracción de los analitos depende importantemente de su difusión en la membrana.

El parámetro más importante para la extracción de los analitos en SPME es su afinidad al sorbente. Existe una gran variedad de recubrimientos comerciales como polidimetilsiloxano, divinilbenceno, poliacrilato, carboxen, polietilenglicol o una mezcla de ellos, sin embargo, la necesidad de recubrimientos específicos para ciertos análisis ha llevado a la síntesis de sorbentes “no comerciales”.<sup>78</sup>

Normalmente, la desorción de los compuestos extraídos se realiza exponiendo la fibra al puerto de inyección de un cromatógrafo de gases o líquidos. El tiempo de desorción de un analito es independiente de su  $K_{e/s}$ . Para compuestos de baja masa molecular extraídos en una fibra con 100  $\mu\text{m}$  de espesor, se aproxima un tiempo de desorción de 1 s en un inyector de GC a 200 °C.<sup>77</sup>

### 2.5.3. Dispersión de matriz en fase sólida

La dispersión de matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés) es un proceso para la disgregación y extracción de muestras sólidas y semisólidas. Se basa en la ruptura de la estructura de la muestra, provocando la dispersión de los analitos y facilitando su extracción mediante la elución con un disolvente.<sup>81</sup> En la **Figura 7** se muestra un esquema del procedimiento general de la MSPD.



**Figura 7.** Esquema del procedimiento general de la MSPD.

El paso inicial de la MSPD consiste en la disgregación de la muestra en un mortero junto con un agente dispersante, que es un material sólido que funciona como un abrasivo, induciendo

la ruptura de la estructura de la muestra, y como un sorbente que ayuda a completar la dispersión de la misma.<sup>82</sup> Los agentes dispersantes más comunes son sílice químicamente unida a C<sub>8</sub> o C<sub>18</sub>, alúmina y silicato de magnesio (conocido comercialmente como “Florasil”). En algunas ocasiones también se utilizan materiales que no retienen a los analitos como arena y tierra de diatomeas,<sup>83</sup> abrasivos con propiedades desecantes como Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro<sup>84</sup> y, recientemente, polímeros molecularmente impresos y nanotubos de carbono de paredes múltiples.<sup>83</sup> Normalmente se utiliza una relación de muestra-dispersante de 1:4.<sup>82</sup>

Una vez que se dispersa la muestra se transfiere a una columna (normalmente un cartucho de polipropileno similar a los que se utilizan en extracción en fase sólida) que contiene un *frit*, se comprime la mezcla y se coloca un *frit* en la parte superior de la misma. Posteriormente, se agrega un disolvente en la parte superior de la columna para recuperar a los analitos, o bien, varios disolventes para eliminar interferencias y después eluir a los compuestos de interés. La elución de las impurezas y de los analitos puede realizarse a presión atmosférica o con ayuda de un sistema de vacío.<sup>81</sup>

Algunos procedimientos de MSPD utilizan co-columnas para aumentar la limpieza del extracto. Para esto se utilizan las fases dispersantes mencionadas anteriormente. La co-columna normalmente se empaqueta en la parte inferior del mismo cartucho en el que se encuentra la muestra dispersada. En otros casos, ésta se utiliza como una columna externa en un arreglo de cartuchos apilados.<sup>81,84</sup>

Para realizar extracciones más rápidas y eficientes, la MSPD también es realizada utilizando disolventes calientes y presurizados (como es el caso de la extracción acelerada por disolventes), sin embargo, debido a que este tipo de extracción es poco selectiva, normalmente se realiza un paso de limpieza del extracto antes del análisis instrumental.<sup>84</sup>

Las ventajas que presenta la MSPD frente a otros métodos de preparación de muestras sólidas son: el análisis de muestras biológicas sin necesidad del pretratamiento de las mismas (por ejemplo, liofilización), uso de bajos volúmenes de disolventes, combinación de extracción y limpieza del extracto y alta eficiencia de extracción, ya que toda la muestra se expone al disolvente extractante.<sup>84</sup>

### 2.6. Antecedentes experimentales

Los PCP han sido determinados anteriormente en el medio ambiente, sin embargo, la mayoría de los estudios se enfocan en matrices acuosas. Los métodos instrumentales más utilizados para el análisis ambiental de estos contaminantes son la cromatografía de líquidos y de gases acopladas a espectrometría de masas.<sup>5,51</sup>

El análisis simultáneo de filtros UV en agua normalmente se realiza mediante extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) seguida de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas. El monitoreo de triclosán y metiltriclosán en agua normalmente se realiza mediante SPE-GC-MS. Los PCP volátiles o semivolátiles (principalmente almizcles), son comúnmente determinados mediante SPME o extracción por sorción en barra magnética (SBSE, por sus siglas en inglés) con desorción térmica en GC-MS.<sup>5</sup> En la SPME en agua de nitroalmizcles y almizcles policíclicos, se ha comparado la extracción con varios recubrimientos como PDMS, PDMS-DVB, PA, CAR-PDMS y CAR-DVB, encontrando que PDMS-DVB permite una extracción reproducible y eficiente de los analitos.<sup>27,32</sup>

Las concentraciones de los filtros UV, almizcles y agentes antimicrobianos detectados con mayor frecuencia en aguas superficiales, biosólidos e influente y efluente de PTAR se encuentran en la **Tabla 2**. La mayoría de estos intervalos están catalogados como relevantemente tóxicos para el medio ambiente.<sup>17</sup> La concentración en el efluente es menor a la observada en el influente debido a la degradación de los contaminantes durante el tratamiento del agua y a la sorción de los mismos en los sedimentos.

En la **Tabla 3** se muestran metodologías desarrolladas para el análisis de galaxolida, tonalida y triclosán en tejidos de plantas. La extracción normalmente consiste en una extracción no selectiva seguida de un paso de limpieza y preconcentración. Los límites de detección observados para estos compuestos en lechuga se encuentran entre 0.1 y 60 ng g<sup>-1</sup>. En la investigación bibliográfica realizada hasta el 31 de marzo de 2017, no se encontraron reportes del análisis de filtros UV en plantas.

## Antecedentes

**Tabla 2.** Concentraciones de los filtros UV, almizcles y agentes antimicrobianos detectados con mayor frecuencia en aguas superficiales, influente y efluente de PTAR y biosólidos.

| Clase                         | PCP                | Aguas superficiales<br>(ng mL <sup>-1</sup> ) | Influente<br>(ng mL <sup>-1</sup> ) | Efluente<br>(ng mL <sup>-1</sup> ) | Biosólidos<br>(μg g <sup>-1</sup> ) |
|-------------------------------|--------------------|---|-------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Filtros UV</b>             | 4-MBC              |   |                                     |                                    |                                     |
|                               | Octocrileno        |   |                                     |                                    |                                     |
|                               | Padimato-o<br>BP-3 | 1x10 <sup>-4</sup> -7.30 <sup>17</sup>        | 0.1-19 <sup>22</sup>                | 0.011-2.7 <sup>22</sup>            | 0.004-3.214 <sup>85</sup>           |
|                               | 2-EHMC             |   |                                     |                                    |                                     |
| <b>Almizcles policíclicos</b> | Galaxolida         | 2.9x10 <sup>-5</sup> -99 <sup>17</sup>        | 0.014-50 <sup>30</sup>              | 0.002-10.5 <sup>30</sup>           | 0.0162-27.1 <sup>86</sup>           |
|                               | Tonalida           |   |                                     |                                    |                                     |
| <b>Antimicrobianos</b>        | Triclosán          | 1x10 <sup>-4</sup> -60 <sup>17</sup>          | 0.03-23.9 <sup>87</sup>             | 0.01-6.88 <sup>87</sup>            | 0.46-16.1 <sup>86</sup>             |

## Antecedentes

**Tabla 3.** Análisis de PCP en tejidos de plantas.

| Matriz<br>(masa)                                       | Preparación de<br>muestra | Análisis<br>instrumental | Analito    | Límite de<br>detección<br>(ng g <sup>-1</sup> ) | Recobro (%) | Referencia |
|--|---------------------------|--------------------------|------------|---|-------------|------------|
| Raíz zanahoria,<br><i>Festuca pratensis</i><br>(1-2 g) | QueChERS                  | GC-MS                    | Galaxolida | 20  | 63-102      | 88         |
|  |                           |                          | Tonalida   | 20-50   | 65-97       |            |
|  |                           |                          | Triclosán  | 50-60   | 65-86       |            |
| Lechuga<br>(0.2 g)                                     | UAE-SPE                   | UPLC-MS/MS               | Triclosán  | 3   | 111-113     | 4          |
| Lechuga, espinaca,<br>pepinillo, chile<br>(0.2 g)      | UAE-SPE                   | UPLC-MS/MS               | Triclosán  | ---   | ---         | 6          |
| Lolium, rábano<br>(1 g)                                | UAE-SPE                   | HPLC-MS/MS               | Triclosán  | ---   | ---         | 52         |

UAE: extracción asistida por ultrasonido; SPE: extracción en fase sólida; HPLC: cromatografía de líquidos de alta eficiencia; UPLC: cromatografía de líquidos de ultra alta eficiencia; GC: cromatografía de gases; MS: espectrometría de masas.

## Antecedentes

**Tabla 3.** Análisis de PCP en tejidos de plantas (continuación).

| Matriz<br>(masa)                           | Preparación de<br>muestra | Análisis<br>instrumental | Analito                | Límite de<br>detección<br>(ng g <sup>-1</sup> ) | Recobro (%) | Referencia |
|--|---------------------------|--------------------------|------------------------|---|-------------|------------|
| Papa, zanahoria,<br>jitomate<br>(0.5 g)    | UAE-SPE                   | HPLC-MS/MS               | Triclosán              | ---   | ---         | 89         |
| Soya<br>(---)                              | PLE-SPE                   | HPLC-MS/MS               | Triclosán              | ---   | ---         | 48         |
| Lechuga, zanahoria,<br>pimiento<br>(0.5 g) | SBSE                      | GC-MS                    | Galaxolida<br>Tonalida | 0.1<br>0.3-0.6                                  | ---         | 90         |
| Lechuga<br>(0.5 g)                         | MSPD-PLE-<br>LLE          | GC-MS                    | Tonalida<br>Triclosán  | 6.6<br>18.2                                     | 92<br>74    | 42         |

UAE: extracción asistida por ultrasonido; PLE: extracción con líquidos presurizados; MSPD: dispersión de matriz en fase sólida; SPE: extracción en fase sólida; LLE: extracción líquido-líquido; SBSE: extracción por sorción en barra magnética; HPLC: cromatografía de líquidos de alta eficiencia; GC: cromatografía de gases; MS: espectrometría de masas.

## Antecedentes

**Tabla 3.** Análisis de PCP en tejidos de plantas (continuación).

| Matriz<br>(masa)   | Preparación de<br>muestra | Análisis<br>instrumental | Analito   | Límite de<br>detección<br>(ng g <sup>-1</sup> ) | Recobro (%)   | Referencia   |
|--------------------|---------------------------|--------------------------|---|---|---|--------------|
| Lechuga<br>(0.5 g) | MSPD-PLE-<br>LLE          | GC-MS                    | Tonalida<br>Triclosán   | ---   | ---   | 56           |
| Lechuga<br>(0.2 g) | UAE-SPME                  | GC-MS                    | Galaxolida<br>Tonalida<br>Oxibenzona<br>4-MBC<br>Padimato-o<br>2-EHMC<br>Octocrileno<br>Triclosán<br>Metiltriclosán | 1<br>1<br>1<br>1<br>5<br>1<br>25<br>1<br>1      | 118<br>121<br>109<br>118<br>107<br>97<br>112<br>89<br>116 | Este trabajo |

UAE: extracción asistida por ultrasonido; PLE: extracción con líquidos presurizados; MSPD: dispersión de matriz en fase sólida; LLE: extracción líquido-líquido; SPME: microextracción en fase sólida; GC: cromatografía de gases; MS: espectrometría de masas.

### 3. Justificación

Para conocer con certeza el riesgo toxicológico potencial que representa la presencia de PCP en vegetales como la lechuga, es necesario desarrollar metodologías sensibles, precisas, sencillas, rápidas y amigables con el medio ambiente para su determinación. Los resultados obtenidos con estas metodologías junto con estudios toxicológicos serán la base para el establecimiento de normativas y regulaciones para los PCP en vegetales.

### 4. Objetivos

#### Objetivo general

Desarrollar una metodología para la determinación de productos de cuidado personal (PCP): almizcles (galaxolida y tonalida), filtros UV (oxibenzona, 4-metil-benciliden canfor, padimato-o, 2-etilhexil metoxicinamato y octocrileno), un agente antimicrobiano (triclosán) y el metabolito principal de este último (metiltriclosán), en lechuga mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

#### Objetivos particulares

1. Desarrollar y optimizar un método para la determinación de PCP en lechuga mediante dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) seguida de GC-MS.
2. Desarrollar y optimizar un método para la determinación de PCP en lechuga mediante extracción asistida por ultrasonido y microextracción en fase sólida (UAE-SPME) seguida de GC-MS.
3. Aplicar la metodología que presente mayores ventajas en términos de sensibilidad, precisión, sencillez y rapidez al análisis de lechugas cultivadas en el laboratorio.

## 5. Desarrollo experimental

### 5.1. PCP estudiados

En la **Tabla 4** se muestra la estructura química, masa molecular,  $\log K_{ow}$  y  $pK_a$  de los analitos, así como la abreviatura con las que se identificará cada PCP a lo largo del texto.

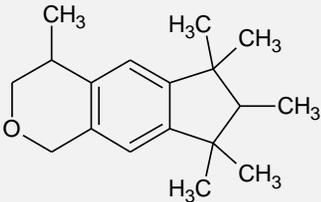
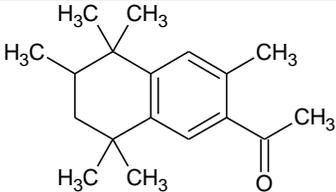
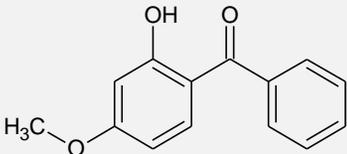
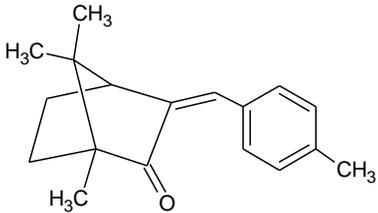
### 5.2. Reactivos, materiales y equipo

En el desarrollo y validación de las metodologías se utilizaron: HHCB (55.8%, Sigma-Aldrich, China). AHTN (99.3%) y MTC (99.1%), Sigma-Aldrich (EUA). BP-3 (100%), Fluka (China). 4-MBC (99.7%) y OCT (99.2%), Fluka (Alemania). TC (97%), Fluka (Italia). O-PABA (99%), Fluka (EUA). 2-EHMC (98.9%), Fluka (Suiza). N-metil-N-terbutildimetilsilil trifluoroacetamida (MTBSTFA), Sigma-Aldrich (Suiza). Benzo[a]antraceno en disolución ( $100\mu\text{gmL}^{-1}$  en diclorometano) y fenantreno (99%), ChemService (EUA). Acetonitrilo y hexano (grado HPLC, J.T. Baker, EUA); acetato de etilo (grado HPLC, J.T. Baker, México). Metanol grado reactivo J.T. Baker (Trinidad y Tobago). Acetona (Q.P.), Distribuidora Química Alvi (Estado de México, México). Se preparó una disolución madre de cada compuesto en metanol o acetona y se almacenaron en viales de vidrio a 2 °C.

Para la fortificación del agua de riego se utilizaron los estándares siguientes: HHCB (50%, Sigma-Aldrich, China). AHTN ( $\geq 98\%$ ) y O-PABA (98%), Sigma-Aldrich (EUA). 4-MBC ( $\geq 98\%$ ), OCT (97%), Sigma-Aldrich (Alemania). 2-EHMC (98%), Sigma-Aldrich (Suiza). BP-3 (99.92%), Fluka (EUA). La fortificación con TC y MTC se realizó con los estándares utilizados en el desarrollo y validación de las metodologías.

## Desarrollo experimental

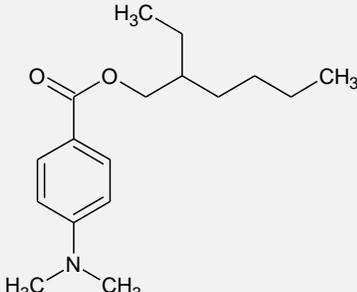
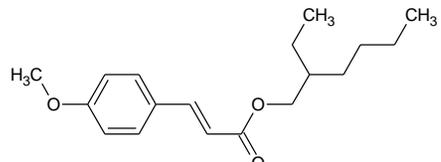
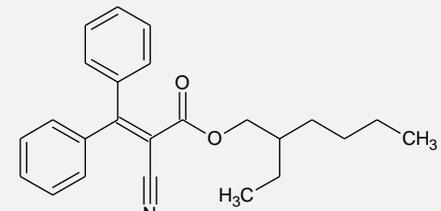
**Tabla 4.** Estructura y propiedades fisicoquímicas de los PCP estudiados.

|            | Nombre IUPAC  | Nombre común<br>(abreviación)        | Estructura   | PM<br>(g mol <sup>-1</sup> ) | log K <sub>ow</sub> | pK <sub>a</sub>   | S<br>(mg mL <sup>-1</sup> ) |
|------------|---|--------------------------------------|--|------------------------------|---------------------|-------------------|-----------------------------|
| Almizcles  | 1,3,4,6,7,8-hexahidro-<br>4,6,6,7,8,8-hexametil-<br>ciclopenta[g]-2-<br>benzopirano | Galaxolida<br>(HHCB)                 |    | 258.4                        | 5.9 <sup>88</sup>   | ---               | 1.75 <sup>91</sup>          |
|            | 1-(5,6,7,8-tetrahydro-<br>3,5,5,6,8,8-hexametil-2-<br>naftalenil)-etanona           | Tonalida<br>(AHTN)                   |    | 258.4                        | 5.7 <sup>88</sup>   | ---               | 1.25 <sup>91</sup>          |
| Filtros UV | (2-hidroxi-4-metoxifenil)<br>fenil-metanona   | Oxibenzona<br>(BP-3)                 |   | 228.2                        | 3.5 <sup>92</sup>   | 7.6 <sup>93</sup> | 130 <sup>94</sup>           |
|            | 1,7,7-trimetil-3-<br>[(4-metilfenil)metileno]-<br>biciclo[2.2.1]heptan-2-ona        | 4-metil-benciliden canfor<br>(4-MBC) |  | 254.4                        | 5.5 <sup>92</sup>   | ---               | 17 <sup>94</sup>            |

PM: peso molecular; K<sub>ow</sub>: constante de reparto octanol/agua; Ka: constante de acidez; S: solubilidad en agua.

## Desarrollo experimental

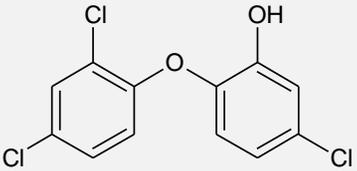
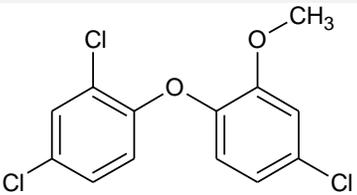
**Tabla 4.** Estructura y propiedades fisicoquímicas de los PCP estudiados (continuación).

|            | Nombre IUPAC  | Nombre común (abreviación)          | Estructura   | PM (g mol <sup>-1</sup> ) | log K <sub>ow</sub> | pK <sub>a</sub> | S (µg mL <sup>-1</sup> ) |
|------------|---|-------------------------------------|--|---------------------------|---------------------|-----------------|--------------------------|
| Filtros UV | Ácido 4-(dimetilamino)-2-etilhexiléster benzóico        | Padimato-o (O-PABA)                 |   | 277.4                     | 5.8 <sup>92</sup>   | ---             | 4.7 <sup>94</sup>        |
|            | Ácido 3-(4-metoxifenil)-2-etilhexiléster 2-propiónico   | 2-etilhexil metoxicinamato (2-EHMC) |    | 290.4                     | 5.8 <sup>92</sup>   | ---             | 0.155 <sup>94</sup>      |
|            | Ácido 2-ciano-3,3-difenil-2-etilhexiléster 2-propiónico | Octocrileno (OCT)                   |  | 361.5                     | 6.9 <sup>92</sup>   | ---             | 0.36 <sup>94</sup>       |

PM: peso molecular; K<sub>ow</sub>: constante de reparto octanol/agua; K<sub>a</sub>: constante de acidez; S: solubilidad en agua.

## Desarrollo experimental

**Tabla 4.** Estructura y propiedades fisicoquímicas de los PCP estudiados (continuación).

|                 | Nombre IUPAC                                       | Nombre común<br>(abreviación) | Estructura   | PM<br>(g mol <sup>-1</sup> ) | log K <sub>ow</sub> | pK <sub>a</sub>   | S<br>(µg mL <sup>-1</sup> ) |
|-----------------|--|-------------------------------|--|------------------------------|---------------------|-------------------|-----------------------------|
| Antimicrobianos | 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)-<br>fenol            | Triclosán<br>(TC)             |  | 289.6                        | 4.8 <sup>6</sup>    | 7.9 <sup>36</sup> | 1.3 <sup>94</sup>           |
|                 | 4-cloro-1-(2,4-diclorofenoxi)-<br>2-metoxi-benceno | Metiltriclosán<br>(MTC)       |  | 303.6                        | 5.2 <sup>33</sup>   | ---               | 0.64 <sup>94</sup>          |

PM: peso molecular; K<sub>ow</sub>: constante de reparto octanol/agua; Ka: constante de acidez; S: solubilidad en agua.

