



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

*Propuesta de una metodología para la  
determinación de triclosán en pescado por  
extracción asistida con ultrasonido (UAE)  
combinada con microextracción en fase sólida  
(SPME) seguida de cromatografía de gases -  
espectrometría de masas (GC-MS)*

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO**

**PRESENTA**

**LUIS ÁNGEL VÉLEZ PÉREZ**



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 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 esta 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 ASIGNADO**

**PRESIDENTE:** FRANCISO ROJO CALLEJAS

**VOCAL:** ARACELI PATRICIA PEÑA ALVAREZ

**SECRETARIO:** EVANGELINA CAMACHO FRIAS

**1er. SUPLENTE:** LUIS ALEJANDRO DIAZ FLORES

**2° SUPLENTE:** ELIZABETH REYES LOPEZ

### **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Laboratorio 101, División de Estudios de Posgrado, Edificio B, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, México, D. F.

### **ASESOR DEL TEMA:**

Dra. Araceli P. Peña Álvarez

---

### **SUPERVISOR TÉCNICO:**

M. en C. Rocío Juárez Ciprés

---

### **SUSTENTANTE:**

Luis Ángel Vélez Pérez

---

Este trabajo se presentó en el Congreso Nacional de Química Analítica, celebrado en Guadalajara, Jalisco en Junio del 2013.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la UNAM, por la formación y conocimientos que recibí, por todas las experiencias de vida y todos esos momentos especiales tanto académicos como personales que tuve dentro de sus instalaciones y que hacen de mí una persona feliz, satisfecha y un profesional exitoso. ¡Muchas gracias a mi amada universidad! Orgullosamente **#HechoenCU**.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) UNAM por el proyecto PAPIIT No. IN216114.

# Índice

<b>Abreviaturas (por sus siglas en inglés)</b> .....	<b>3</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>4</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>5</b>
<b>2. Antecedentes</b> .....	<b>7</b>
2.1. El agua.....	7
2.1.1. Situación nacional.....	7
2.1.2. Contaminación del agua.....	9
2.1.3. Aguas residuales .....	9
2.1.4. Tratamiento de aguas residuales.....	11
2.1.5. Normatividad en aguas residuales tratadas .....	12
2.2. Contaminantes emergentes .....	14
2.2.1. Productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs) .....	15
2.2.1.1. Triclosán .....	16
2.2.1.1.1. Propiedades fisicoquímicas del Triclosán.....	17
2.2.1.1.2. Triclosán en el medio ambiente.....	18
2.2.1.1.3. Situación Nacional .....	19
2.3. Acuicultura .....	20
2.3.1. “Tilapia”.....	21
2.4. Preparación de la muestra: El primer plato teórico .....	24
2.4.1. Extracción asistida por ultrasonido (UAE) .....	25
2.4.2. Microextracción en fase sólida (SPME) .....	26
2.4.3. Derivatización .....	29
2.5. Cromatografía de gases .....	31
2.5.1. Sistema acoplado GC-MS .....	32
<b>3. Justificación</b> .....	<b>34</b>
<b>4. Objetivos</b> .....	<b>34</b>
4.1. Objetivo general .....	34
4.2. Objetivos particulares.....	34
<b>5. Desarrollo experimental</b> .....	<b>35</b>
5.1. Materiales.....	35

5.2. Equipos.....	35
5.3. Reactivos y estándares.....	36
5.4. Condiciones cromatográficas.....	36
5.5. Muestras de pescado .....	37
5.6. Tratamiento previo a la muestra.....	37
5.7. Determinación del contenido de grasa total .....	37
5.7.1. Extracción Soxhlet.....	37
5.7.2. UAE.....	38
5.8. Identificación de TCS por GC-MS .....	38
5.9. Metodología para la determinación de TCS en pescado .....	39
5.10. Optimización de la UAE .....	40
5.11. Diagrama analítico propuesto para la determinación de TCS en pescado.....	41
5.12. Blanco de pescado .....	42
5.13. Repetibilidad del sistema.....	42
5.14. Linealidad del sistema.....	42
5.15. Repetibilidad del método .....	42
5.16. Linealidad del método .....	42
<b>6. Resultados y análisis de resultados.....</b>	<b>43</b>
6.1. Determinación del contenido de grasa total .....	43
6.2. Identificación de TCS por GC-MS .....	44
6.3. Optimización de la UAE .....	45
6.4. Blanco de pescado .....	48
6.5. Repetibilidad del sistema.....	49
6.6. Linealidad del sistema.....	50
6.7. Repetibilidad del método .....	52
6.8. Linealidad del método .....	52
<b>7. Conclusiones .....</b>	<b>53</b>
<b>8. Referencias.....</b>	<b>54</b>