Sonda ultrasónica Cole-Parmer, modelo CPX130PB (115 V, 130 W, 20 kHz) equipada con punta de titanio.

Fibras de SPME con recubrimiento de polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB) de 65  $\mu\text{m}$  de espesor y un dispositivo (*holder*) para soportar la fibra, Supelco (EUA).

C<sub>18</sub> (PAH) de 45  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, Chromabond (Düren, Alemania) y frits de polietileno de 20  $\mu\text{m}$  de poro, Agilent (EUA).

Agua desionizada ultrapura tipo 1 se obtuvo de un equipo Millipore Direct-Q 3 UV.

### 5.3. Pretratamiento de muestras

El desarrollo de las metodologías se realizó utilizando lechuga francesa marca “eva” adquirida en un supermercado. Antes de su uso, se cortaron todas las hojas de la lechuga y se homogeneizaron en un procesador de alimentos marca Mouliunex. Los trozos de hoja de lechuga fueron almacenados en recipientes sellados a 4 °C. Después de dos semanas de la homogeneización de la lechuga se observaron alteraciones como el ennegrecimiento de las mismas. Debido a esto, fueron necesarias varias muestras de lechuga comercial a lo largo del desarrollo de las metodologías, utilizando cada una de ellas en un plazo máximo de diez días después de su homogeneización.

Las lechugas analizadas con una de las metodologías desarrolladas fueron cultivadas en el laboratorio utilizando semillas de lechuga francesa marca “Vita” adquiridas en un supermercado. Antes del análisis de las “*lechugas cultivadas*”, se cortaron las hojas, se enjuagaron con ~ 100 mL de agua desionizada para remover tierra y polvo, se secaron con un papel libre de pelusas y se homogeneizaron en trozos pequeños con un cuchillo.

También se analizó la raíz de las *lechugas cultivadas*. Antes de su análisis, se separaron las raíces del resto de la lechuga, se enjuagaron con ~ 100 mL de agua desionizada para remover tierra y polvo, se secaron con un papel libre de pelusa y se homogeneizaron con un cuchillo.

### 5.4. Condiciones cromatográficas

El análisis instrumental se realizó en un cromatógrafo de gases Agilent 6090N acoplado a un espectrómetro de masas 5973. Se utilizó un inyector *split/splitless* en modo *splitless* (1 min) a 250 °C. Se equipó el cromatógrafo de gases con una columna Phenomenex Zebron ZB-5 (30 m X 0.25 mm X 0.25 µm) para el método UAE-SPME-GC-MS y una Agilent J&W DB-5MS (30 m X 0.25 mm X 0.25 µm) para MSPD-GC-MS. El programa de temperatura aplicado fue: 120 °C durante 1 min, incremento de 10 °C min<sup>-1</sup> hasta 300 °C durante 5 min.

En el espectrómetro de masas se utilizó electro ionización (70 eV) y un cuadrupolo como analizador másico. La temperatura de la línea de transferencia, fuente de ionización y cuadrupolo fue de 280, 230 °C y 150 °C, respectivamente.

Para conocer los tiempos de retención de los PCP estudiados se analizó una mezcla de estándares (10 µg mL<sup>-1</sup>) en modo SCAN (monitoreando m/z: 50-500) y se compararon con los espectros adquiridos con la base de datos del Instituto Nacional de Estandarización y Tecnología de EUA (NIST). La identificación y cuantificación de los analitos se realizó en modo de monitoreo selectivo de iones (SIM). Los interferentes extraídos con las dos metodologías desarrolladas fueron diferentes, por lo que se seleccionó para cada método a los m/z que permitieran una selectividad mayor en el análisis instrumental, monitoreando en todos los casos el m/z correspondiente al pico base de cada analito. En la **Tabla 5** se muestran los m/z utilizados en el estudio de cada compuesto.

### 5.5. Determinación de PCP en lechuga mediante MSPD-GC-MS

Se desarrolló una metodología para la determinación de PCP en lechuga mediante dispersión de matriz en fase sólida seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (MSPD-GC-MS, por sus siglas en inglés). Se utilizó benzo[a]antraceno como estándar interno.

Se utilizó C<sub>18</sub> (PAH) como dispersante. Antes de su uso, se acondicionó transfiriendo 2g de éste a un cartucho de polipropileno de 6mL al que previamente le colocó un frit en la parte inferior y se agregaron 6mL de metanol al cartucho, permitiendo la elución del disolvente

por gravedad. Posteriormente, se dejó que el dispersante se secara completamente en el cartucho al vacío durante 12h.

**Tabla 5.** m/z para la identificación y cuantificación de los analitos en modo SIM.

| <b>Compuesto</b> | <b>MSPD-GC-MS</b> | <b>UAE-SPME-GC-MS</b> |
|------------------|-------------------|-----------------------|
|                  | <b>m/z</b>        | <b>m/z</b>            |
| <b>HHCB</b>      | 243,258           | 213,243               |
| <b>AHTN</b>      | 243,258           | 213,243               |
| <b>BP-3</b>      | 285*              | 227,228               |
| <b>4-MBC</b>     | 211,254           | 211,254               |
| <b>O-PABA</b>    | 165,277           | 165,277               |
| <b>2-EHMC</b>    | 178               | 161,178               |
| <b>OCT</b>       | 204,249           | 204,249               |
| <b>TC</b>        | 200,345*          | 218,288               |
| <b>MTC</b>       | 252,302           | 302,352               |

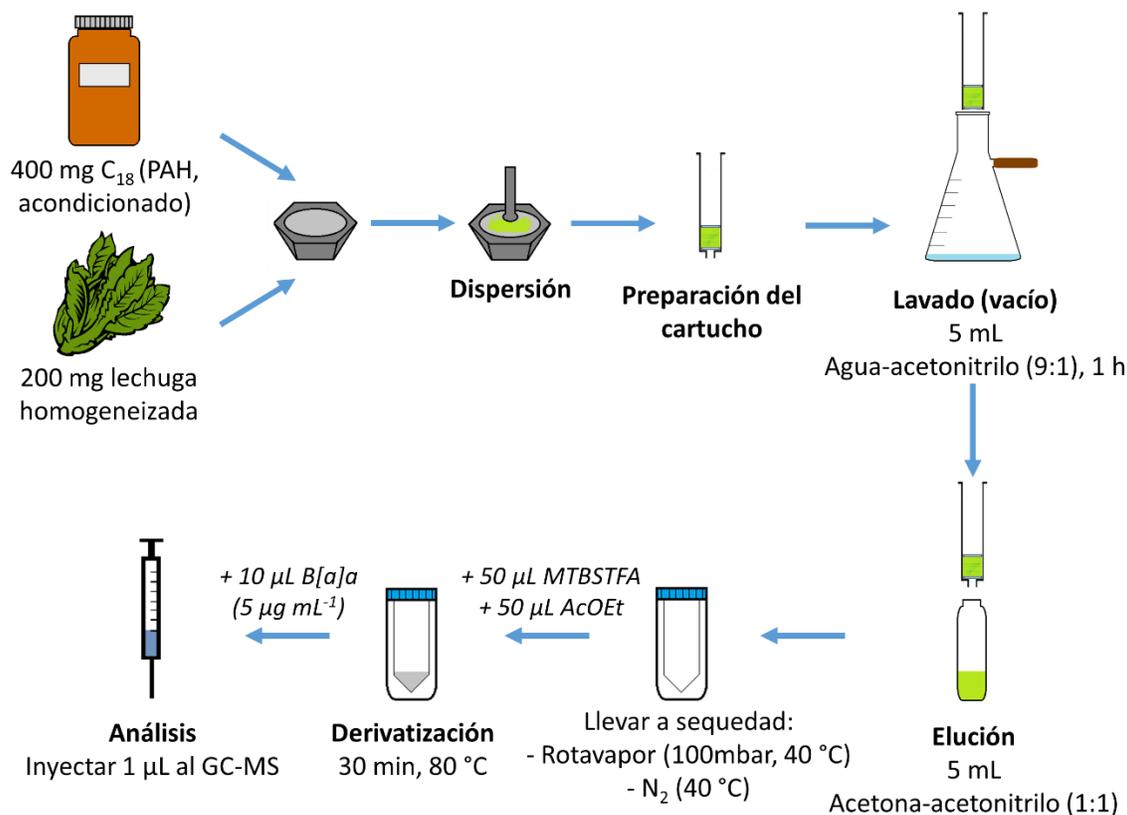
\* Compuestos analizados como el t-butildimetilsilil derivado del analito original.

### 5.5.1. Procedimiento de MSPD-GC-MS

Se colocaron 200 mg de lechuga fresca homogeneizada y 400 mg de C<sub>18</sub> (PAH), previamente acondicionado, en un mortero de Agatha y se homogeneizó suavemente con el pistilo durante 8min, provocando la disgregación de la muestra. Se transfirió la mezcla a un cartucho de polipropileno de 6 mL de capacidad en el que previamente se había colocado un frit en la parte inferior, se colocó un frit en la parte superior del cartucho y se compactó la mezcla. Posteriormente, se lavó el cartucho en el vacío utilizando 5 mL de una mezcla 9:1 de agua-acetonitrilo y se dejó secar al vacío durante 1 h. Se eluyeron los analitos por gravedad con 5 mL de una mezcla de acetona-acetonitrilo (1:1) y se evaporó el eluato aproximadamente a 1 mL en rotavapor (40 °C, 100 mbar). El extracto se transfirió a un vial de fondo cónico y se llevó a sequedad con un suave flujo de nitrógeno a 40 °C. Para realizar la derivatización se reconstituyó con 50 µL de acetato de etilo, se agregaron 50 µL de MTBSTFA, se

## Desarrollo experimental

homogeneizó durante 1 min utilizando un agitador Vortex y se calentó a 80 °C durante 30 min. Después se llevó el derivado a temperatura ambiente, se adicionaron 10 µL de benzo[a]antraceno a 5 µg mL<sup>-1</sup> (estándar interno, concentración final 450 ng mL<sup>-1</sup>), se homogeneizó en un agitador Vortex durante 1 min y se inyectó 1 µL al GC-MS. En la **Figura 8** se muestra el diagrama del procedimiento.



**Figura 8.** Procedimiento optimizado para la determinación de PCP en lechuga mediante MSPD-GC-MS.

### 5.5.2. Optimización de MSPD-GC-MS

Se realizó la optimización con lechuga comercial, la cual fue homogeneizada como se indica en la **Sección 5.3**. Para fortificar la lechuga con los analitos se colocaron 100 ó 200 mg de ésta sobre papel aluminio, se agregaron 100µL de un estándar con los PCP en estudio para obtener una concentración de 100ng g<sup>-1</sup> de cada uno y se dejó equilibrando durante dos horas antes de su análisis.

Los parámetros de la MSPD evaluados en el desarrollo de la metodología fueron: disolvente de elución, volumen de elución y cantidad de muestra.

### 5.5.2.1. Disolvente de elución

Los disolventes evaluados fueron acetonitrilo y una mezcla acetona-acetonitrilo (1:1). Se aplicó la metodología descrita en la **Sección 5.5.1.** utilizando 100mg de lechuga y eluyendo con 5mL del disolvente de elución en estudio.

### 5.5.2.2. Volumen de elución

Se estudió el volumen de la mezcla acetona-acetonitrilo (1:1) necesario para que los analitos eluyeran completamente del cartucho. Para esto se realizó el análisis de 100mg de lechuga de acuerdo a la **Sección 5.5.1.** adicionando consecutivamente al mismo cartucho 3, 2 y 2mL de la mezcla de disolventes. Cada eluato fue analizado por separado para determinar el volumen necesario con el que los analitos eluyeran totalmente de la dispersión.

### 5.5.2.3. Relación muestra-dispersante

Se evaluó la relación muestra-dispersante manteniendo constante la masa de dispersante (400 mg) y variando la cantidad de muestra utilizada (100, 200 y 400mg de lechuga). Se realizó la elución con 5mL de la mezcla acetona-acetonitrilo (1:1).

### 5.5.3. Validación del método

Se realizó la validación de la metodología optimizada con lechuga comercial fortificada (**Sección 5.5.2.**), evaluando la repetibilidad intra-día, linealidad, recobro y límites de detección y cuantificación.

### 5.5.3.1. Repetibilidad del método

Se evaluó la repetibilidad intra-día fortificando 200mg de lechuga a 100ng g<sup>-1</sup> y analizándola mediante la metodología optimizada (**Sección 5.5.1.**). El estudio se realizó por triplicado.

### 5.5.3.2. Límites de detección (LD)

Se consideró como límite de detección a la concentración en la que la intensidad de señal fuera al menos tres veces la relación señal/ruido, con excepción de los analitos que coelúan con interferencias presentes en el blanco de lechuga, HHCB y tbDMS-BP-3, cuyo límite de detección fue considerado como la concentración en la que el área de la señal fuera al menos dos veces mayor al área de la interferencia.

### 5.5.3.3. Límites de cuantificación (LC)

Se consideró como límite de cuantificación a la concentración en la que la intensidad de señal fuera al menos diez veces la relación señal/ruido, con excepción de los analitos que coelúan con interferencias presentes en el blanco de lechuga, HHCB y tbDMS-BP-3, cuyo límite de cuantificación fue considerado como la concentración en la que el área de la señal fuera al menos diez veces mayor al área de la interferencia.

### 5.5.3.4. Linealidad

Se estudió la linealidad del método para cada analito mediante la elaboración de una curva de calibración de cinco puntos, como se indica en la **Tabla 6**. El análisis se realizó por triplicado.

**Tabla 6.** Concentraciones evaluadas en la curva de calibración del análisis de PCP en lechuga mediante MSPD-GC-MS.

| <b>Grupo</b> | <b>Compuestos</b>                 | <b>Concentraciones evaluadas<br/>(ng g<sup>-1</sup>)</b> |
|--------------|-----------------------------------|--|
| <b>1</b>     | AHTN, 4-MBC, 2-EHMC, OCT, TC, MTC | 50, 163, 275, 388, 500                                   |
| <b>2</b>     | HHCB, O-PABA                      | 100, 200, 300, 400, 500                                  |
| <b>3</b>     | BP-3                              | 200, 275, 350, 425, 500                                  |

### 5.5.3.5. Recobro

Para evaluar el recobro del método a 100 ng g<sup>-1</sup>, se interpoló en la curva de calibración de cada analito el área relativa de la repetibilidad intra-día, obteniendo la concentración predicha para el compuesto. Posteriormente, el recobro se calculó matemáticamente de la siguiente manera:

$$Recobro = \frac{\text{concentración predicha (ng g}^{-1}\text{)}}{100 \text{ ng g}^{-1}} * 100$$

## 5.6. Determinación de PCP en lechuga mediante UAE-SPME-GC-MS

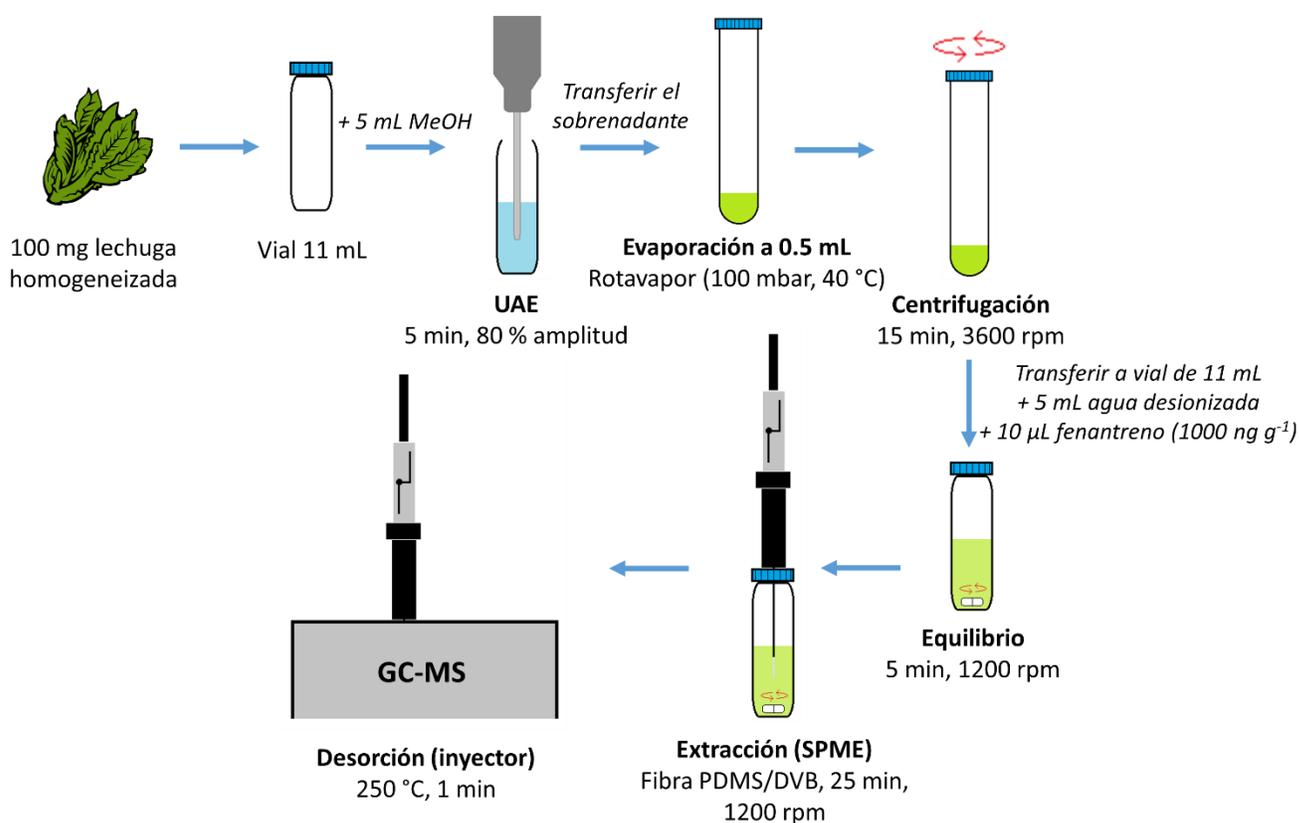
Se desarrolló y optimizó una metodología para la determinación de PCP en lechuga mediante extracción asistida por ultrasonido y microextracción en fase sólida seguidas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (UAE-SPME-GC-MS). Se utilizó fenantreno como estándar interno.

### 5.6.1. Procedimiento de UAE-SPME-GC-MS

Se colocaron 100 mg de lechuga en un vial de 11 mL y se adicionaron 5 mL de metanol. Se introdujo la sonda ultrasónica a la mitad del volumen del disolvente y se extrajo durante 5 min al 80 % de amplitud de la onda. Se transfirió el sobrenadante a un tubo graduado en el que se evaporó a un volumen de 0.5 mL en rotavapor (40 °C, 100 mbar). Se transfirió el extracto a un tubo de ensayo junto con 200 µL de metanol utilizados para el lavado del tubo

## Desarrollo experimental

graduado y se centrifugó a 3600 rpm durante 15 min. Posteriormente, se transfirió el sobrenadante a un vial de 11 mL, se adicionaron 5 mL de agua desionizada junto con 10  $\mu\text{L}$  de fenantreno a 1000  $\text{ng mL}^{-1}$  (estándar interno, concentración final 1.8  $\text{ng mL}^{-1}$ ) y se homogeneizó en un agitador Vórtex durante 1 min. Se adicionó una barra magnética de 10 mm de longitud, se selló con un tapón horadado de polipropileno y una septa de teflón y se agitó a 1200 rpm durante 5 min en una parrilla para equilibrar el sistema. Se realizó la SPME por inmersión con una fibra de PDMS-DVB durante 25 min agitando a 1200 rpm a temperatura ambiente. Después de la extracción, se retrajo la fibra y se realizó la desorción térmica de los analitos exponiéndola al inyector del GC-MS a 250 °C. La desorción se realiza durante el primer minuto del análisis cromatográfico, sin embargo, se expuso mantuvo expuesta la fibra durante 15 min para evitar acarreamiento de impurezas al análisis siguiente. En la **Figura 9** se muestra un esquema del procedimiento.



**Figura 9.** Procedimiento optimizado para la determinación de PCP en lechuga mediante UAE-SPME-GC-MS.

### 5.6.2. Optimización de UAE

Se realizó la optimización con lechuga comercial homogeneizada como se indica en la **Sección 5.3**. Se fortificó a  $100 \text{ ng g}^{-1}$  como se describe en la **Sección 5.5.2**.

Se optimizó la UAE mediante un diseño de experimentos factorial  $2^3$  siguiendo la metodología descrita en la **Sección 5.6.1**. Para el tratamiento de datos se utilizó el programa Statgraphics Centurion XV. El tratamiento estadístico fue realizado con el 95% de confianza. Los factores optimizados fueron tiempo de extracción: 3 y 5 min, cantidad de muestra: 100 y 200 mg, y amplitud de la onda: 30 y 80%.

### 5.6.3. Optimización de SPME

Se optimizó la SPME-GC-MS en agua ultrapura (tipo 1) fortificada con los analitos a  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ . Los parámetros optimizados para la SPME fueron: tiempo de extracción, temperatura de extracción y tiempo de derivatización.

Se utilizaron fibras con recubrimiento de polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB). Cada fibra nueva se acondicionó exponiéndola en el inyector del GC a  $250 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 min. Antes de cada análisis se realizó un blanco de fibra.

#### 5.6.3.1. Tiempo de extracción

Se evaluaron 15, 25, 35 y 45 min de extracción en la SPME. Se transfirieron 5 mL de agua fortificada con cada uno de los analitos ( $10 \text{ ng mL}^{-1}$ ) a un vial de 11 mL, se adicionaron  $100 \text{ } \mu\text{L}$  de fenantreno ( $10 \text{ ng mL}^{-1}$ , concentración final  $0.20 \text{ ng mL}^{-1}$ ) y se homogeneizó en un agitador Vortex durante 1 min. Se adicionó una barra de agitación magnética de 10 mm de longitud, se selló el vial con un tapón horadado de polipropileno y una septa de teflón y se agitó a 1200 rpm durante 5 min en una parrilla para equilibrar el sistema. Se realizó la SPME por inmersión con una fibra de PDMS-DVB durante el tiempo de extracción evaluado, agitando a 1200 rpm a temperatura ambiente. Después de la extracción, se realizó la derivatización en fibra exponiéndola al espacio de cabeza de un vial de 4 mL conteniendo  $50 \text{ } \mu\text{L}$  de MTBSTFA durante 15 min. Posteriormente se retrajo la fibra y se realizó la desorción

térmica exponiéndola en el inyector del GC-MS a 250 °C durante 1 min, pero se dejó expuesta la fibra en el inyector durante 10 min para evitar el acarreo de impurezas para la siguiente extracción. El análisis se realizó por triplicado.

### **5.6.3.2. Temperatura de extracción**

Se evaluó temperatura ambiente (23°C), 35, 45 y 55°C en la extracción de los analitos de agua fortificada como se indica en la **Sección 5.6.3.1**. Se realizó la SPME durante 25min. El análisis se realizó por triplicado.

### **5.6.3.3. Tiempo de derivatización**

Se evaluó el tiempo de derivatización en fibra de los analitos estudiando 5, 10, 15, 20 y 25min. El análisis se realizó por triplicado.

## **5.6.4. Validación del método**

Se realizó la validación de la metodología descrita en la **Sección 5.6.1** con lechuga comercial fortificada (**Sección 5.5.2**), evaluando la repetibilidad intra-día e inter-día, linealidad, recobro y límites de detección y cuantificación.

### **5.6.4.1. Repetibilidad**

Se estudió la repetibilidad intradía de la metodología a dos niveles: 100ng g<sup>-1</sup> y 200ng g<sup>-1</sup>. El análisis se realizó por quintuplicado en ambos niveles. Posteriormente se evaluó para cada nivel la repetibilidad inter-día a partir del quintuplicado del análisis intra-día y dos análisis por triplicado adicionales realizados en días diferentes (n=11 para cada nivel).

### 5.6.4.2. Límites de detección (LD)

Se consideró como límite de detección a la concentración en la que la intensidad de la señal fuera al menos 3 veces la relación señal/ruido. En el caso de los analitos que coelúan con interferencias presentes en el blanco de lechuga (HHCB, AHTN y BP-3), el límite de detección fue la concentración en la que el área de la señal fuera al menos dos veces mayor al área de la interferencia.

### 5.6.4.3. Límites de cuantificación (LC)

Se consideró como límite de cuantificación a la concentración en la que la intensidad de la señal fuera al menos 10 veces la relación señal/ruido. En el caso de los analitos que coelúan con interferencias presentes en el blanco de lechuga (HHCB, AHTN y BP-3), el límite de cuantificación fue la concentración en la que el área de la señal fuera al menos diez veces mayor al área de la interferencia.

### 5.6.4.4. Linealidad

Se estudió la linealidad del método para cada analito mediante la elaboración de una curva de calibración de cinco puntos, como se indica en la **Tabla 7**. El análisis se realizó por triplicado.

### 5.6.4.5. Recobro

Para evaluar el recobro del método a 100 y 200 ng g<sup>-1</sup>, se interpoló en la curva de calibración de cada analito el área relativa de la repetibilidad intra-día, obteniendo la concentración predicha para el compuesto. Posteriormente, el recobro se calculó matemáticamente de la siguiente manera:

$$\text{Recobro} = \frac{\text{concentración predicha (ng g}^{-1}\text{)}}{\text{concentración evaluada (ng g}^{-1}\text{)}} * 100$$

**Tabla 7.** Concentraciones evaluadas en la curva de calibración del análisis de PCP en lechuga mediante UAE-SPME-GC-MS.

| Grupo | Compuestos  | Concentraciones evaluadas<br>(ng g <sup>-1</sup> ) |
|-------|---|--|
| 1     | HHCB, AHTN, BP-3, 4-MBC, 2-EHMC,<br>O-PABA, TC, MTC | 25, 81, 138, 194, 250                              |
| 2     | OCT   | 50, 100, 150, 200, 250                             |

### 5.7. Análisis de lechuga irrigada con agua fortificada

*Procedimiento.* Se sembraron varias semillas en una maceta de 1.85 L de capacidad utilizando 1.1 kg de tierra comercial marca Vigoro. Cuando las plántulas alcanzaron una altura aproximada de 5cm (~ 2 semanas), se eligieron las mejores y se trasplantaron individualmente a macetas de 3.75 L de capacidad con 2.3 kg de tierra.

Se regaron las lechugas con agua de la llave. Cada irrigación consistió en 500 mL, aproximadamente, sin embargo, la cantidad de irrigaciones semanales necesarias para mantener húmeda la tierra varió dependiendo de la estación del año. En general, en primavera y verano se irrigó las lechugas diariamente, en otoño tres veces a la semana y en invierno dos veces a la semana.

Tres meses después de la siembra se dividió a las lechugas en dos grupos. El primer grupo "*lechugas cultivadas control*" se continuaron regando sólo con agua de la llave. El segundo grupo "*lechugas cultivadas irrigadas con PCP*" se irrigaron diariamente con 40mL de agua de la llave fortificada con cada uno de los PCP en estudio a 1000ng mL<sup>-1</sup>.

Aproximadamente cinco meses después de la siembra, se analizaron las lechugas cultivadas control y las lechugas cultivadas irrigadas con PCP. Para ésto, se realizó el pretratamiento de las hojas como se indica en la **Sección 5.3.** y se analizaron mediante UAE-SPME-GC-MS (**Sección 5.6.1.**). Todos los análisis se realizaron por triplicado.

En la **Figura 10** se muestra una fotografía de una lechuga cultivada control en diferentes etapas de su crecimiento.



**Figura 10.** Lechuga cultivada control. Tiempo después de la siembra: **A.** 3 días; **B.** 42 días.

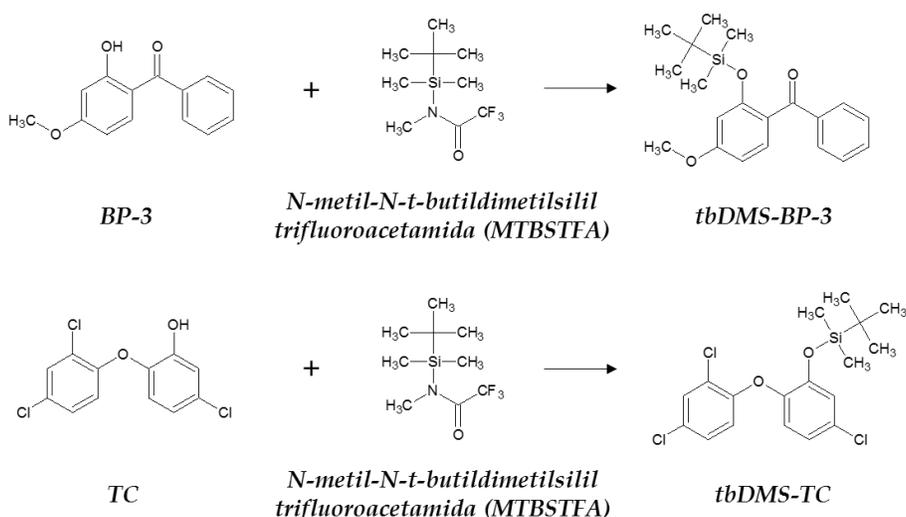
### **5.8. Análisis de la raíz de las lechugas cultivadas**

El análisis se realizó mediante UAE-SPME-GC-MS (**Sección 5.6.1.**). Debido a la escasa cantidad recuperada de raíces ( $\text{masa}_{\text{hoja}}/\text{masa}_{\text{raíz}} = 8$ , aproximadamente), sólo se analizaron 102.8 mg de lechuga cultivada control y 48.4 mg de lechuga cultivada irrigada con PCP.

## 6. Resultados y discusión

### 6.1. Derivatización

De todos los compuestos estudiados, sólo BP-3 y TC presentan un grupo hidroxilo que disminuye su volatilidad, dificultando su análisis mediante GC-MS. En el análisis de lechuga mediante MSPD-GC-MS, se realizó la sililación de BP-3 y TC para mejorar su determinación mediante GC-MS. Para ésto, se llevó el extracto a sequedad, se reconstituyó en 50  $\mu$ L de acetato de etilo, se agregaron 50  $\mu$ L de MTBSTFA y se calentó durante 30 min. Debido a que el agente sililante (MTBSTFA) sólo reacciona con hidrógenos ácidos, los demás analitos no fueron afectados por la derivatización. La reacción química (mostrada en la **Figura 11**) consistió en la sustitución del hidrógeno ácido de BP-3 y TC por un grupo t-butildimetilsilil (tbDMS), produciendo los derivados t-butildimetilsilil-oxibenzona (tbDMS-BP-3) y t-butildimetilsilil-triclosán (tbDMS-TC).



**Figura 11.** Reacción de derivatización de BP-3 y TC con MTBSTFA.

### 6.2. Determinación de PCP en lechuga mediante MSPD-GC-MS

La MSPD es una técnica que combina la extracción de compuestos de matrices sólidas, semisólidas o viscosas y la limpieza del extracto. Debido a que en la elución de los analitos se arrastran impurezas de la muestra que pueden ocasionar interferencias en el análisis, en

algunos casos se realiza una limpieza adicional después de la extracción con MSPD. En este trabajo no se implementó dicha limpieza debido a que no se observaron demasiadas interferencias en el análisis del blanco de lechuga (**Sección 6.2.1.3.**). Adicionalmente, la limpieza ocasionaría un aumento en el tiempo de análisis y reactivos utilizados, significando una desventaja importante con respecto a la UAE-SPME-GC-MS desarrollada.

Inicialmente se utilizó fenantreno como estándar interno, sin embargo, debido la presencia de una interferencia en el mismo tiempo de retención observada en el blanco de lechuga, se cambió por benzo[a]antraceno.

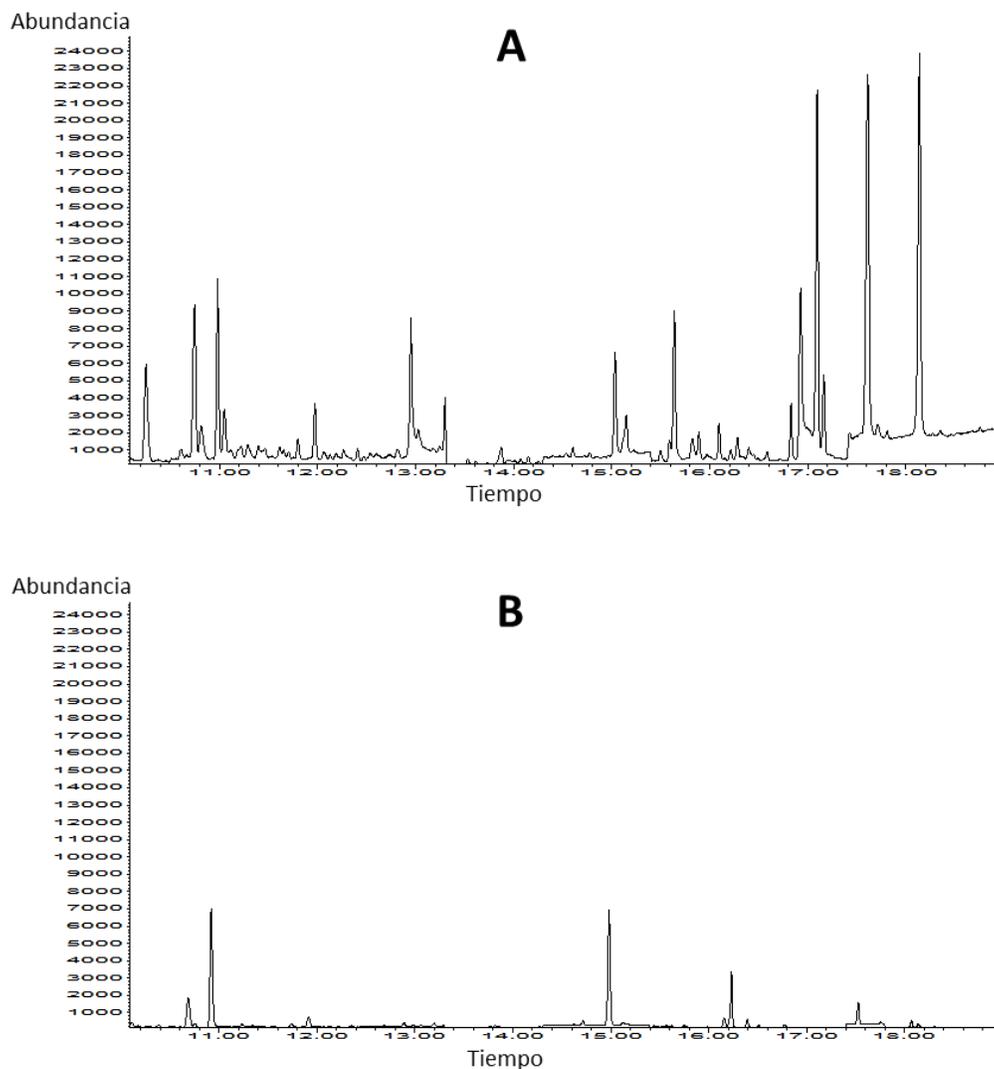
### 6.2.1. Optimización de MSPD-GC-MS

#### 6.2.1.1. Disolvente de elución

Ya que el dispersante utilizado fue C<sub>18</sub>, la elución de los analitos se debía de realizar con los disolventes polares o de polaridad intermedia normalmente utilizados en HPLC de fase reversa (agua, metanol, acetonitrilo o una mezcla de éstos). Los analitos son poco solubles en agua (como indica la **Tabla 3**) y la elución con metanol produce un aumento considerablemente la extracción de pigmentos, los cuales dificultan la preparación de muestra y podrían interferir con el análisis instrumental; por lo tanto, se evaluó acetonitrilo como disolvente de elución.

Al realizar un blanco de lechuga eluyendo con acetonitrilo, se observaron pequeños picos en los tiempos de retención de HHCB, AHTN, 4-MBC, tbDMS-BP-3 y 2-EHMC (**Figura 12. A**). Para disminuir las interferencias extraídas, se probó disminuir la polaridad del disolvente de elución con utilizando la mezcla acetona-acetonitrilo (1:1). Al utilizar esta mezcla de elución, se obtuvieron cromatogramas más limpios, sin embargo, también se observaron interferencias para HHCB y tbDMS-BP-3 (**Figura 12. B**). Se seleccionó como óptima para la elución la mezcla acetona-acetonitrilo (1:1) ya que, con ésta, se eluyó una menor cantidad de impurezas procedentes de la matriz.

## Resultados y discusión



**Figura 12.** Análisis por MSPD-GC-MS en modo SIM de un blanco de lechuga utilizando como disolvente de elución. **A.** Acetonitrilo; **B.** Mezcla acetona-acetonitrilo (1:1).

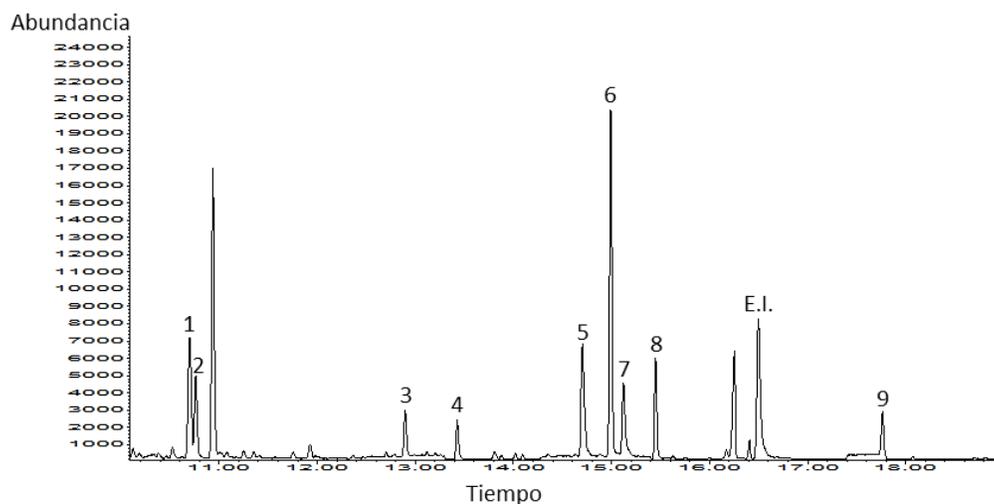
### 6.2.1.2. Volumen de elución

Al eluir un mismo cartucho consecutivamente con 3, 2 y 2 mL de la mezcla acetona-acetonitrilo (1:1), se determinó que los analitos, con excepción de BP-3, se recuperaron totalmente con los 3 mL iniciales, ya que en el análisis de las dos eluciones siguientes no se observó a estos compuestos. BP-3 requirió en total de 5 mL (3+2 mL) para eluir completamente. Se eligió como volumen de elución óptimo 5 mL para recuperar totalmente a todos los analitos utilizando el volumen mínimo de la mezcla de disolventes.

### 6.2.1.3. Relación muestra-dispersante

Se mantuvo constante la masa del dispersante (400 mg) durante este estudio. Al utilizar 400 mg de muestra (relación muestra-dispersante 1:1) se observó que, a mayor masa de lechuga analizada, aumentaba la extracción de pigmentos, lo que dificultaba la evaporación del extracto para su preconcentración. Por otro lado, al analizar 100 o 200 mg de muestra (relación 1:4 y 1:2, respectivamente), se extrajeron menos pigmentos, lo que facilitó la evaporación del extracto. Se seleccionó una relación 1:2 (200 mg de lechuga y 400 mg de dispersante) como óptima para analizar concentraciones traza de contaminantes sin interferencias de los pigmentos.

En la **Figura 13** se muestra un cromatograma del análisis de PCP en lechuga fortificada a  $100\text{ ng g}^{-1}$  mediante MSPD-GC-MS utilizando la metodología optimizada, descrita en la **Sección 5.5.1**.



**Figura 13.** Análisis por MSPD-GC-MS en modo SIM de lechuga comercial fortificada a  $100\text{ ng g}^{-1}$  con los PCP estudiados. 1. HHCB; 2. AHTN; 3. 4-MBC; 4. MTC; 5. O-PABA; 6. tbDMS-BP-3; 7. 2-EHMC; 8. tbDMS-TC; 9. OCT; E.I. Benzo[a]antraceno.

### 6.2.2. Validación del método

#### 6.2.2.1. Repetibilidad

Se obtuvieron %CV menores al 12% con excepción de HHCB y 2-EHMC (CV<23%), lo que es aceptable para un análisis a nivel de trazas.<sup>95</sup> En la **Tabla 8** se muestran los coeficientes de variación (%CV) intra-día determinados para cada analito.

#### 6.2.2.2. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC)

Debido a las interferencias observadas, los LD y LC de HHCB y tbDMS-BP-3 fueron mayores a los determinados para los otros PCP en estudio (**Tabla 8**). De acuerdo con la **Sección 2.6.**, el LD de HHCB fue mayor a los reportados en la literatura (0.1-25 ng g<sup>-1</sup>), por otra parte, se alcanzaron LD aceptables para la mayoría de los filtros UV (LD<25 ng g<sup>-1</sup>), los cuales no habían sido determinados anteriormente en vegetales.

#### 6.2.2.3. Linealidad

Se observó una tendencia lineal para todos los casos ( $R^2>0.9700$ ), con excepción de tbDMS-BP-3 ( $R^2=0.9156$ ), probablemente debido a la variación de la interferencia observada en el blanco de lechuga. Los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) y las ecuaciones lineales para cada analito se encuentran en la **Tabla 8**. En el **Anexo I** se muestran las curvas de calibración de los PCP en estudio.