## Abreviaturas (por sus siglas en inglés)

CV	Coeficiente de variación
UAE	Extracción asistida con ultrasonido
GC	Cromatografía de Gases
GC-MS-SIM	Sistema acoplado cromatografía de gases-espectrometría de masas-modo monitoreo selectivo de iones
MTBSTFA	N-metil-N-t-butildimetilsililtrifluoroacetamida
MS	Espectrometría de Masas
PA	Poliacrilato
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEG	Polietilenglicol
PPCPs	Productos farmacéuticos y de cuidado personal
SIM	Monitoreo Selectivo de Iones
SCAN	Barrido Total de Iones
SPE	Extracción en Fase Sólida
SPME	Microextracción en Fase Sólida
TCS	Triclosán

## Resumen

Se propuso una metodología para la determinación de triclosán en pescado mediante extracción asistida con ultrasonido (UAE) combinada con microextracción en fase sólida (SPME) en modo inmersión y derivatización en fibra (N-metil-N-t-butildimetilsililtrifluoroacetamida MTBSTFA como agente derivatizante) y analizado mediante un sistema acoplado cromatografía de gases-espectrometría de masas en modo monitoreo selectivo de iones (GC-MS-SIM). Utilizando un diseño de experimentos  $2^3$  se optimizó la UAE siendo los parámetros evaluados tiempo, temperatura y disolvente. Las condiciones óptimas para UAE fueron 5 minutos de extracción, a 30°C en una mezcla de agua-metanol 90:10. Se determinó la repetibilidad del sistema con una precisión del 95.2 % y en la linealidad del mismo se obtuvo  $R^2=0.995$ ; a partir de la linealidad del sistema se determinaron los límites de detección y cuantificación siendo sus valores 0.214 y 0.649 ng/mL, respectivamente. Se evaluó la repetibilidad del método mediante una muestra de pescado fortificado a 100 ng/g y se determinó el triclosán con una precisión de 91.8% sin embargo, no fue posible determinar la linealidad del método ya que no se obtuvieron resultados lineales.



## 1. Introducción

Los contaminantes emergentes son un grupo de compuestos sintéticos que no son comúnmente monitoreados, no están regulados y la información de su impacto en el ambiente y la salud es prácticamente desconocida. Están presentes en productos utilizados en la vida diaria como son cosméticos y de aseo en el hogar, escuelas, hospitales y oficinas. Una vez que cumplen su propósito, estos productos son desechados hacia los sistemas de alcantarillado público que a su vez son canalizados a plantas de tratamiento de aguas. El tratamiento que reciben estas aguas no contempla la presencia de estos compuestos y por lo tanto no son eliminados (o son eliminados en muy poca cantidad).<sup>1,2</sup> Como consecuencia, persisten en el efluente de aguas ya tratadas que en ocasiones son utilizadas para recarga de aguas superficiales y en algunos casos para riego.

Dentro de los contaminantes emergentes podemos distinguir al triclosán (TCS), fungicida y bactericida presente en productos cosméticos como son enjuagues bucales, jabones líquidos, pastas dentales y talcos, por mencionar algunos.<sup>3,4</sup> La bioacumulación de TCS en animales marinos ha tenido efectos como natación errática, alteración en el comportamiento, aumento en el tamaño de las aletas y reducción en el tiempo de incubación de los huevos.<sup>4,5</sup>

Trabajos previos han identificado y cuantificado triclosán en efluentes de plantas de tratamiento de agua en la ciudad de México mediante microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (SPME-GC-MS), detectando triclosán en concentraciones de 0.1-10 ng/mL.<sup>6</sup>

Se ha identificado y cuantificado triclosán en especies marinas, además se ha reportado la bioacumulación de otros contaminantes emergentes como el bisfenol A en pescado.<sup>4</sup>

La especie de pescado que se utilizó en este estudio fue la "Tilapia", un pez de agua dulce que ocupa el quinto lugar en la producción pesquera de México y es además, después del camarón y el atún, el tercer producto acuático más consumido en México.<sup>7</sup>

El cultivo óptimo de “Tilapia” se realiza principalmente en 3 tipos de infraestructuras: estanques rústicos, estanques circulares y jaulas flotantes. Los estanques deben contener agua dulce obtenida de cuerpos de agua cercanos y diariamente recambiar una parte de su contenido; por otro lado, las jaulas flotantes aprovechan las corrientes de ríos, lagos, presas, etc. y son construidas dentro de dichos cuerpos de agua, implicando una reducción de costos.<sup>7,8</sup>

Debido a este impacto productivo y nutrimental, es importante identificar la presencia de contaminantes emergentes en este pescado, que además presenta bajo contenido de grasa<sup>9</sup> lo cual ofrece una ventaja en el análisis cromatográfico al reducirse la presencia de interferentes.