#### 6.2.2.4. Recobro

Como se muestra en la **Tabla 8**, se obtuvieron recobros aceptables ( $100 \pm 20$  %) para todos los analitos con excepción de HHCB, AHTN y MTC. Al calcular el recobro de HHCB se obtuvo un CV mayor al 500% debido a la variación de la interferencia observada en el tiempo de retención de este analito. Ya que este resultado es ilógico, el recobro de HHCB no fue reportado.

## Resultados y discusión

**Tabla 8.** Resultados de la validación para la determinación de PCP en lechuga mediante MSPD-GC-MS.

| <b>Compuesto</b>  | <b>CV (%)<br/>100 ng g<sup>-1</sup><br/>(n=3)</b> | <b>LD<br/>(ng g<sup>-1</sup>)</b> | <b>LC<br/>(ng g<sup>-1</sup>)</b> | <b>Ecuación lineal</b> | <b>Intervalo<br/>lineal (ng g<sup>-1</sup>)</b> | <b>R<sup>2</sup></b> | <b>Recobro (%)<br/>100 ng g<sup>-1</sup><br/>(n=3)</b> |
|-------------------|---|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------------|---|----------------------|--|
| <b>HHCB</b>       | 22.74   | 75                                | 100                               | $y=0.0036x+0.7144$     | 100-500   | 0.9829               | ---  |
| <b>AHTN</b>       | 7.07  | 25                                | 50                                | $y=0.0033x+0.2335$     | 50-500  | 0.9823               | 56.32 ± 13.46  |
| <b>tbDMS-BP-3</b> | 11.87   | 100                               | >200                              | $y=0.0090x+0.8812$     | 200-500   | 0.9156               | 79.64 ± 11.66  |
| <b>4-MBC</b>      | 5.79  | 25                                | 50                                | $y=0.0016x+0.0823$     | 50-500  | 0.9729               | 87.23 ± 7.92   |
| <b>O-PABA</b>     | 11.50   | 50                                | 100                               | $y=0.0066x+0.2016$     | 100-500   | 0.9958               | 89.41 ± 15.42  |
| <b>2-EHMC</b>     | 20.35   | 25                                | 50                                | $y=0.0041x+0.1279$     | 50-500  | 0.9916               | 87.71 ± 23.22  |
| <b>OCT</b>        | 8.64  | 25                                | 50                                | $y=0.0016x+0.0537$     | 50-500  | 0.9977               | 126.26 ± 10.94   |
| <b>tbDMS-TC</b>   | 11.12   | 25                                | 50                                | $y=0.0039x+0.1712$     | 50-500  | 0.9983               | 81.80 ± 17.05  |
| <b>MTC</b>        | 3.65  | 25                                | 50                                | $y=0.0017x+0.0722$     | 50-500  | 0.9749               | 76.81 ± 5.67   |

### 6.3. Determinación de PCP en lechuga mediante UAE-SPME-GC-MS

Para realizar una extracción eficiente con la sonda ultrasónica es necesario aumentar la homogeneidad y la superficie de contacto de la muestra,<sup>96</sup> por lo que en los ensayos preliminares se utilizó lechuga liofilizada y pulverizada. Sin embargo, después de la UAE no fue posible separar del extracto las partículas de muestra suspendidas, resultando en su presencia durante la SPME. Debido a que las partículas de lechuga pueden adsorberse en el sorbente de la fibra, disminuyendo su eficiencia e incluso dañar a la fibra, se decidió analizar lechuga fresca en lugar de liofilizada, a pesar de que esto pudiera disminuir la precisión y eficiencia del método debido al decremento en la homogeneidad y superficie de contacto de la muestra. Al realizar la UAE de una lechuga blanco se obtuvo un extracto transparente de color verde claro, por lo que fue posible analizarlo mediante SPME sin dañar la fibra.

Al analizar lechuga fortificada utilizando una columna nueva (la anterior perdió eficiencia), se observó la coelución de tbDMS-BP-3 y 2-EHMC. Ya que no fue posible separar a estos compuestos mediante la modificación del programa de temperatura, se realizaron pruebas sin derivatización, observando la separación a línea base de todos los analitos. Debido a esto, se eliminó la derivatización de la metodología. Al no realizar la derivatización, la respuesta de todos los analitos disminuyó, probablemente debido a que la presencia de MTBSTFA mejoraba su transferencia del inyector a la columna, sin embargo, al omitir el paso de derivatización, el tiempo de análisis disminuyó y se evitó el uso de un reactivo tóxico en la metodología.

#### 6.3.1. Optimización de UAE

El diseño de experimentos para la optimización de la UAE mostró la importancia de los factores estudiados: tiempo de extracción, amplitud de la onda y cantidad de muestra.

Los diagramas de Pareto obtenidos del diseño de experimentos (**Anexo II**) mostraron la influencia de los factores en la extracción individual de cada analito. La extracción con 100 mg de muestra fue significativa para O-PABA y 2-EHMC. Los demás factores e interacciones binarias entre factores no fueron estadísticamente significativos para ninguno

de los compuestos estudiados. Por lo tanto, se consideró 100 mg como el valor óptimo de muestra.

Debido a que, en la mayoría de los casos, la variación de los factores no es significativa en la extracción de los analitos, es posible que dichas variaciones sean demasiado pequeñas como para observar un cambio en la respuesta. Sin embargo, los niveles evaluados de la masa de lechuga y tiempo de extracción debían de ser magnitudes bajas debido a que el objetivo del trabajo era desarrollar una metodología miniaturizada. Adicionalmente, los valores estudiados para cada factor son comúnmente utilizados en la UAE de alimentos en la literatura.<sup>96</sup> Por otro lado, a pesar de que la variación de la amplitud de onda fue pronunciada, también se observó que la extracción de los analitos no dependía de ésta.

El tiempo de extracción y amplitud de onda seleccionados para la metodología fueron 5 min y 80 %, respectivamente, ya que una amplitud de onda mayor ocasiona que la cavitación sea más fuerte y, al aplicarla durante más tiempo, se provoca la ruptura de los trozos de lechuga en partículas más pequeñas, aumentando la homogeneidad y superficie de contacto de la muestra.

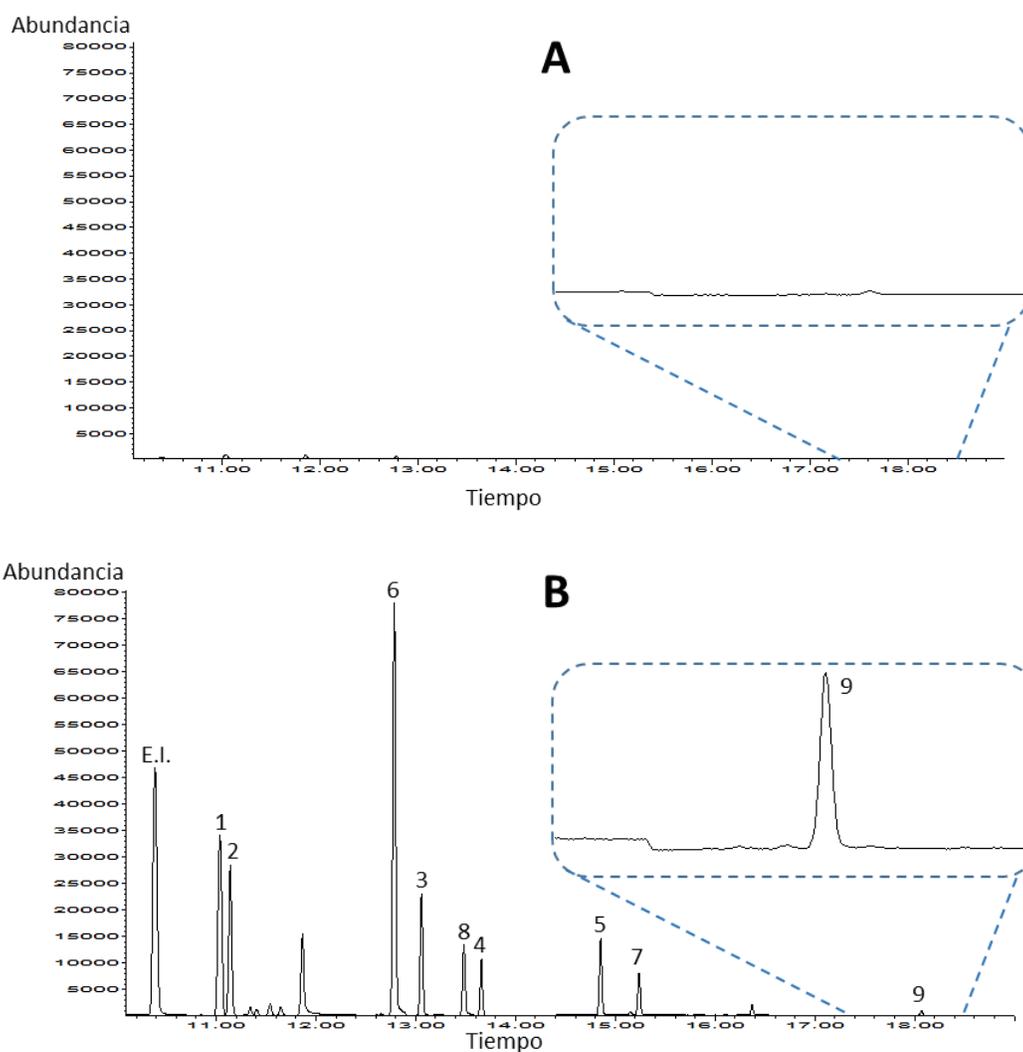
Utilizando las condiciones optimizadas, se realizó el análisis de lechuga comercial blanco y fortificada con los PCP estudiados a  $100 \text{ ng g}^{-1}$  (**Figura 14**). La alta selectividad de la SPME permitió que el blanco de lechuga presentara pocas impurezas de la matriz, sin embargo, se observó la presencia de picos en los tiempos de retención de HHCB, AHTN y BP-3. Debido a que estas interferencias fueron poco intensas, no afectaron significativamente al análisis. En la extracción de la lechuga fortificada se observó una resolución adecuada para todos los analitos.

### 6.3.2. Optimización de SPME

La optimización de SPME-GC-MS se realizó en agua fortificada con los PCP estudiados. El recubrimiento de la fibra utilizada, PDMS-DVB, ha sido aplicado anteriormente al análisis de HHCB y AHTN con buenos resultados (**Sección 2.6**).<sup>27,32</sup> Debido al carácter medianamente polar del recubrimiento, se esperaba que también extrajera eficientemente a los demás analitos, sin embargo, se predijo una extracción menor para OCT, debido a que su

## Resultados y discusión

alto carácter hidrofóbico ( $\log K_{ow}=6.9$ ) probablemente disminuiría su afinidad por el sorbente.



**Figura 14.** Análisis por UAE-SPME-GC-MS en modo SIM de lechuga comercial. **A.** Blanco de lechuga; **B.** Lechuga fortificada a 100 ng g<sup>-1</sup>. 1. HHCB; 2. AHTN; 3. 4-MBC; 4. MTC; 5. O-PABA; 6. BP-3; 7. 2-EHMC; 8. TC; 9. OCT; E.I. Fenantreno.

### 6.3.2.1. Tiempo de extracción

Se observó que, en el intervalo de tiempo estudiado, HHCB, AHTN, 4-MBC, O-PABA, 2-EHMC y MTC se encontraron en el intervalo cinético. La extracción de BP-3 y TC presentó un máximo en 35 min y la de OCT se mantuvo constante hasta los 25min y disminuyó ligeramente a tiempos mayores. La precisión del análisis dependió del tiempo de extracción. Se observó alta variabilidad para BP-3 y OCT en todos tiempos evaluados (CV de 30-65 %); en 35 y 45 min para O-PABA y 2-EHMC (CV>30 %) y a los 45 min para TC. Debido a que algunos compuestos presentaron variabilidad mayor a 35 y 45 min de extracción, se escogió 25 min como el valor óptimo. En el **Anexo III** se muestran la variación de la respuesta con respecto al tiempo de extracción para cada PCP estudiado.

### 6.3.2.2. Temperatura de extracción

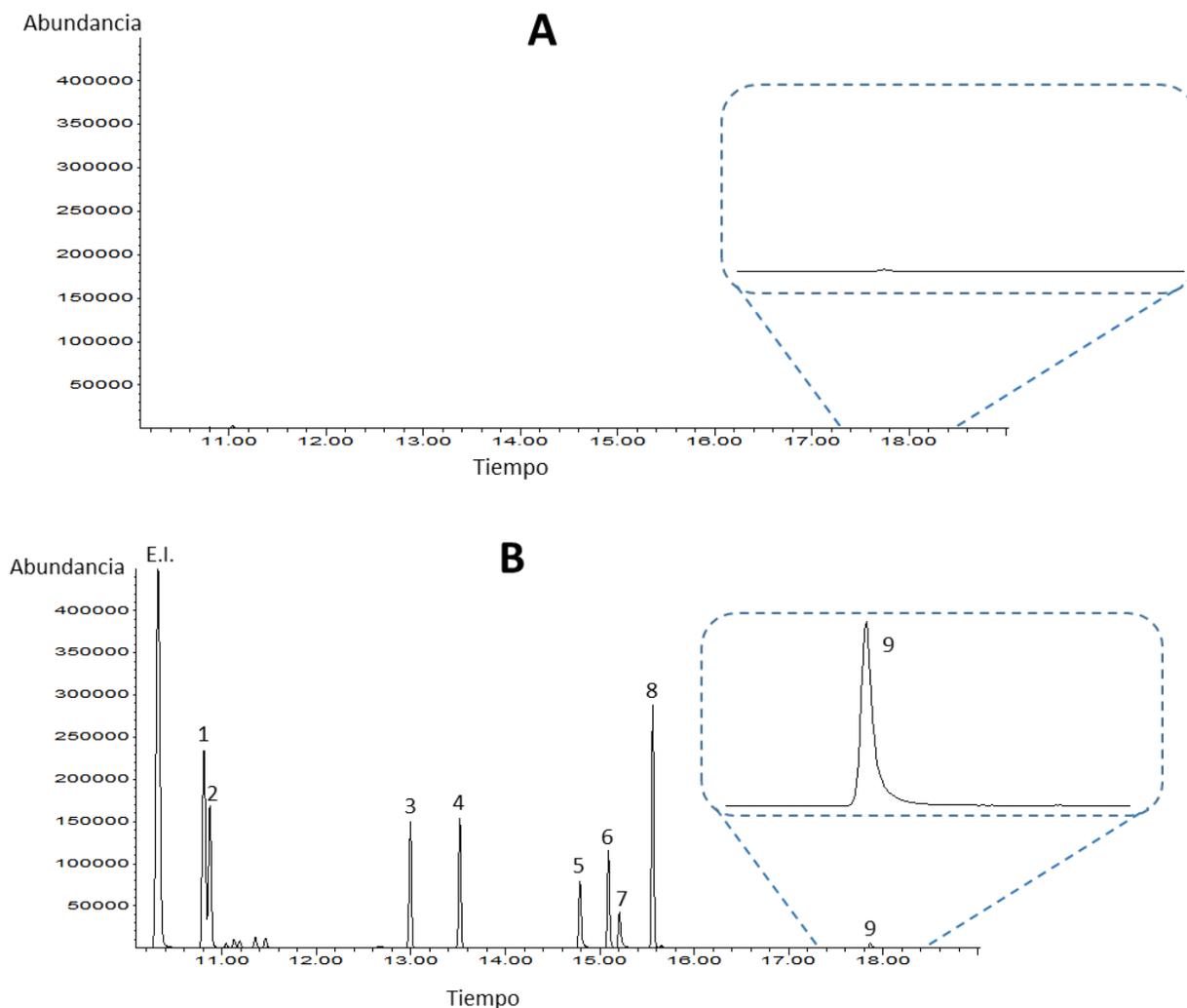
La respuesta de los analitos no aumentó significativamente con la temperatura. Adicionalmente, la variabilidad del análisis a temperatura ambiente fue menor para todos los analitos. Por lo tanto, se eligió a temperatura ambiente como el valor óptimo.

### 6.3.2.3. Tiempo de derivatización

La variación del tiempo de derivatización en fibra no influyó significativamente en la respuesta de tbDMS-BP-3 y tbDMS-TC. A pesar de que los PCP restantes no reaccionan químicamente con MTBSTFA, se observó que la variabilidad de todos los analitos aumentó al utilizar 5 min de derivatización. Para minimizar el tiempo de análisis y la variabilidad, se eligió 10 min como el tiempo de derivatización óptimo.

En la **Figura 15** se muestra un cromatograma del análisis de agua desionizada y agua fortificada a 10 ng g<sup>-1</sup> con los PCP estudiados mediante SPME-GC-MS. En el **Anexo IV** se muestra el estudio de la precisión y linealidad de la SPME-GC-MS.

## Resultados y discusión



**Figura 15.** Análisis por SPME-GC-MS en modo SIM de agua. **A.** Blanco de agua; **B.** Agua fortificada con los PCP a  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ . 1. HHCb; 2. AHTN; 3. 4-MBC; 4. MTC; 5. O-PABA; 6. tbDMS-BP-3; 7. 2-EHMC; 8. tbDMS-TC; 9. OCT; E.I. Fenantreno.

### 6.3.3. Validación del método

#### 6.3.3.1. Repetibilidad del método

En la **Tabla 9** se muestra la repetibilidad intra e inter-día del método expresada como el %CV del análisis. Como se esperaba, la variación a  $200 \text{ ng g}^{-1}$  fue menor a la de  $100 \text{ ng g}^{-1}$  para casi todos los analitos. En general, se observó que el %CV del análisis intra e inter-día fue similar ( $\pm 5 \%$ ), con excepción de 2-EHMC y OCT en  $100 \text{ ng g}^{-1}$ .

### 6.3.3.2. Límites de detección y cuantificación del método

El LD de HHCB AHTN y TC ( $1 \text{ ng g}^{-1}$  para los tres) es comparable con los mencionados en la literatura (**Sección 2.6.**). El LC de HHCB ( $80 \text{ ng g}^{-1}$ ) fue mayor al de los otros analitos debido a la interferencia observada en su tiempo de retención y a su menor sensibilidad. OCT presentó un LD mayor que los otros analitos, probablemente debido a su baja volatilidad y a su menor afinidad por el recubrimiento de la fibra debido a su fuerte carácter hidrofóbico. A pesar de la presencia de una interferencia en el tiempo de retención de HHCB, el límite de detección de este compuesto es similar al de otros analitos ( $1 \text{ ng g}^{-1}$ ) debido a que su respuesta es alta; sin embargo, debido a su baja sensibilidad y a la variación de la interferencia, es necesario aumentar significativamente su concentración para llegar al límite de cuantificación ( $80 \text{ ng g}^{-1}$ ). En la **Tabla 9** se muestran los LD y LC obtenidos para cada analito.

### 6.3.3.3 Linealidad del método

Se observó una tendencia lineal ( $R^2 > 0.9700$ ) para todos los analitos con excepción de OCT ( $R^2 = 0.9648$ ). En el **Anexo V** se muestran las curvas de calibración de cada analito. En la **Tabla 9** se muestra la linealidad observada para cada analito, representada como  $R^2$ .

### 6.3.3.4. Recobro

Como se muestra en la **Tabla 9**, se obtuvieron recobros aceptables ( $100 \pm 20 \%$ ) a  $100 \text{ ng g}^{-1}$  para todos los analitos, sin embargo, se observó una tendencia en los recobros a  $200 \text{ ng g}^{-1}$  ya que en todos los casos fueron mayores al  $118 \%$ .

## Resultados y discusión

**Tabla 9.** Resultados de la validación para la determinación de PCP en lechuga mediante UAE-SPME-GC-MS.

| Compuesto     | Intra-día                      |                                | Inter-día                       |                                 | LD<br>(ng g <sup>-1</sup> ) | LC<br>(ng g <sup>-1</sup> ) | Ecuación lineal               | Intervalo<br>lineal (ng g <sup>-1</sup> ) | R <sup>2</sup> |
|---------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---|----------------|
|               | CV (%)                         | CV (%)                         | CV (%)                          | CV (%)                          |                             |                             |                               |   |                |
|               | 100ng g <sup>-1</sup><br>(n=5) | 200ng g <sup>-1</sup><br>(n=5) | 100ng g <sup>-1</sup><br>(n=11) | 200ng g <sup>-1</sup><br>(n=11) |                             |                             |                               |   |                |
| <b>HHCB</b>   | 16.15                          | 9.88                           | 11.07                           | 14.25                           | 1                           | 80                          | y=0.0031x+0.0405              | 25-250                                    | 0.9949         |
| <b>AHTN</b>   | 16.63                          | 10.84                          | 11.67                           | 12.31                           | 1                           | 5                           | y=0.0021x-0.0028              | 25-250                                    | 0.9948         |
| <b>BP-3</b>   | 24.46                          | 16.07                          | 26.02                           | 20.02                           | 1                           | 5                           | y=0.0059x-0.0561              | 25-250                                    | 0.9777         |
| <b>4-MBC</b>  | 19.12                          | 12.27                          | 14.81                           | 15.32                           | 1                           | 5                           | y=0.0016x-0.0123              | 25-250                                    | 0.9991         |
| <b>O-PABA</b> | 12.89                          | 13.10                          | 17.71                           | 11.69                           | 5                           | 10                          | y=0.0009x-0.0082              | 25-250                                    | 0.9900         |
| <b>2-EHMC</b> | 15.90                          | 16.37                          | 28.48                           | 13.83                           | 1                           | 5                           | y=0.0005x-0.0052              | 25-250                                    | 0.9853         |
| <b>OCT</b>    | 17.52                          | 23.30                          | 32.34                           | 21.15                           | 25                          | 50                          | y=5*10 <sup>-5</sup> x-0.0015 | 50-250                                    | 0.9648         |
| <b>TC</b>     | 17.26                          | 14.99                          | 18.92                           | 14.61                           | 1                           | 5                           | y=0.0009x+0.0324              | 25-250                                    | 0.9702         |
| <b>MTC</b>    | 12.56                          | 10.16                          | 9.39                            | 10.05                           | 1                           | 5                           | y=0.0006x+0.0099              | 25-250                                    | 0.9844         |

**Tabla 9.** Resultados de la validación para la determinación de PCP en lechuga mediante UAE-SPME-GC-MS.

| Compuesto     | Recobro (%)                    | Recobro (%)                    |
|---------------|--------------------------------|--------------------------------|
|               | 100ng g <sup>-1</sup><br>(n=5) | 200ng g <sup>-1</sup><br>(n=5) |
| <b>HHCB</b>   | 117.65 ± 17.95                 | 130.63 ± 10.37                 |
| <b>AHTN</b>   | 121.40 ± 16.45                 | 133.21 ± 10.79                 |
| <b>BP-3</b>   | 109.42 ± 22.34                 | 130.73 ± 15.48                 |
| <b>4-MBC</b>  | 117.65 ± 17.87                 | 130.64 ± 11.91                 |
| <b>O-PABA</b> | 107.28 ± 11.79                 | 121.56 ± 12.61                 |
| <b>2-EHMC</b> | 96.74 ± 14.19                  | 118.02 ± 15.65                 |
| <b>OCT</b>    | 112.18 ± 12.83                 | 135.61 ± 28.10                 |
| <b>TC</b>     | 88.59 ± 24.27                  | 124.04 ± 17.16                 |
| <b>MTC</b>    | 116.33 ± 14.34                 | 129.46 ± 10.81                 |

### 6.4. Comparación de MSPD-GC-MS y UAE-SPME-GC-MS en el análisis de PCP en lechuga

En la **Tabla 10** se compara la sensibilidad, precisión y linealidad de las metodologías desarrolladas para el análisis de PCP en lechuga. Con base en los LD, se observó que UAE-SPME-GC-MS es de 2 a 100 veces más sensible que MSPD-GC-MS. Ésto se debe a la selectividad y preconcentración de los analitos que proporciona la SPME.

En general, la variabilidad intra-día a  $100 \text{ ng g}^{-1}$  en MSPD-GC-MS fue menor a la de UAE-SPME-GC-MS. Ésto no se esperaba debido a que MSPD requiere mayor manipulación de la muestra, lo que ocasiona que la variación del análisis aumente. Probablemente, la variabilidad de UAE-SPME-GC-MS es mayor debido a la heterogeneidad de los trozos de lechuga analizados ya que, como se describió en la **Sección 6.3.**, el tamaño de la muestra es un parámetro crítico en la UAE. A pesar de ésto, la precisión de UAE-SPME-GC-MS ( $\text{CV} < 25 \%$ ) es totalmente aceptable para el análisis de PCP en lechuga a nivel de trazas.

La linealidad de los analitos en los intervalos de concentración estudiados fue similar para ambos métodos, con excepción de BP-3 en MSPD-GC-MS ( $R^2=0.9156$ ). La linealidad y precisión de OCT fueron menores en UAE-SPME-GC-MS, probablemente debido a que es una molécula altamente hidrofóbica ( $\log K_{ow}=6.9$ ) y el recubrimiento de la fibra utilizada (PDMS-DVB) es medianamente polar, por lo que la afinidad compuesto-sorbente es menor con respecto a los otros analitos. Sin embargo, los límites de detección y cuantificación de OCT fueron menores en UAE-SPME-GC-MS debido a la preconcentración de la SPME.

La preparación de muestra mediante UAE-SPME presentó más ventajas que por MSPD, ya que requirió menor tiempo de análisis, manipulación de muestra y materiales. Adicionalmente, la cantidad de pigmentos en las hojas de lechuga es un problema importante en la MSPD debido a que dificultan la evaporación del extracto como se mencionó en la **Sección 6.2.1.3.**, problema que no se observó en la UAE-SPME.

## Resultados y discusión

**Tabla 10.** Comparación de sensibilidad, precisión, linealidad y recobro de las metodologías para el análisis de PCP en lechuga mediante GC-MS.

| Compuesto     | LD (ng g <sup>-1</sup> ) |          | LC (ng g <sup>-1</sup> ) |          | %CV intra-día (100ng g <sup>-1</sup> ) |                   | R <sup>2</sup> |                   |
|---------------|--------------------------|----------|--------------------------|----------|--|-------------------|----------------|-------------------|
|               | MSPD                     | UAE-SPME | MSPD                     | UAE-SPME | MSPD<br>(n=3)                          | UAE-SPME<br>(n=5) | MSPD<br>(n=3)  | UAE-SPME<br>(n=3) |
| <b>HHCB</b>   | 75                       | 1        | 100                      | 80       | 22.74                                  | 16.15             | 0.9829         | 0.9949            |
| <b>AHTN</b>   | 25                       | 1        | 50                       | 5        | 7.07                                   | 16.63             | 0.9823         | 0.9948            |
| <b>BP-3</b>   | 100                      | 1        | >200                     | 5        | 11.87                                  | 24.46             | 0.9156         | 0.9777            |
| <b>4-MBC</b>  | 25                       | 1        | 50                       | 5        | 5.79                                   | 19.12             | 0.9729         | 0.9991            |
| <b>O-PABA</b> | 50                       | 5        | 100                      | 10       | 11.50                                  | 12.89             | 0.9958         | 0.9900            |
| <b>2-EHMC</b> | 25                       | 1        | 50                       | 5        | 20.35                                  | 15.90             | 0.9916         | 0.9853            |
| <b>OCT</b>    | 25                       | 25       | 50                       | 50       | 8.64                                   | 17.52             | 0.9977         | 0.9648            |
| <b>TC</b>     | 25                       | 1        | 50                       | 5        | 11.12                                  | 17.26             | 0.9983         | 0.9702            |
| <b>MTC</b>    | 25                       | 1        | 50                       | 5        | 3.65                                   | 12.56             | 0.9749         | 0.9844            |

**Tabla 10.** Comparación de sensibilidad, precisión, linealidad y recobro de las metodologías para el análisis de PCP en lechuga mediante GC-MS (continuación).

| Compuesto     | Recobro (100 ng g <sup>-1</sup> ) |                   |
|---------------|-----------------------------------|-------------------|
|               | MSPD<br>(n=5)                     | UAE-SPME<br>(n=5) |
| <b>HHCB</b>   | ---                               | 117.65 ± 17.95    |
| <b>AHTN</b>   | 56.32 ± 13.46                     | 121.40 ± 16.45    |
| <b>BP-3</b>   | 79.64 ± 11.66                     | 109.42 ± 22.34    |
| <b>4-MBC</b>  | 87.23 ± 7.92                      | 117.65 ± 17.87    |
| <b>O-PABA</b> | 89.41 ± 15.42                     | 107.28 ± 11.79    |
| <b>2-EHMC</b> | 87.71 ± 23.22                     | 96.74 ± 14.19     |
| <b>OCT</b>    | 126.26 ± 10.94                    | 112.18 ± 12.83    |
| <b>TC</b>     | 81.80 ± 17.05                     | 88.59 ± 24.27     |
| <b>MTC</b>    | 76.81 ± 5.67                      | 116.33 ± 14.34    |

Por todas las ventajas mencionadas, se seleccionó UAE-SPME-GC-MS como el método más conveniente para el análisis de lechugas cultivadas en el laboratorio.

La determinación de PCP en lechuga mediante UAE-SPME-GC-MS presenta una alternativa a los métodos reportados anteriormente para el análisis de HHCB, AHTN y TC en vegetales (**Sección 2.6.**), ya que la preparación de muestra es miniaturizada y la sensibilidad en el análisis de estos compuestos ( $LD=1 \text{ ng g}^{-1}$  para los tres analitos) es comparable con la reportada en la literatura ( $LD$  de  $0.1-60 \text{ ng g}^{-1}$ ), manteniendo una precisión aceptable aún en el análisis a nivel de trazas ( $CV < 18 \%$  a  $100 \text{ ng g}^{-1}$ ).

No obstante, la metodología UAE-SPME-GC-MS desarrollada presenta varias ventajas ante los métodos reportados anteriormente: la extracción mediante SPME es más sencilla y automatizada que otros métodos frecuentemente utilizados (como extracción en fase sólida y extracción líquido-líquido), se ocupa un menor volumen de disolventes y no requiere de la liofilización o algún otro pretratamiento de la muestra más que su homogeneización (que es realizada fácilmente utilizando un procesador de alimentos). Adicionalmente, el análisis de HHCB, AHTN y TC se realizó simultáneamente a la de cinco filtros UV orgánicos los que, hasta nuestro conocimiento, no habían sido determinados anteriormente en vegetales. La sensibilidad en el análisis de los filtros UV en lechuga mediante UAE-SPME-GC-MS fue similar a la de los otros analitos ( $LD$  de  $1-25 \text{ ng g}^{-1}$ ), observándose también una alta precisión a nivel de trazas ( $CV < 25 \%$  a  $100 \text{ ng g}^{-1}$ ).

### 6.5. Análisis de lechugas cultivadas en el laboratorio

La cosecha de las lechugas cultivadas en tierra suele realizarse dos o tres meses después de la siembra, sin embargo, debido a que el desarrollo de las metodologías tomó más tiempo del esperado, las lechugas cultivadas se analizaron cinco meses después de sembrarlas. Para ese entonces, las hojas de varias lechugas ya se habían secado y caído, por lo que no pudieron ser analizadas. Debido a que sólo se contaba con dos lechugas sanas (una lechuga control y otra irrigada con PCP), el análisis de PCP se realizó únicamente en estas dos lechugas.

Se analizaron las lechugas cultivadas en el laboratorio mediante UAE-SPME-GC-MS. En el análisis de la lechuga cultivada control (**Figura 16. A**) se observaron pequeñas interferencias

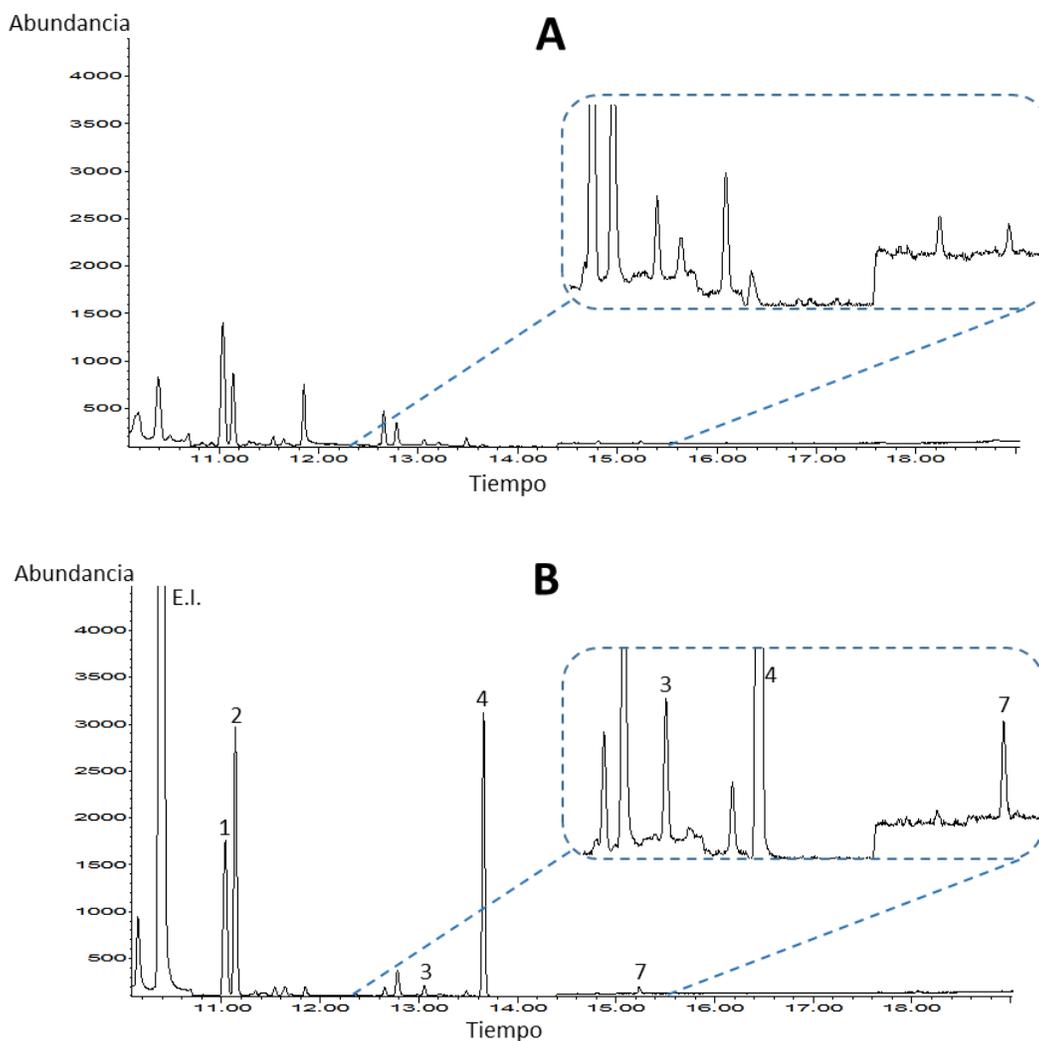
para HHCB, AHTN, BP-3, 4-MBC y TC. En el análisis de la lechuga cultivada irrigada con PCP (**Figura 16. B**), se identificaron cinco de los nueve PCP en estudio: HHCB, AHTN, 4-MBC, 2-EHMC y MTC (**Tabla 11**). De éstos, sólo dos fueron cuantificables: AHTN ( $41.10 \pm 7.00 \text{ ng g}^{-1}$ ) y MTC ( $122.17 \pm 9.71 \text{ ng g}^{-1}$ ). Para asegurar que las señales de HHCB y 4-MBC eran significativamente diferentes a las interferencias observadas en la lechuga cultivada blanco, se realizó una prueba de hipótesis al 95% de confianza que confirmó la presencia de HHCB y 4-MBC en la lechuga cultivada fortificada (**Anexo VI**). En el **Anexo VII** se muestran las ecuaciones utilizadas para el cálculo del error en la concentración asociado a la interpolación en las curvas de calibración.

Los analitos observados en la lechuga cultivada irrigada con PCP coinciden con las predicciones mencionadas en la literatura (**Sección 2.3.2.**), ya que la transferencia de los PCP hacia las hojas dependió principalmente de su carácter hidrofóbico ( $\log K_{ow}$ ). Todos los analitos, con excepción de BP-3 y TC, presentan un  $\log K_{ow} > 5$  (**Tabla 4**) por lo que son moléculas hidrofóbicas con tendencia a absorberse en la raíz. Una vez ahí, los compuestos menos hidrofóbicos tienden a migrar hacia las partes aéreas de la planta (tallo y hojas). Debido a esto, es lógico que HHCB, AHTN, 4-MBC, MTC y 2-EHMC (que presentan  $\log K_{ow}$  de 5.2 a 5.9) se encontraran en las hojas. Se encontró predominantemente a MTC debido a su carácter hidrofóbico intermedio. Al ser compuestos semivolátiles, HHCB y AHTN pudieron ser transferidos desde el aire hacia la cutícula de las hojas, una capa cerosa externa que mantiene la humedad en la planta y provee una barrera contra hongos y bacterias. Al ser una capa lipídica, la cutícula produce un medio ideal para la transferencia y bioacumulación de compuestos hidrofóbicos volátiles.<sup>97</sup>

Debido a que O-PABA tiene un  $\log K_{ow}$  similar a 2-EHMC se esperaba que también se encontrara en las hojas, sin embargo, esto no sucedió, tal vez porque la amina presente en su estructura química dificultó su transferencia hacia la raíz o a las partes aéreas de la lechuga. OCT es altamente hidrofóbico por lo que es probable se haya retenido en la raíz. TC es un compuesto con ligero carácter hidrofóbico, sin embargo, a diferencia de los otros PCP estudiados, es más fácil de biodegradar, por lo que pudo ser eliminado por los microorganismos presentes en el suelo, disminuyendo su presencia en la lechuga. BP-3 es un compuesto hidrofílico por lo que es probable que no haya sido transferido eficientemente a

## Resultados y discusión

la raíz. Adicionalmente, TC y BP-3 son compuestos con carácter ácido-base que pueden estar parcialmente ionizados, lo que disminuiría su transferencia hacia la raíz.<sup>6,51,54,55</sup>



**Figura 16.** Análisis por UAE-SPME-GC-MS en modo SIM de lechuga cultivada en el laboratorio. **A.** Lechuga control; **B.** Lechuga irrigada con PCP. 1. HHCB; 2. AHTN; 3. 4-MBC; 4. MTC; 7. 2-EHMC; E.I. Fenantreno.

**Tabla 11.** Identificación de PCP en lechuga cultivada irrigada con PCP.

| Compuesto     | Identificación | Compuesto     | Identificación |
|---------------|----------------|---------------|----------------|
| <b>HHCB</b>   | detectado      | <b>2-EHMC</b> | detectado      |
| <b>AHTN</b>   | detectado      | <b>OCT</b>    | no detectado   |
| <b>BP-3</b>   | no detectado   | <b>TC</b>     | no detectado   |
| <b>4-MBC</b>  | detectado      | <b>MTC</b>    | detectado      |
| <b>O-PABA</b> | no detectado   |               |                |

### 6.6. Análisis de la raíz de las lechugas cultivadas

Para comprobar la presencia de los analitos en las raíces de las lechugas cultivadas y así dar soporte a la discusión del análisis de la lechuga cultivada irrigada con PCP, se realizó el análisis cualitativo de las raíces mediante UAE-SPME-GC-MS.

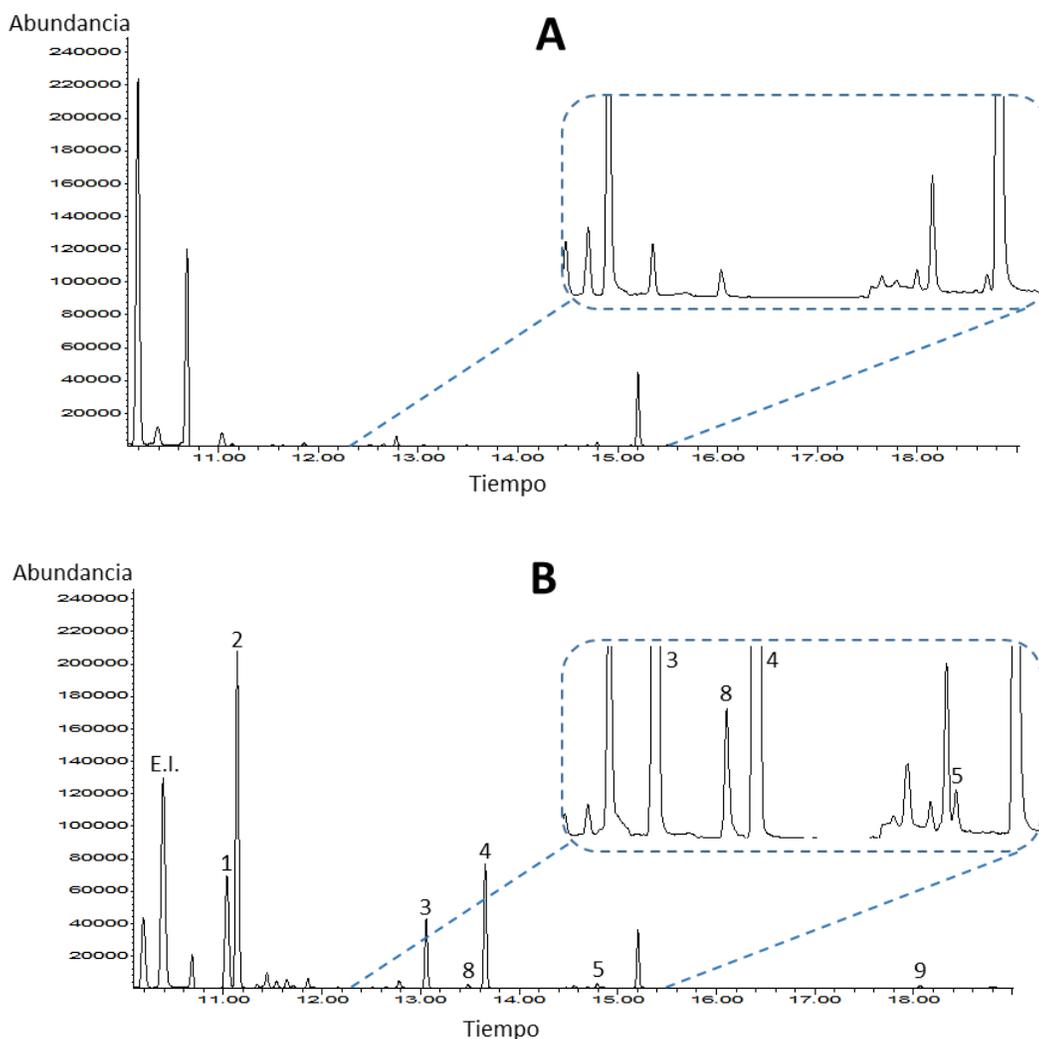
En la raíz de la lechuga cultivada control (**Figura 17. A**) se observaron pequeñas interferencias para HHCB, AHTN, BP-3, 4-MBC, OCT y TC. Además, se observó una interferencia intensa para 2-EHMC. En la raíz de la lechuga cultivada irrigada con PCP (**Figura 17. B**) se observó la presencia de todos los analitos con excepción de BP-3 y 2-EHMC. En la **Tabla 12** se muestran los resultados del análisis de PCP en la raíz de la lechuga cultivada irrigada con PCP.