La microextracción en fase sólida (SPME) utiliza una fibra de sílice fundida recubierta de un material adsorbente, que es en general un recubrimiento polimérico utilizado para la extracción de compuestos orgánicos volátiles o semivolátiles. El principio en el que se basa la SPME es el reparto de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra. La extracción de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra da inicio en el momento en que la fibra entra en contacto con la muestra y se da por concluida en el momento que la concentración de analito ha alcanzado el equilibrio de distribución entre fibra y muestra. En la extracción por inmersión, la fibra se sumerge directamente en muestras líquidas y los analitos son transportados directamente de la matriz hacia la fibra.

La formación de derivados puede llevarse a cabo en las fibras de SPME, una vez completado el proceso de extracción, la fibra con los analitos extraídos se pone en contacto con el agente derivatizante en modo headspace evitando así posibles daños en la fibra.<sup>10,11</sup>

El objetivo de este trabajo fue proponer una metodología para la determinación de triclosán en pescado mediante UAE seguida de microextracción en fase sólida modo inmersión con derivatización en fibra (MTBSTFA como agente derivatizante) y analizado por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

## **2. Antecedentes**

### **2.1. El agua**

El agua es fuente de vida y es el nexo que une a todos los seres vivos del planeta. La forma en que cuidamos de este invaluable recurso no renovable determina las condiciones de vida presentes y futuras. El 70 % de la superficie de la Tierra es agua y tan sólo 30 % es tierra firme. La mayor parte del agua en la Tierra es agua salada: 97.5 % es agua de mares y océanos. El restante 2.5 % es agua dulce, pero casi toda esta congelada en los polos y en los glaciares. Del agua dulce, 69.7 % es agua congelada, 30 % es subterránea y en los ríos y lagos hay sólo 0.3 %.

Nuestro país posee aproximadamente el 0.1 % del total de agua dulce disponible a nivel mundial lo que determina que un porcentaje importante del territorio esté catalogado como zona semidesértica. Esto implica la necesidad de considerar al agua no sólo como un elemento vital, sino como un factor estratégico para el desarrollo del país.

En la clasificación mundial, México está considerado como un país con baja disponibilidad de agua. En todo el territorio nacional llueve aproximadamente 1511 km<sup>3</sup> de agua cada año lo que equivale a una piscina de un kilómetro de profundidad del tamaño de la capital el Distrito Federal. El 72 % (1084 km<sup>3</sup>) de esa agua de lluvia se evapora.<sup>12-13</sup>

#### **2.1.1. Situación nacional**

##### **El agua en cifras:**

- 1) Anualmente se utilizan 72 mil millones de m<sup>3</sup> (70 % de esta agua es extraída del subsuelo) de los cuales 77 % es utilizada para uso agropecuario, 10 % para uso industrial y 13 % para abastecimiento público
- 2) Del agua destinada para abastecimiento público, entre 30 y 50 % se pierde en fugas, 46 % es para uso doméstico y 37 % pertenece a toma clandestina
- 3) Cada mexicano consume en promedio 360 litros de agua al día

- 4) México ocupa el lugar 106 de un total de 122 en calidad mundial de agua.
- 5) En México hay 37 ríos y 70 lagos principales, éstos últimos ocupan un área de 370,891 hectáreas
- 6) 24 % de las aguas superficiales no se usan porque están muy contaminadas
- 7) 89.2 % del país cuenta con agua potable, 10.6 millones de personas no tienen acceso a la misma
- 8) Sólo el 27.6 % de aguas residuales captadas en los centros urbanos es tratada.
- 9) 70 % de los cuerpos de agua en México presentan algún signo de contaminación

Los problemas del agua se centran tanto en su cantidad como en su calidad. La comunidad debe conocer la importancia de la calidad de la misma y también debe encargarse de su cuidado y preservación. El crecimiento demográfico y los cambios en las pautas de producción y consumo han llevado al incremento de los procesos industriales, la minería, la agricultura y la urbanización, lo cual ha provocado el vertido de todo tipo de desechos a los cuerpos receptores de aguas residuales. La contaminación del agua priva a la humanidad de recursos alimentarios y facilita la difusión de enfermedades, además de perjudicar gravemente a ecosistemas, con efectos irreversibles y agravar las condiciones de vida de la sociedad y de la economía nacional. <sup>12-14</sup>

### **2.1.2. Contaminación del agua**

La contaminación del agua es lo que sucede cuando industrias, plantas de tratamiento, sitios de construcción y las personas vierten líquidos o sólidos directamente al agua provocando que ésta se ensucie, alterando su naturaleza inodora, incolora e insípida. Otra vía de contaminación del agua es la que se da por filtración de líquidos a través de la tierra hacia los mantos acuíferos. Ejemplo de este último caso son los lixiviados de los basureros, que son líquidos producidos por la descomposición de la basura y que se filtran al suelo contaminando los acuíferos.