En el análisis de la raíz de la lechuga cultivada irrigada con PCP se identificaron cuatro analitos presentes también en las hojas (HHCB, AHTN, 4-MBC y MTC), comprobando que su presencia en la raíz es necesaria antes de migrar hacia las hojas. 2-EHMC probablemente no fue detectado debido a la interferencia intensa observada en el análisis de la raíz de la lechuga cultivada control.

O-PABA y OCT no estuvieron presentes en las hojas de lechuga cultivada irrigada con PCP, pero fueron detectados como pequeñas señales en la raíz de la misma, lo que sugiere que su carácter hidrofóbico y/o su estructura química dificultan su transferencia hacia las hojas. BP-3 fue el único compuesto que no fue observado en las hojas ni en la raíz, probablemente debido a que es el analito más hidrofílico ( $\log K_{ow}=3.5$ ) y además puede encontrarse parcialmente ionizado por lo que su absorción a la raíz puede ser poco eficiente.<sup>6,51,54,55</sup> Las

## Resultados y discusión

propiedades ácido-base de TC seguramente también dificultaron su transferencia hacia la raíz, sin embargo, a diferencia de BP-3, sí fue detectado en la raíz, probablemente debido a que es más hidrofóbico que BP-3 ( $\log K_{ow}=4.8$ ).



**Figura 17.** Análisis por UAE-SPME-GC-MS en modo SIM de raíz de lechuga cultivada en el laboratorio. **A.** Raíz de lechuga control; **B.** Raíz de lechuga irrigada con PCP. 1. HHCB; 2. AHTN; 3. 4-MBC; 4. MTC; 5. O-PABA; 8. TC; 9. OCT; E.I Fenantreno.

**Tabla 12.** Identificación de PCP en la raíz de lechuga cultivada irrigada con PCP.

| <b>Compuesto</b> | <b>Identificación</b> | <b>Compuesto</b> | <b>Identificación</b> |
|------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|
| <b>HHCB</b>      | detectado             | <b>2-EHMC</b>    | no detectado          |
| <b>AHTN</b>      | detectado             | <b>OCT</b>       | detectado             |
| <b>BP-3</b>      | no detectado          | <b>TC</b>        | detectado             |
| <b>4-MBC</b>     | detectado             | <b>MTC</b>       | detectado             |
| <b>O-PABA</b>    | detectado             |                  |                       |

### 7. Conclusiones

1. Se desarrollaron y optimizaron dos metodologías miniaturizadas y amigables con el ambiente para la determinación de productos de cuidado personal (PCP) en lechuga: MSPD-GC-MS y UAE-SPME-GC-MS.
2. Ambas metodologías fueron sensibles, precisas y sencillas. Sin embargo, UAE-SPME-GC-MS presentó más ventajas por lo que se aplicó al análisis de lechugas cultivadas en el laboratorio.
3. En el análisis de la lechuga cultivada irrigada con PCP se identificaron cinco de los PCP estudiados: HHCB, AHTN, 4-MBC, 2-EHMC y MTC, y solo dos se pudieron cuantificar: AHTN y MTC. La sorción de los compuestos dependió principalmente de sus propiedades fisicoquímicas, coincidiendo con las predicciones realizadas en la literatura a partir de estudios hidropónicos.<sup>6,51,54,55</sup>
4. En el análisis de la raíz de la lechuga cultivada irrigada con PCP se identificaron a todos los analitos con excepción de BP-3 y 2-EHMC, confirmando que la presencia de los contaminantes en la raíz es el primer contacto con la planta antes de migrar a las partes aéreas.
5. Los resultados obtenidos muestran la importancia del monitoreo de contaminantes emergentes en vegetales mediante técnicas analíticas sensibles, precisas y específicas que puedan ayudar a identificarlos y cuantificarlos para posteriormente determinar su toxicidad en el medio ambiente.

## 8. Referencias

1. Página del Sondeo Ecológico de EUA.  
<https://toxics.usgs.gov/investigations/cec/index.php>  
Consultado 3/nov/2016.
2. Bell, K. Y., Wells, M. J. M., Traexler, K. A., Pellegrin, M., Morse, A., Brandy, J. (2011). *Emerging Pollutants*, Water Environment Research, 83, p. 1906-1984.
3. Wu, X., Conkle, J. L., Ernst, F., Gan, J. (2014). *Treated wastewater irrigation: Uptake of pharmaceutical and personal care products by common vegetables under field conditions*, Environmental Science & Technology, 48, p. 11286-11293.
4. Wu, X., Conkle, J. L., Gan, J. (2012). *Multi-residue determination of pharmaceutical and personal care products in vegetables*, Journal of Chromatography A, 1254, p. 78-86.
5. Buchberger, W. W. (2011). *Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment*, Journal of Chromatography A, 1218, p. 603-618.
6. Wu, X., Ernst, F., Conkle, J. L., Gan, J. (2013). *Comparative uptake and translocation of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by common vegetables*, Environment International, 60, p. 15-22.
7. Brausch, J. M., Rand, G. M. (2011). *A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity*, Chemosphere, 82, p. 1518-1532.
8. Moldoveanu, S., David, V. (2015). *Modern sample preparation in Chromatography*. Elsevier, Holanda.
9. Szumski, M., Buszewski, B. (2002). *State of the art in miniaturized separation techniques*, Critical Reviews in Analytical Chemistry, 32, p. 1-46.
10. Real Academia Española.  
<http://dle.rae.es/?id=AU1m1dd>  
Consultado 3/nov/2016.
11. Agencia de Protección al Medio Ambiente de EUA (EPA, por sus siglas en inglés).  
<https://www.epa.gov/wqc/contaminants-emerging-concern-including-pharmaceuticals-and-personal-care-products>  
Consultado 3/nov/2016.
12. Zee, S., Ritsema, C. J. (2015). *Emerging pollutants in the environment: A challenge for water resource management*, International Soil and Water Conservation Research, 3, p. 57-65.
13. Fanali, S., Haddad, P. R., Poole, C., Lloyd, D. (2013). *Liquid Chromatography: Applications*. Elsevier, Holanda.
14. Sauv e, S., Desrosiers, M. (2014). *A review of what is an emerging contaminant*, Chemistry Central Journal, 6, p. 15-21.
15. Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., Gore, A. C. (2009). *Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement*, Endocrine Reviews, 30, p. 293-342.

16. Petrie, B., Barden, R., Kasprzyk-Hordén, B. (2015). *A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring*, Water Research, 72, p. 3-27.
17. Hopkins, Z. R., Blaney, L. (2016). *An aggregate analysis of personal care products in the environment: Identifying the distribution of environmentally-relevant concentrations*, Environmental International, 92-93, p. 301-316.
18. Pedrouzo, M., Borrull, F., Marcé, R. M., Pocurull, E. (2011). *Analytical methods for personal-care products in environmental waters*, Trends in Analytical Chemistry, 30, p. 749-760.
19. Figueiredo, L., Erny, G. L., Santos, L., Alves, A. (2016). *Applications of molecularly imprinted polymers to the analysis and removal of personal care products: A review*, Talanta, 146, p. 754-765.
20. Ramos, S., Homem, V., Alves, A., Santos, L. (2015). *Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment – A review*, Science of the Total Environment, 526, p. 278-311.
21. Salvador, A., Chisvert, A. (2005). *Sunscreen analysis A critical survey on UV filters determination*, Analytica Chimica Acta, 537, p. 1-14.
22. Ramos, S., Homem, V., Alves, A., Santos, L. (2016). *A review of organic UV-filters in wastewater treatment plants*, Environment International, 86, p. 24-44.
23. Wang, J., Pan, L., Wu, S., Lu, L., Xu, Y., Zhu, Y., Guo, M., Zhuang, S. (2016). *Recent advances on endocrine disrupting effects of UV filters*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 13, p. 782-792.
24. Bachelot, M., Li, Z., Munaron, D., Gall, P. L., Casellas, C. (2012). *Organic UV filter concentrations in marine mussels from French coastal regions*, Science of the total Environment, 420, p. 273-279.
25. Buser, H., Balmer, M. E., Schmid, P., Kohler, M. (2006). *Occurrence of UV filters 4-methylbenzylidene camphor and octocrylene in fish from various swiss rivers with inputs from wastewater treatment plants*, Environmental Science & Technology, 40, p. 1427-1431.
26. Rimkus, G. G. (2004). *Synthetic musk fragrances in the environment*. Springer, Berlin.
27. García-Jares, C., Llombart, M., Polo, M., Salgado, C., Macías, S., Cela, R. (2002). *Optimization of a solid-phase microextraction method for synthetic musk compounds in water*, Journal of Chromatography A, 963, p. 277-285.
28. Vallecillos, L., Borrull, F., Pocurull, E. (2015). *Recent approaches for the determination of synthetic musk fragrances in environmental samples*, Trends in Analytical Chemistry, 72, p. 80-92.
29. Daughton, C. G., Ternes, T. A. (1999). *Pharmaceutical and personal care products in the environment: Agents of subtle change?*, Environmental Health Perspectives, 107, p. 907-938.
30. Homem, V., Silva, J. A., Ratola, N., Santos, L., Alves, A. (2015). *Long lasting perfume – A review of synthetic musks in WWTPs*, Journal of Environmental Management, 149, p. 168-192.
31. Peck, A. M. (2006). *Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 386, p. 907-939.

32. Winkler, M., Headley, J. V., Peru, K. M. (2000). *Optimization of solid-phase microextraction for the gas chromatographic-mass spectrometric determination of synthetic musk fragrances in water samples*, Journal of Chromatography A, 903, p. 203-210.
33. Dann, A. B., Hontela, A. (2011). *Triclosan: Environmental exposure, toxicity and mechanisms of actions*, Journal of Applied Toxicology, 31, p. 285-311.
34. Olaniyan, L. W. B., Mkwetshana, N., Okoh, A. I. (2016). *Triclosan in water, implications for human and environmental health*, Springer Plus, 5, p. 1639-1654.
35. Dhillon, G. S., Kaur, S., Pulicharla, R., Brar, K., Cledón, M., Verma, M., Surampalli, R. Y. (2015). *Triclosan: Current status, occurrence, environmental risks and bioaccumulation potential*, International Journal of Environmental Research and Public Health, 12, p. 5657-5684.
36. Chen, X., Nielsen, J. L., Fungal, K., Liu, Y., Lolas, I. B., Bester, K. (2011). *Biodegradation of triclosan and formation of methyl-triclosan in activated sludge under aerobic conditions*, Chemosphere, 84, p. 452-456.
37. Orvos, D. R., Versteeg, D. J., Inauen, J., Capdevielle, M., Rothenstein, A., Cunningham, V. (2002). *Aquatic toxicity of triclosan*, Environmental Toxicology and Chemistry, 21, p. 1338-1349.
38. Guo, J., Li, X., Cao, X., Li, Y., Wang, X., Xu, X. (2009). *Determination of triclosan, triclocarban and methyl-triclosan in aqueous samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with rapid liquid chromatography*, Journal of Chromatography A, 1216, p. 3038-3043.
39. Mersch-Sundermann, V., Schneider, H., Freywald, C., Jenter, C., Parzefall, W., Knasmüller, S. (2001). *Musk ketone enhances benzo(a)pyrene induced mutagenicity in human derived Hep G2 cells*, Mutation Research, 495, p. 89-96.
40. Chen, G., Jiang, R., Qiu, J., Cai, S., Zhu, F., Ouyang, G. (2015). *Environmental fates of synthetic musks in animal and plant: An in vivo study*, Chemosphere, 138, p. 584-591.
41. Lü, H., Cai, Q., Jones, K. C., Zeng, Q. Katsoyiannis, A. (2014). *Levels of organic pollutants in vegetables and human exposure through diet: A review*, Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 44, p. 1-33.
42. Calderón-Preciado, D., Jiménez-Cartagena, C., Peñuela, G., Bayona, J. M. (2009). *Development of an analytical procedure for the determination of emerging and priority organic pollutants in leafy vegetables by pressurized solvent extraction followed by GC-MS determination*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 394, p. 1319-1327.
43. Calderón-Preciado, D., Matamoros, V., Bayona, J. M. (2011). *Occurrence and potential crop uptake of emerging contaminants and related compounds in an agricultural irrigation network*, Science of the Total Environment, 412-413, p. 14-19.
44. Jasim, S. Y., Saththasivam, J., Loganathan, K., Ogunbiyi, O. O., Sarp, S. (2016). *Reuse of treated sewage effluent (TSE) in Qatar*, Journal of Water Process Engineering, 11, p. 174-182.
45. García-García, J. O. (2001). *La agricultura del riego y el riego con aguas negras*, Economía y Sociedad, 10, p. 155-180.

46. Dodgen, L. K., Li, J., Paeker, D., Gan, J. (2013). *Uptake and accumulation of four PPCP/EDCs in two leafy vegetables*, Environmental Pollution, 182, p. 150-156.
47. Wu, C., Spongberg, A. L., Witter, J. D., Sridhar, B. B. M. (2012). *Transfer of wastewater associated pharmaceuticals and personal care products to crop plants from biosolids treated soil*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 85, p. 104-109.
48. Wu, C., Spongberg, A. L., Witter, J. D., Fang, M., Czajkowski, K. P. (2010). *Uptake of pharmaceutical and personal care products by soybean plants from soils applied with biosolids and irrigated with contaminated water*, Environmental Science & Technology, 44, p. 6157-6161.
49. Waqas, M., Khan, S., Chao, C., Shamshad, I., Qamar, Z., Khan, K. (2014). *Quantification of PAHs and health risk via ingestion of vegetables in Khyber Pakhtunkhwa Province, Pakistan*, Science of the Total Environment, 497-498, p. 448-458.
50. Prosser, R. S., Sibley, P. K. (2015). *Human health risk assessment of pharmaceutical and personal care products in plant tissue due to biosolids and manure amendments, and wastewater irrigation*, Environment International, 75, p. 223-233.
51. Wu, X., Dodgen, L. K., Conkle, J. L., Gan, J. (2015). *Plant uptake of pharmaceutical and personal care products from recycled water and biosolids: A review*, Science of the Total Environment, 536, p. 655-666.
52. Carter, L. J., Harris, E., Williams, M., Ryan, J. J., Kookana, R. S., Boxall, A. B. A. (2014). *Fate and uptake of pharmaceuticals in soil-plant systems*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62, p. 816-825.
53. García-Valcárcel, A. I., Loureiro, I., Escorial, C., Molero, E., Tadeo, J. L. (2016). *Uptake of azoles by lamb's lettuce (Valerianella locusta L.) grown in hydroponic conditions*, Ecotoxicology and Environmental Safety, 124, p. 138-146.
54. Trapp, S. (2004). *Plant uptake and transport models for neutral and ionic chemicals*, Environmental Science and Pollution Research, 11, p. 33-39.
55. Briggs, G. G., Bromilow, R. H., Evans, A. A. (1982). *Relationships between lipophilicity and root uptake and translocation of non-ionised chemicals by barley*, Journal of Pesticide Science, 13, p. 495-504.
56. Hurtado, C., Domínguez, C., Pérez-Babace, L., Cañameras, N., Comas, J., Bayona, J. M. (2016). *Estimate of uptake and translocation of emerging organic contaminants from irrigation water concentration in lettuce grown under controlled conditions*, Journal of Hazardous Materials, 305, p. 139-148.
57. Dodgen, L. K., Ueda, A., Wu, X., Parker, D. R., Gan, J. (2015). *Effect of transpiration on plant accumulation and translocation of PPCP/EDCs*, Environmental Pollution, 198, p. 144-153.
58. Miller, E. L., Nason, S. L., Karthikeyan, K. G., Pedersen, J. A. (2016). *Root uptake of pharmaceutical and personal care products ingredients*, Environmental Science & Technology, 50, p. 525-541.
59. IUPAC. Compendium of Chemical Terminology.  
<https://goldbook.iupac.org/html/C/C01075.html>  
 Consultado 5/febrero/2017.
60. Braithwaite, A., Smith, F. J. (1999). *Chromatographic Methods*. Kluwer Academic Publishers, quinta edición, Países Bajos.

61. Heftmann, E. (2004). *Chromatography: Fundamentals and applications of chromatography and related differential migration methods*. Elsevier, sexta edición, Holanda.
62. Dettmer-Wilde, K., Engewald, W. (2014). *Practical gas chromatography*. Springer, Holanda.
63. McNair, H. M., Miller, J. M. (1998). *Basic gas chromatography*. John Wiley & Sons Inc., EUA.
64. Wanner, K., Hofner, G. (2007). *Mass spectrometry in medicinal chemistry*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., Alemania.
65. Harris, D. C. (1999). *Análisis Químico Cuantitativo*. Editorial Reverté, segunda edición, España.
66. Kitson, F. G., Larsen, B. S., McEwen, C. N. (1996). *Gas chromatography and mass spectrometry. A practical guide*. Academic Press, EUA.
67. Smith, R. M. (2003). *Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques*, Journal of Chromatography A, 1000, p. 3-27.
68. Ridgway, K., Lalljie, S. P. D., Smith, R. M. (2007). *Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods*, Journal of Chromatography A, 1153, p. 36-53.
69. Armenta, S., Garrigues, S., de la Guardia, M. (2015). *The role of Green extraction techniques in Green Analytical Chemistry*, Trends in Analytical Chemistry, 71, p. 2-8.
70. Sciarrone, D., Pantò, S., Ragonese, C., Dugo, P. (2015). *Evolution and status of preparative gas chromatography as a green sample-preparation technique*, Trends in Analytical Chemistry, 71, p. 65-73.
71. Moreda-Piñeiro, J., Moreda-Piñeiro, A. (2015). *Recent advances in combining microextraction techniques for sample pre-treatment*, Trends in Analytical Chemistry, 71, p. 265-274.
72. Escobar-Arnanz, J., Ramos, L. (2015). *The latest trends in the miniaturized treatment of solid samples*, Trends in Analytical Chemistry, 71, p. 275-281.
73. Pilli, S., Bhunia, P., Yan, S., LeBlanc, R. J., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y. (2011). *Ultrasonic pretreatment of sludge: A review*, Ultrasonics Sonochemistry, 18, p. 1-18.
74. Guía de selección de homogeneizadores ultrasónicos de Cole-Parmer.  
<http://www.coleparmer.com/TechLibraryArticle/702>  
Consultado 5/febrero/2007.
75. Guía de usuario del procesador ultrasónico Cole-Parmer modelo CPX130PB (115V, 130W, 20kHz). (2004).
76. Peña-Álvarez, A., Alvarado, L. A., Vera-Ávila, L. E. (2012). *Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in hot peppers by ultrasound assisted extraction followed by gas chromatography-mass spectrometry*, Instrument Science and Technology, 40, p. 429-440.
77. Pawliszyn, J. (2012). *Handbook of solid phase microextraction*. Elsevier, Holanda.
78. Spietelun, A., Kloskowski, A., Chrzanowski, W., Namiesnik, J. (2013). *Understanding solid-phase microextraction: Key factors influencing the extraction process and trends in improving the technique*, Chemical Reviews, 113, p. 1667-1685.

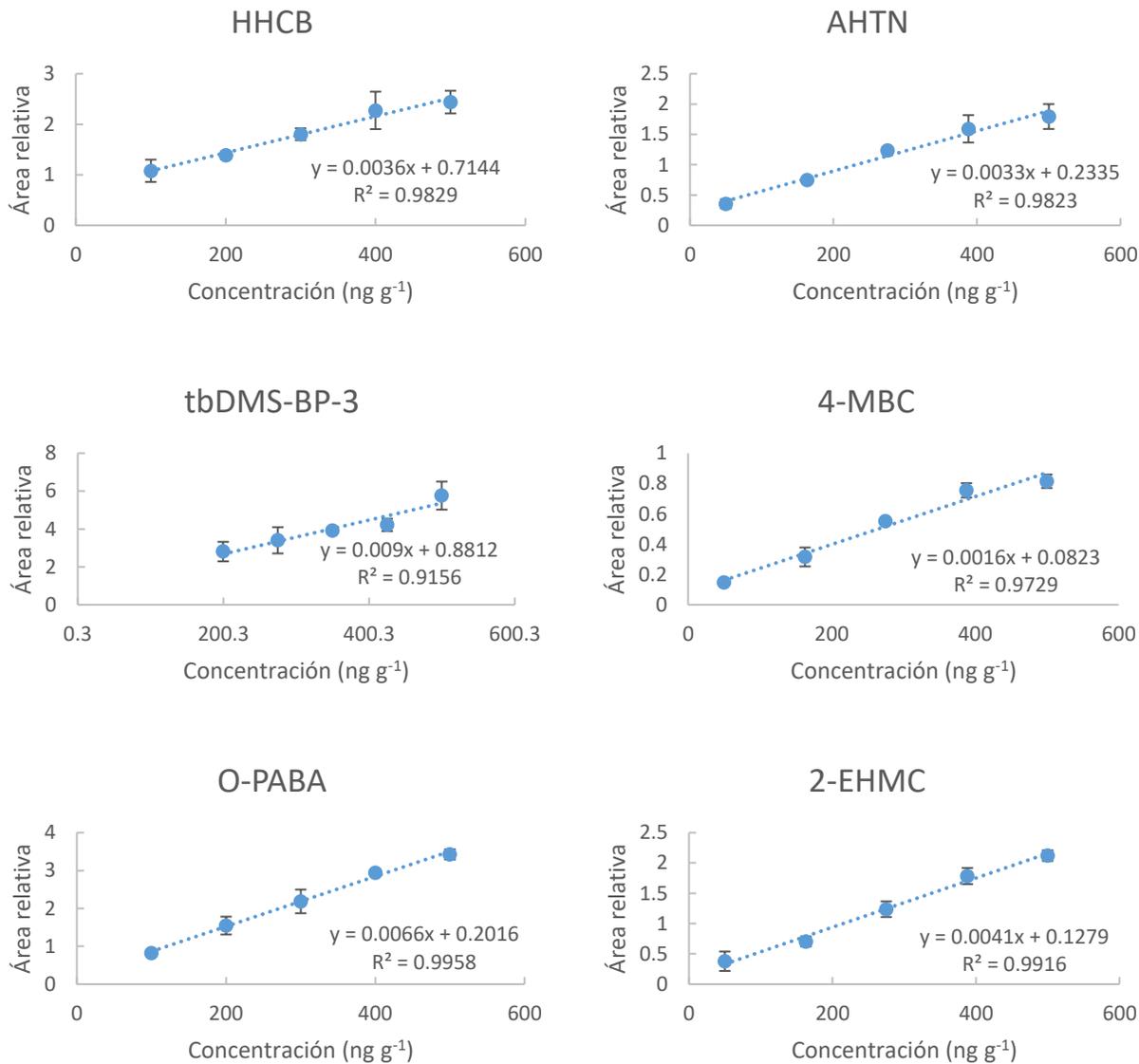
79. Souza-Silva, E. A., Jiang, R., Rodríguez-Lafuente, A., Gionfriddo, E. (2015). *A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis*, Trends in Analytical Chemistry, 71, p. 224-235.
80. Plotka-Wasyłka, J., Szczepanska, N., de la Guardia, M. (2015). *Miniaturized solid-phase extraction techniques*, Trends in Analytical Chemistry, 73, p. 19-38.
81. Barker, S. A. (2000). *Matrix solid-phase dispersion*, Journal of Chromatography A, 885, p. 115-127.
82. Barker, S. A. (2007). *Matrix solid phase dispersion*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 70, p. 151-162.
83. Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Laganà, C., Piovesana, S., Samper, R. (2013). *Recent trends in matrix solid-phase dispersion*, Trends in Analytical Chemistry, 43, p. 53-66.
84. Bogialli, S., Corcia, A. D. (2007). *Matrix solid-phase dispersion as a valuable tool for extracting contaminants from foodstuffs*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 70, p. 163-179.
85. Rodríguez-Rodríguez, C. E., Barón, E., Gago-Ferrero, P., Jelic, A., Llorca, M., Farré, M., Díaz-Cruz, M. S., Eljarrat, E., Petrovic, M., Caminal, G., Barceló, D., Vicent, T. (2012). *Removal of pharmaceuticals, polybrominated flame retardants and UV-filters from sludge by the fungus Trametes versicolor in bioslurry reactor*, Journal of Hazardous Materials, 233-234, p. 235-243.
86. Clarke, B. O., Smith, S. R. (2011). *Review of “emerging” organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids*, Environmental International, 37, p. 226-247.
87. Luo, Y., Guo, W., Ngo, H. H., Nghiem, L. D., Hai, F. I., Zhang, J., Liang, S., Wang, J. (2014). *A review on the occurrence of micropollutants in aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment*, Science of the Total Environment, 473-474, p. 619-641.
88. Aguirre, J., Bizkarguenaga, E., Iparraguirre, A., Fernández, L. A., Zuloaga, O., Prieto, A. (2014). *Development of stir-bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of musks in vegetables and amended soils*, Analytica Chimica Acta, 812, p. 74-82.
89. Sabourin, L., Duenk, P., Bonte-Gelok, S., Payne, M., Lapen, D. R., Topp, E. (2012). *Uptake of pharmaceuticals, hormones and parabens into vegetables grown in soil fertilized with municipal biosolids*, Science of the Total Environment, 431, p. 233-236.
90. Acherius, A., Eggen, T., Lorenz, W. G., Reemtsma, T., Winkler, U., Moeder, M. (2012). *Uptake of galaxolide, tonalide, and triclosan by carrot, barley, and meadow fescue plants*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, p. 7785-7791.
91. Litz, N. T., Müller, J., Böhmer, W. (2007). *Occurrence of polycyclic musks in sewage sludge and behavior in soils and plants*, Journal of Soils and Sediments, 7, p. 36-44.
92. Kameda, Y., Kimura, K., Miyazaki, M. (2011). *Occurrence and profiles of organic sun-blocking agents in Surface waters and sediments in Japanese rivers and lakes*, Environmental Pollution, 159, p. 1570-1576.
93. Negreira, N., Rodríguez, I., Ramil, M., Rubí, E., Cela, R. (2009). *Sensitive determination of salicylate and benzophenone type UV filters in water samples using*

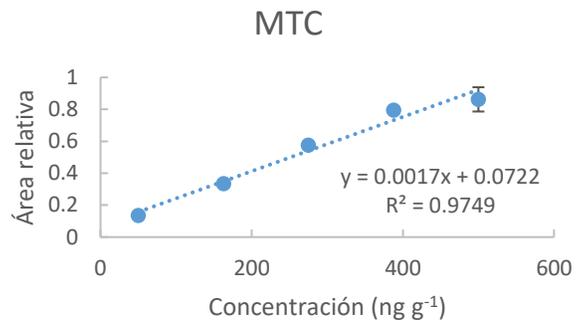
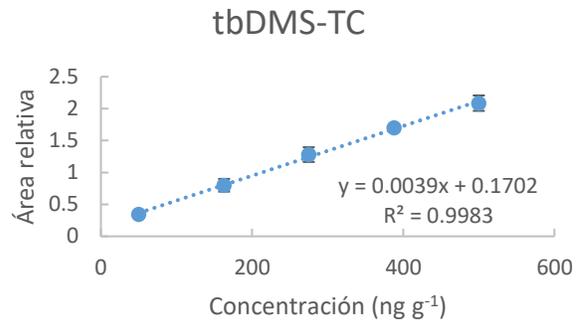
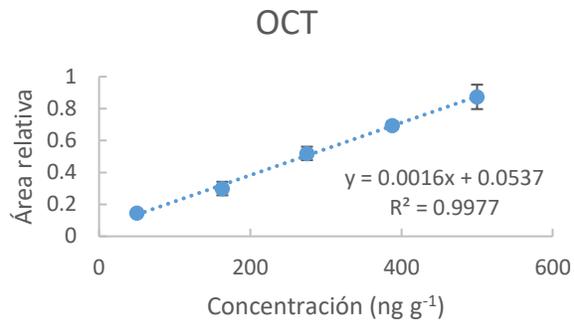
## Referencias

- solid-phase microextraction, derivatization and gas chromatography tandem mass spectrometry*, Analytica Chimica Acta, 638, p. 36-44.
94. Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V11.02 (© 1994-2017 ACD/Labs).  
<https://scifinder.cas.org>  
Consultado el 17/mayo/2017.
95. COFEPRIS, Comisión de Control Analítico y Amplificación de Cobertura. (2011). *Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos*.
96. Tadeo, J. L., Sánchez-Brunete, C., Albero, B., García-Valcárcel, A. I. (2010). *Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples*, Journal of Chromatography A, 1217, p. 2415-2440.
97. Hellström, A. (2004). *Literature survey: Uptake of organic pollutants in plants*. Department of Environmental Assessment, Swedish University of Agricultural Sciences.

## Anexo I

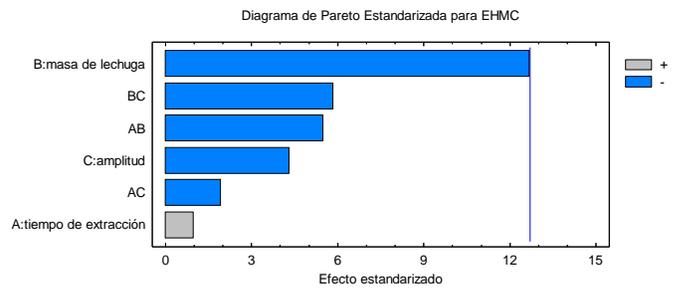
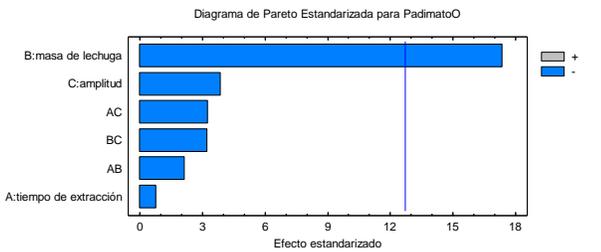
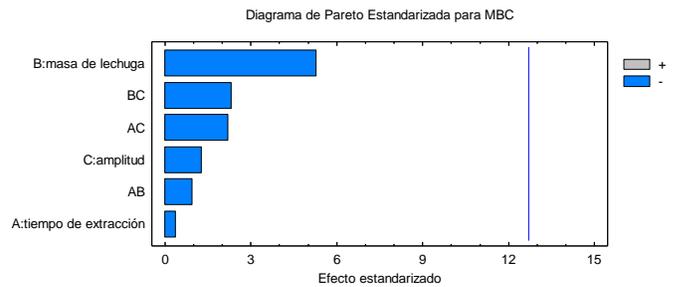
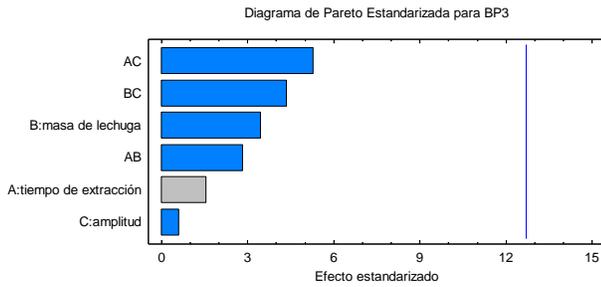
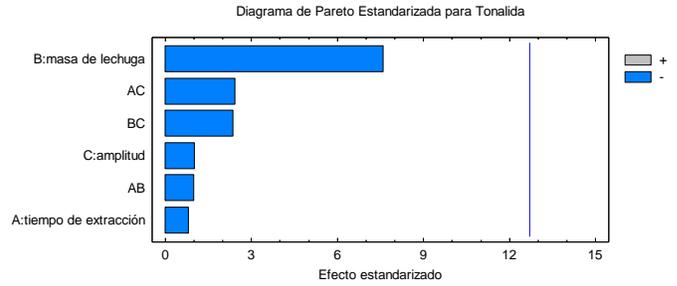
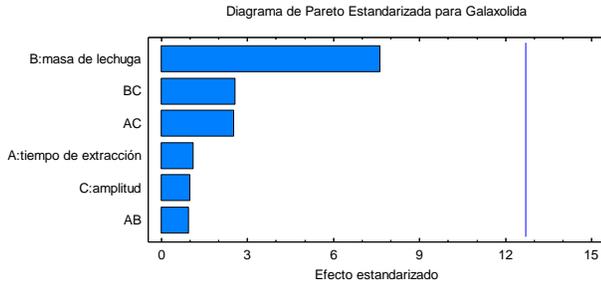
*Curvas de calibración del análisis de PCP en lechuga mediante MSPD-GC-MS*





## Anexo II

Diagramas de Pareto de la optimización del análisis de PCP en lechuga mediante UAE-SPME-GC-MS



# Anexos

Diagrama de Pareto Estandarizada para Octocileno

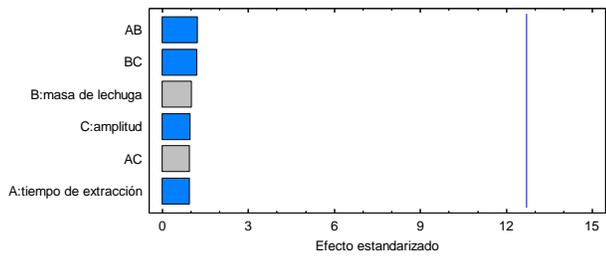


Diagrama de Pareto Estandarizada para TC

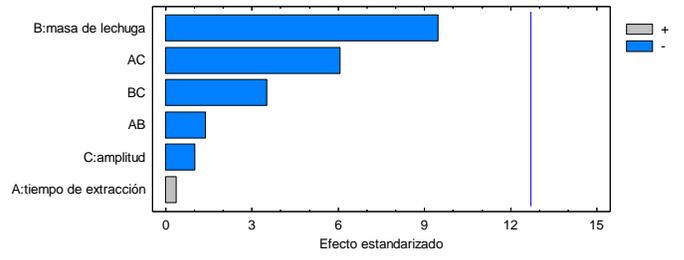
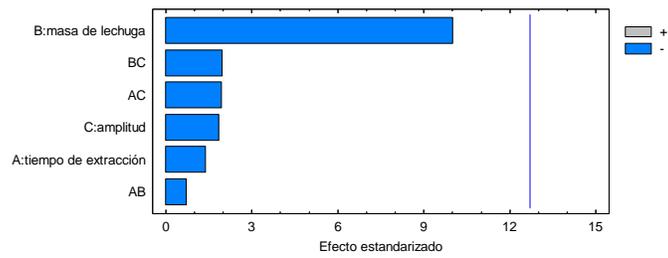
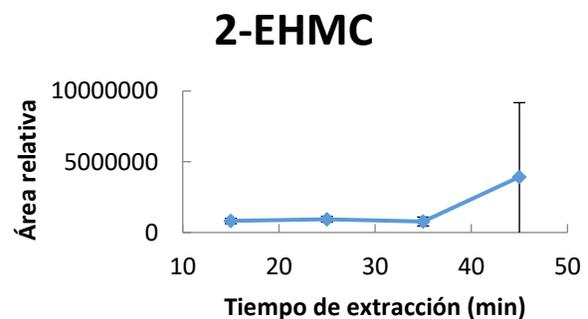
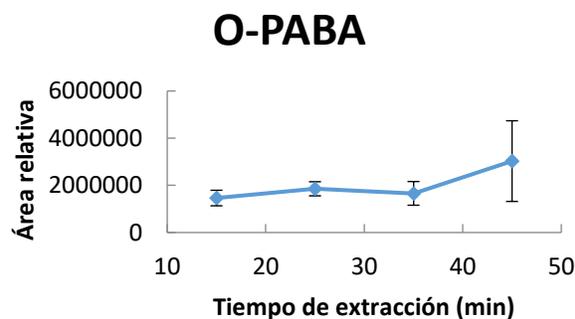
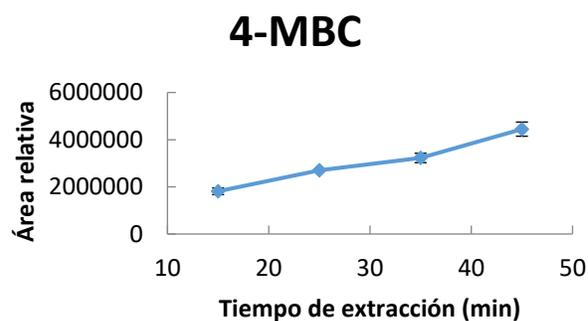
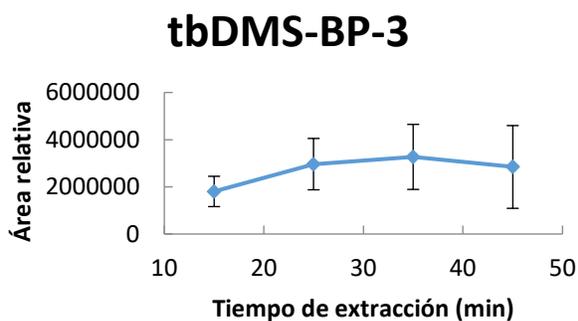
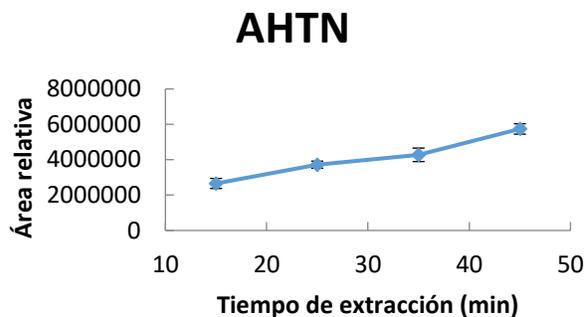
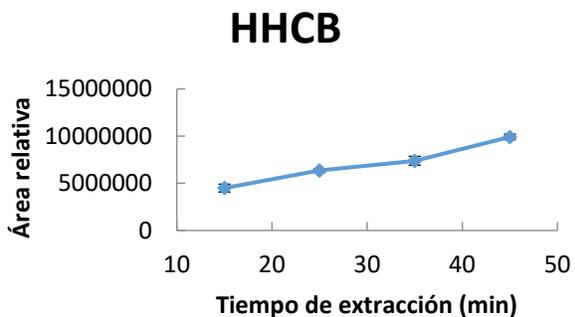


Diagrama de Pareto Estandarizada para MTC

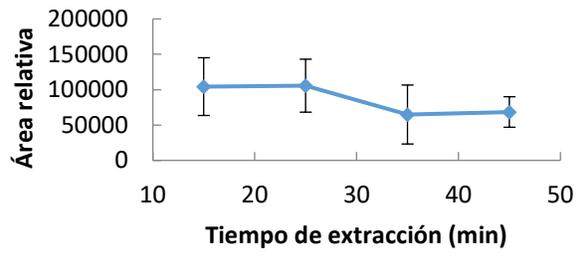


## Anexo III

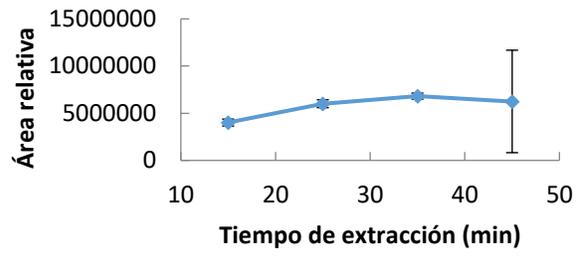
*Perfil de extracción del análisis de PCP en agua mediante SPME-GC-MS*



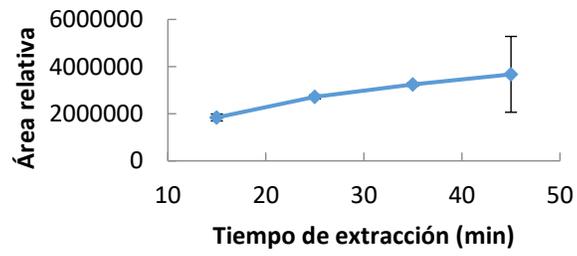
### OCT



### tbDMS-TC



### MTC



## Anexo IV

### *Precisión y linealidad del análisis de PCP mediante SPME-GC-MS*

El análisis de PCP en agua fortificada mediante SPME-GC-MS sólo fue una simplificación para enfocarse en la optimización de la SPME sin tomar en cuenta a la UAE, sin embargo, se realizó el estudio de la repetibilidad y linealidad de la metodología.

#### Repetibilidad del método

Se evaluó la repetibilidad intradía de la metodología a dos niveles: 0.5ng mL<sup>-1</sup> y 5ng mL<sup>-1</sup>. El estudio se realizó por quintuplicado en el nivel bajo y por triplicado en el alto. Los resultados se muestran en la **Tabla A1**. OCT fue el único analito no detectado a 0.5ng mL<sup>-1</sup>, ya que es el menos volátil de los PCP estudiados. En general, el %CV de los analitos hidrofóbicos más pesados (O-PABA, 2-EHMC y OCT) fue mayor (CV 10.65-50.12%), probablemente porque tienen una menor afinidad al sorbente de polaridad media (PDMS-DVB). Además, la variabilidad de estos compuestos a 5ng mL<sup>-1</sup> fue mayor que a 0.5ng mL<sup>-1</sup>, sugiriendo que existe un efecto matriz que afecta la variabilidad de los analitos más hidrofóbicos y pesados.

**Tabla A1.** Repetibilidad del análisis de PCP en agua fortificada a 0.5 y 5ng mL<sup>-1</sup>.

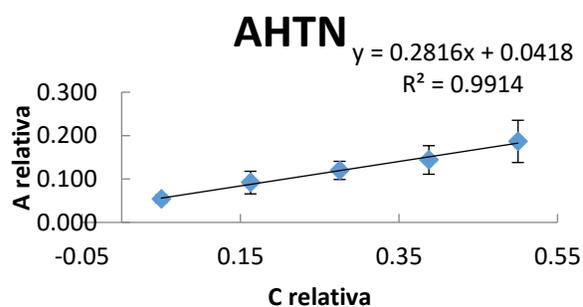
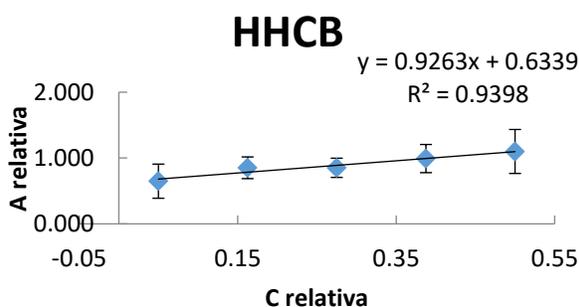
| Compuesto         | CV (%)                          | CV (%)                        | Compuesto       | CV (%)                          | CV (%)                        |
|-------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------|---------------------------------|-------------------------------|
|                   | 0.5ng mL <sup>-1</sup><br>(n=5) | 5ng mL <sup>-1</sup><br>(n=3) |                 | 0.5ng mL <sup>-1</sup><br>(n=5) | 5ng mL <sup>-1</sup><br>(n=3) |
| <b>HHCB</b>       | 12.98                           | 3.45                          | <b>2-EHMC</b>   | 10.65                           | 31.16                         |
| <b>AHTN</b>       | 4.07                            | 4.17                          | <b>OCT</b>      | ---                             | 50.12                         |
| <b>tbDMS-BP-3</b> | 4.95                            | 7.16                          | <b>tbDMS-TC</b> | 3.21                            | 1.46                          |
| <b>4-MBC</b>      | 4.24                            | 1.99                          | <b>MTC</b>      | 1.82                            | 1.46                          |
| <b>O-PABA</b>     | 13.32                           | 24.62                         |                 |                                 |                               |

### Linealidad del método

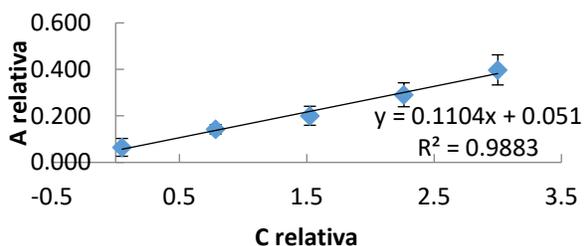
Se estudió la linealidad del método mediante la elaboración de una curva de calibración de cinco puntos (0.005, 0.016, 0.027, 0.038, 0.050 ng mL<sup>-1</sup> para HHCB, AHTN y 4-MBC; 0.005, 0.078, 0.153, 0.226, 0.300 ng mL<sup>-1</sup> para BP-3, TC y MTC; 0.500, 0.625, 0.750, 0.875 y 1.000 ng mL<sup>-1</sup> para 2-EHMC y O-PABA; 5.00, 6.25, 7.50, 8.75 y 10.00 ng mL<sup>-1</sup> para OCT). El análisis se realizó por triplicado. Los resultados se muestran en la **Tabla A2**. Se observó una tendencia lineal para la mayoría de los analitos ( $R^2 > 0.9880$ ) con excepción de HHCB, O-PABA, 2-EHMC y OCT ( $R^2 < 0.9400$ ).

**Tabla A2.** Linealidad del análisis de PCP en agua mediante SPME-GC-MS.

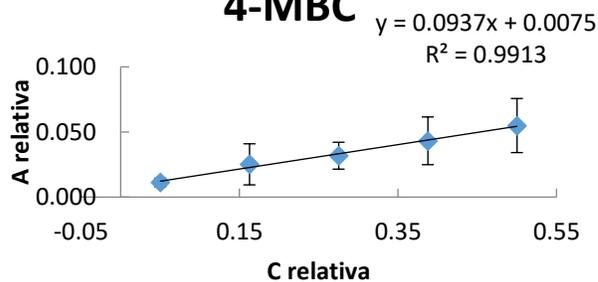
| Compuesto  | Concentración<br>(ng mL <sup>-1</sup> ) | Ecuación lineal        | R <sup>2</sup> |
|------------|---|------------------------|----------------|
| HHCB       | 0.005-0.050                             | $y = 0.9263x + 0.6339$ | 0.9398         |
| AHTN       | 0.005-0.050                             | $y = 0.2816x + 0.0418$ | 0.9914         |
| tbDMS-BP-3 | 0.005-0.300                             | $y = 0.1104x + 0.0510$ | 0.9883         |
| 4-MBC      | 0.005-0.050                             | $y = 0.0937x + 0.0075$ | 0.9913         |
| O-PABA     | 0.5-1.0                                 | $y = 0.0723x - 0.1217$ | 0.8818         |
| 2-EHMC     | 0.5-1.0                                 | $y = 0.0273x - 0.0700$ | 0.8376         |
| OCT        | 5-10                                    | $y = 0.0067x - 0.2247$ | 0.8174         |
| tbDMS-TC   | 0.005-0.300                             | $y = 0.2994x + 0.0357$ | 0.9974         |
| MTC        | 0.005-0.300                             | $y = 0.1847x + 0.0111$ | 0.9958         |



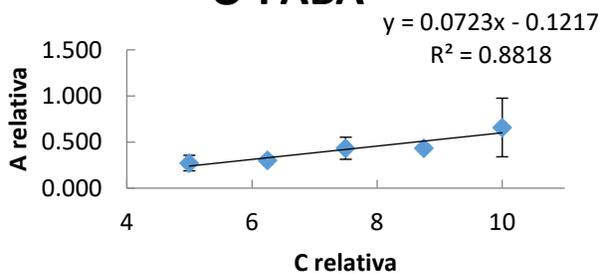
**tbDMS-BP-3**



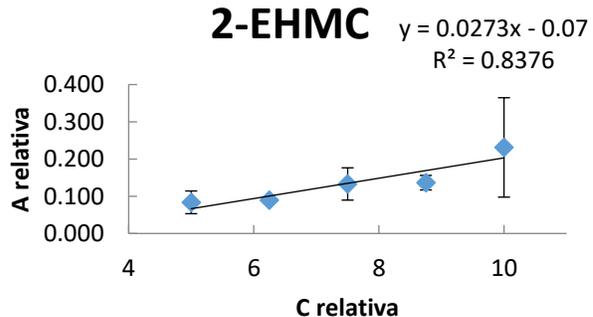
**4-MBC**



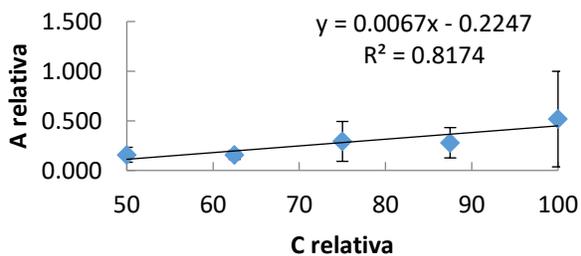
**O-PABA**



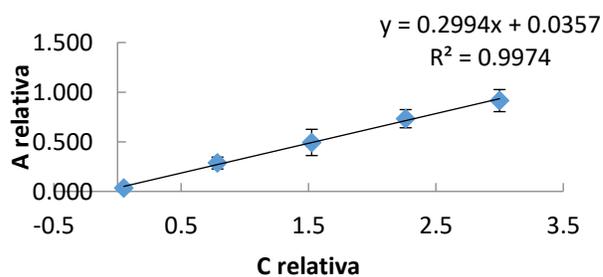
**2-EHMC**



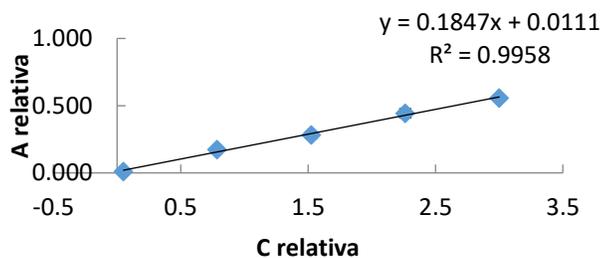
**OCT**



**tbDMS-TC**

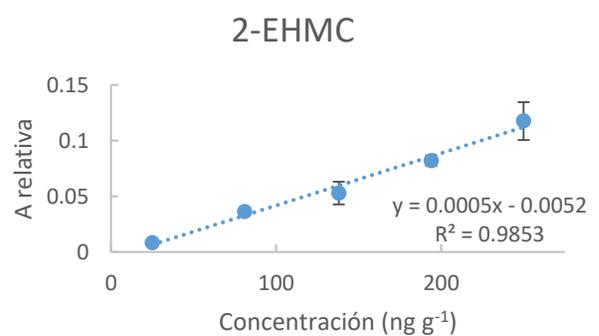
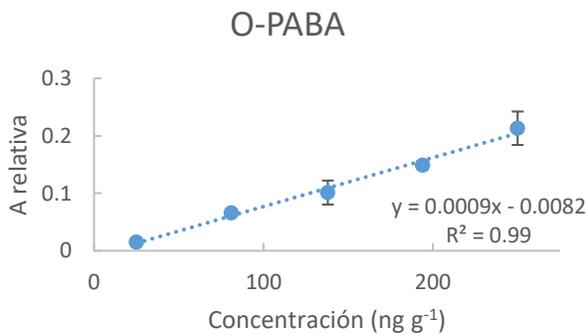
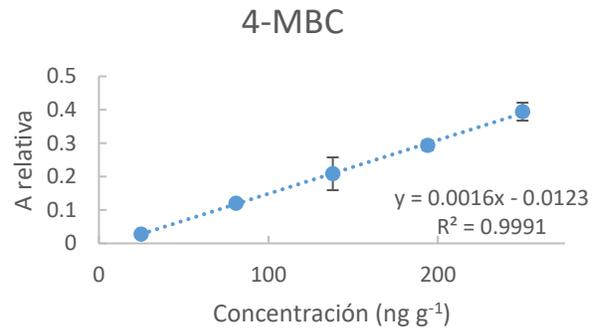
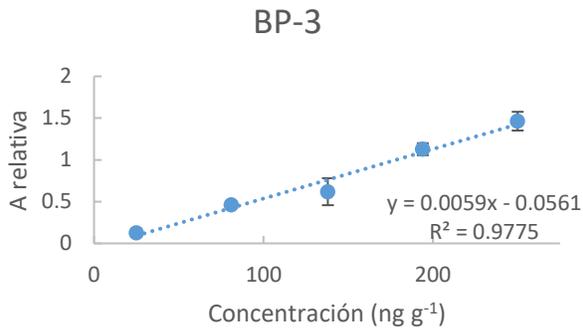
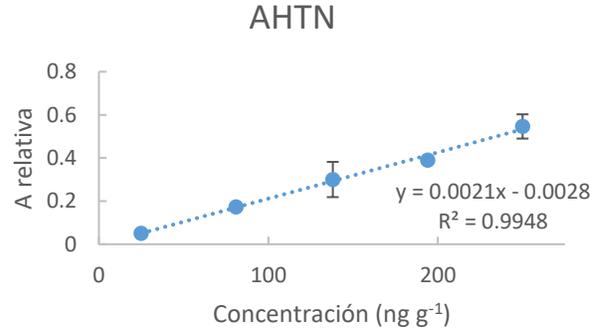
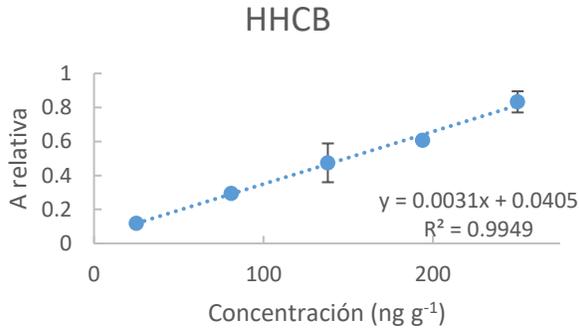


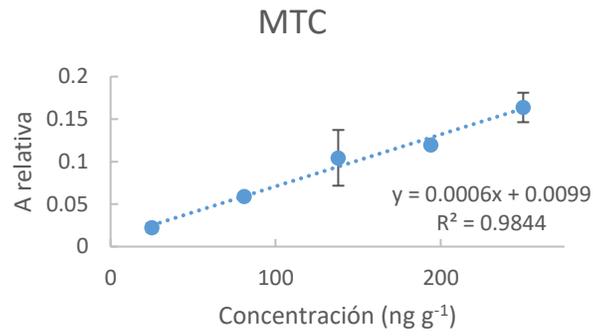
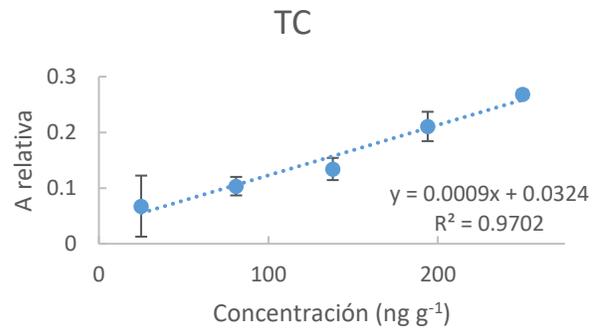
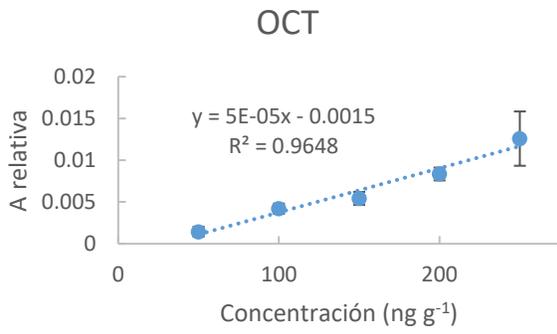
**MTC**



## Anexo V

*Curvas de calibración del análisis de PCP en lechuga mediante UAE-SPME-GC-MS*





## Anexo VI

### *Pruebas de hipótesis para la determinación de PCP en lechuga cultivada*

La intensidad de la señal de HHCB y 4-MBC en el análisis de la lechuga cultivada fortificada (**Tabla A3**) fue aproximadamente 1.5 veces mayor a la intensidad de las interferencias observadas en la lechuga cultivada blanco (**Tabla A4**). Para determinar si la señal de los analitos era significativamente mayor a la de las interferencias, se realizó una prueba de hipótesis al 95% de confianza.

**Tabla A3.** Área de los analitos determinada en el análisis de la lechuga cultivada fortificada (n=3).

| Compuesto    | A <sub>1</sub> | A <sub>2</sub> | A <sub>3</sub> | A <sub>promedio</sub> | S       |
|--------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------|---------|
| <b>HHCB</b>  | 42991          | 42347          | 37750          | 41029.33              | 2858.18 |
| <b>4-MBC</b> | 1839           | 1957           | 1816           | 1870.67               | 75.65   |

**Tabla A4.** Área de las interferencias determinada en el análisis de la lechuga cultivada blanco (n=3).

| Compuesto    | A <sub>1</sub> | A <sub>2</sub> | A <sub>3</sub> | A <sub>promedio</sub> | S       |
|--------------|----------------|----------------|----------------|-----------------------|---------|
| <b>HHCB</b>  | 23106          | 34282          | 28872          | 28753.33              | 5588.94 |
| <b>4-MBC</b> | 828            | 1008           | 1436           | 1090.67               | 312.32  |

### HHCB

Hipótesis nula ( $H_0: A_{HHCB}=A_i$ )

Hipótesis alterna ( $H_1: A_{HHCB}>A_i$ )

donde:  $A_{HHCB}$ : Área promedio de la señal de HHCB en el análisis de la lechuga cultivada fortificada

$A_i$ : Área promedio de la señal de la interferencia en el análisis de la lechuga cultivada blanco

Antes de poder resolver la prueba de hipótesis planteada fue necesario determinar si la variación de  $A_{HHCB}$  y  $A_i$  es homocedástica, para lo que se realizó una prueba con la F de Fisher a dos colas y 95% de confianza:

$H_0: S_{HHCB}=S_i$

$H_1: S_{HHCB}\neq S_i$

$$F_{obs} = \frac{s_i^2}{s_{HHCB}^2} = 3.82$$

A partir de los valores de F tabulados de acuerdo a los grados de libertad:

$$F_{crítica} = 39.00$$

Como  $F_{obs} < F_{crítica}$ , se determinó que las varianzas son homocedásticas ( $s_{HHCB} = s_i$ ).

Posteriormente, se realizó una prueba con la t de Student a una cola con el 95% de confianza. Para ésto, fue necesario calcular la varianza combinada ( $s^2$ ) y los grados de libertad ( $\tau$ ):

$$s^2 = \frac{(n_{HHCB} - 1)s_{HHCB}^2 + (n_i - 1)s_i^2}{(n_{HHCB} - 1) + (n_i - 1)} = 19702721.62$$

$$\tau = (n_{HHCB} - 1) + (n_i - 1) = n_{HHCB} + n_i - 2 = 4$$

Debido a la homocedasticidad de las varianzas, la  $t_{obs}$  se calculó como:

$$t_o = \frac{A_{HHCB} + A_i}{\left[ s^2 \left( \frac{1}{n_{HHCB}} + \frac{1}{n_i} \right) \right]^{1/2}} = 3.39$$

A partir de los valores de t tabulados de acuerdo a los grados de libertad:

$$t_{crítica} = 2.13$$

Como  $t_{obs} > t_{crítica}$ , se rechazó la hipótesis nula, determinando que el área promedio de la señal de HHCB es significativamente diferente al área promedio de la interferencia ( $A_{HHCB} = A_i$ ), confirmando la detección de HHCB en la lechuga cultivada fortificada.

4-MBC

Hipótesis nula ( $H_0: A_{MBC}=A_i$ )

Hipótesis alterna ( $H_1: A_{MBC}>A_i$ )

donde:  $A_{MBC}$ : Área promedio de la señal de 4-MBC en el análisis de la lechuga cultivada fortificada

$A_i$ : Área promedio de la señal de la interferencia en el análisis de la lechuga cultivada blanco

Al igual que en la prueba de hipótesis de HHCB, se comenzó determinando si la varianza de las áreas era significativamente diferente con una prueba con la F de Fisher a dos colas al 95% de confianza:

$H_0: s_{MBC}=s_i$

$H_1: s_{MBC}\neq s_i$

$$F_{obs} = \frac{s_i^2}{s_{MBC}^2} = 17.044$$

A partir de los valores de F tabulados de acuerdo a los grados de libertad:

$$F_{critica} = 39.00$$

Como  $F_{obs} < F_{critica}$ , se determinó que las varianzas son homocedásticas ( $s_{MBC}=s_i$ ).

Posteriormente, se realizó una prueba con la t de Student a una cola con el 95% de confianza.

$$s^2 = \frac{(n_{MBC} - 1)s_{MBC}^2 + (n_i - 1)s_i^2}{(n_{MBC} - 1) + (n_i - 1)} = 51633.35$$

$$\tau = (n_{MBC} - 1) + (n_i - 1) = n_{MBC} + n_i - 2 = 4$$

$$t_o = \frac{A_{MBC} + A_i}{\left[ s^2 \left( \frac{1}{n_{MBC}} + \frac{1}{n_i} \right) \right]^{1/2}} = 3.43$$

A partir de los valores de t tabulados de acuerdo a los grados de libertad:

$$t_{crítica} = 2.13$$

Como  $t_{obs} > t_{crítica}$ , se rechazó la hipótesis nula, determinando que el área promedio de la señal de 4-MBC es significativamente diferente al área promedio de la interferencia ( $A_{MBC} = A_i$ ), confirmando la detección de 4-MBC en la lechuga cultivada fortificada.

## Anexo VII

### *Error asociado a la interpolación en una curva de calibración*

Las ecuaciones utilizadas para la determinación del error asociado a la concentración obtenida al interpolar la respuesta (área relativa) de cada señal en la curva de calibración ( $s_{x_0}$ ) correspondiente es:

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - y)^2}{b^2 \sum_i (x_i - x)^2}}$$

donde:

$s_{y/x}$ : error aleatorio en la dirección  $y$

$b$ : pendiente de la curva de calibración

$m$ : repeticiones realizadas del análisis

$n$ : número de puntos de la curva de calibración

$y_0$ : valor experimental a partir del que se determina el valor de  $x_0$

$y$ : promedio de  $y$  de todos los puntos de la curva de calibración

$x_i$ : valor de  $x$  para el  $i$ -ésimo punto de la curva de calibración

$x$ : promedio de  $x$  de todos los puntos de la curva de calibración

El estadístico  $s_{y/x}$  se determina matemáticamente utilizando la ecuación siguiente:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - y_{i,a})^2}{n - 2}}$$

donde:

$y_i$ : valor de  $y$  para el  $i$ -ésimo punto de la curva de calibración

$y_{i,a}$ : valor de  $y$  ajustado