La detección en la contaminación de aguas en México se da mediante una red nacional de monitoreo que opera la Comisión Nacional del Agua desde hace más de treinta años a más de 215 cuerpos de agua observando el comportamiento de la calidad del agua. Sólo el 5 % se considera potable (sin contaminantes), la aceptable es del 22 % (con contaminantes dentro de los límites establecidos en las normas oficiales), el agua poco contaminada representa un 49 %, la contaminada 15 %, la altamente contaminada 7 % e incluso se tiene presencia de tóxicos en 2 %.<sup>15</sup>

El agua contaminada puede ser insegura para beber, bañarse, nadar o pescar. Los organismos acuáticos que viven en aguas contaminadas pueden absorber estos contaminantes y en el caso de especies comestibles, la persona que los ingiera podría enfermar. En el agua contaminada muchos peces y plantas no pueden vivir en absoluto.

### **2.1.3. Aguas residuales**

Son aguas residuales aquellas que resultan del uso doméstico o industrial del agua; se definen también como la combinación de los residuos líquidos procedentes tanto de residencias como de instituciones públicas y establecimientos industriales y comerciales a los que pueden agregarse eventualmente, aguas subterráneas, superficiales y pluviales.<sup>16</sup>

Se les llama residuales ya que son aguas que una vez que fueron utilizadas constituyen un residuo, algo que no sirve para el usuario directo; se les nombra también como aguas negras por el color que habitualmente tienen.

En México se generan alrededor de 420 m<sup>3</sup> de aguas residuales cada segundo; de estas las municipales representan 250 m<sup>3</sup>/s y las no municipales el resto (170 m<sup>3</sup>/s). Los giros industriales que generan mayor cantidad en volumen son la industria del azúcar, del petróleo, química, acuícola (en muy poca proporción) y el sector de servicios.

Según su origen, las aguas residuales se pueden clasificar en:

- 1) Domésticas: son las provenientes de las actividades de la vida diaria como lavado de ropa, baño, preparación de alimentos, limpieza, etc. Estos desechos presentan un alto contenido de materia orgánica, detergentes y grasas. Su composición varía según los hábitos de la población que los genera.
- 2) Pluviales: son las originadas por el escurrimiento superficial de las lluvias que fluyen desde los techos, calles, jardines y demás superficies del terreno. Son generalmente muy contaminadas debido al arrastre de basura y demás materiales acumulados en la superficie. La naturaleza de esta agua varía según su procedencia: zonas urbanas, rurales, semirurales y aún dentro de estas zonas se presentan enormes variaciones según el tipo de actividad o uso del suelo que se tenga.
- 3) Residuos líquidos industriales: son los provenientes de los diferentes procesos industriales. Su composición varía según el tipo de proceso industrial y aún para un mismo proceso industrial se presentan características diferentes en industrias diferentes. Pueden ser alcalinos o ácidos, tóxicos, coloreados, etc. Su composición refleja el tipo de materias primas utilizado dentro del proceso industrial.

- 4) Agrícolas: son las que provienen del escurrimiento superficial de las zonas agrícolas. Se caracterizan por la presencia de pesticidas, sales y un alto contenido de sólidos en suspensión. La descarga de esta agua es recibida directamente por los ríos o por los alcantarillados.<sup>17</sup>

Las aguas residuales, su origen e interacción se muestran en la Figura 2.1.3.1:

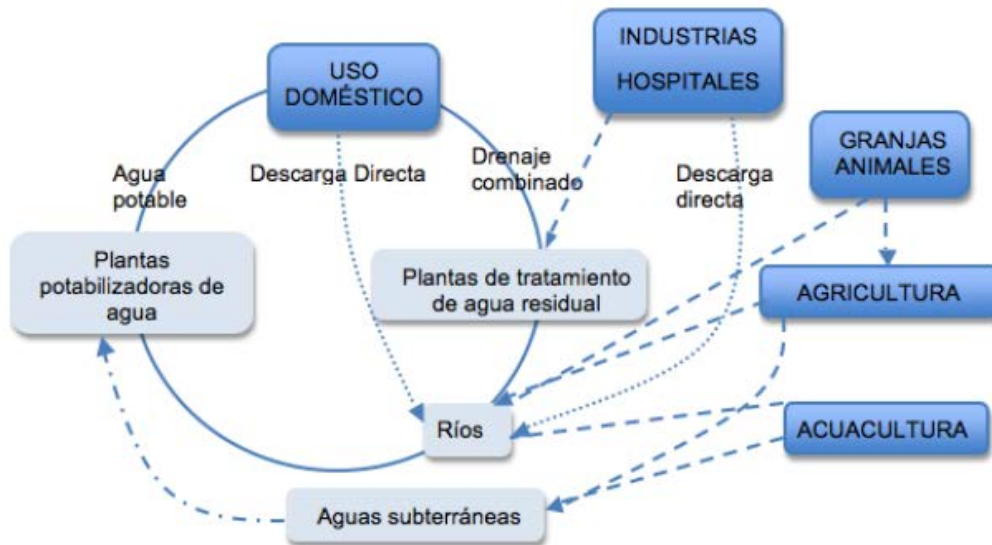


Figura 2.1.3.1. Ciclo urbano del agua<sup>17</sup>

El hombre se sirve del agua existente en la naturaleza para consumirla y utilizarla. Una vez contaminada, por sus características químicas, físicas y biológicas ésta no puede ser reutilizada de forma directa y es por eso que requerirá de tratamientos que eliminen aquellas partículas o sustancias perjudiciales para el hombre y organismos vivos.

#### 2.1.4. Tratamiento de aguas residuales<sup>18-20</sup>

Es una serie de procesos físicos, químicos y biológicos que se aplican a las aguas residuales con el fin de eliminar los contaminantes presentes en éstas antes de ser liberadas en las vías fluviales. En general el tratamiento de aguas permite disponer de los efluentes de una manera segura sin peligro para la salud humana o un daño inaceptable para el medio ambiente.

El tratamiento de aguas residuales inicia con un *pretratamiento* en el cual el influente pasa a través de rejas con el objetivo de eliminar sólidos gruesos y otros materiales como la arena. A continuación recibe un *tratamiento primario* en el que los sólidos pesados sedimentan y sustancias más ligeras como las grasas flotan y son fácilmente eliminados. El *tratamiento secundario* elimina la materia orgánica en presencia de oxígeno por microorganismos aerobios (lodos activados). Es en este punto que se considera al agua residual libre de contaminantes y es vertida en aguas superficiales.

Si el agua será reutilizada en servicios al público, se somete a un *tratamiento terciario* que remueve contaminantes tóxicos no biodegradables mediante arena, grava o adsorción con carbón activado. Además se añaden clarificadores, reguladores o ajustadores de pH e incluso se pueden utilizar tratamientos avanzados tales como la ósmosis inversa o la ozonólisis. La etapa de *desinfección* utiliza una solución de cloro ya que puede aplicarse a grandes cantidades de agua a un bajo costo. El peróxido de hidrógeno y la luz ultra violeta (UV) también pueden ser utilizados para la desinfección, pero estos métodos de desinfección no son de uso común por sus elevados costos.

#### **2.1.5. Normatividad en aguas residuales tratadas**

Una vez que las aguas residuales han sido tratadas, es necesario que cumplan especificaciones fisicoquímicas y biológicas que garanticen que su reinscripción a las actividades humanas no representará un riesgo a la salud y/o al medio ambiente. La norma oficial mexicana que contempla esta situación es la NOM-003-SEMARNAT-1997 que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reusen en servicios al público<sup>21</sup>.



Estas aguas residuales tratadas (efluente) se pueden clasificar en:

- 1) Agua empleada en servicios al público con contacto directo, utilizada principalmente para la recarga de ríos y lagos, en la agricultura (si proviene de descargas municipales), para el llenado de lagos y canales artificiales con paseos en lancha, remo, canotaje y esquí, fuentes de ornato, lavado de vehículos y riego de parques y jardines.
- 2) Agua empleada en servicios al público con contacto indirecto, utilizada para el riego de jardines y camellones en autopistas, camellones en avenidas, fuentes de ornato, campos de golf, abastecimiento de hidrantes de sistemas contra incendios, lagos artificiales no recreativos, barreras hidráulicas de seguridad y panteones.<sup>15</sup>

Los contaminantes presentes en las aguas residuales y los efluentes de las plantas de tratamiento se pueden clasificar como se muestra en la Figura 2.1.5.1

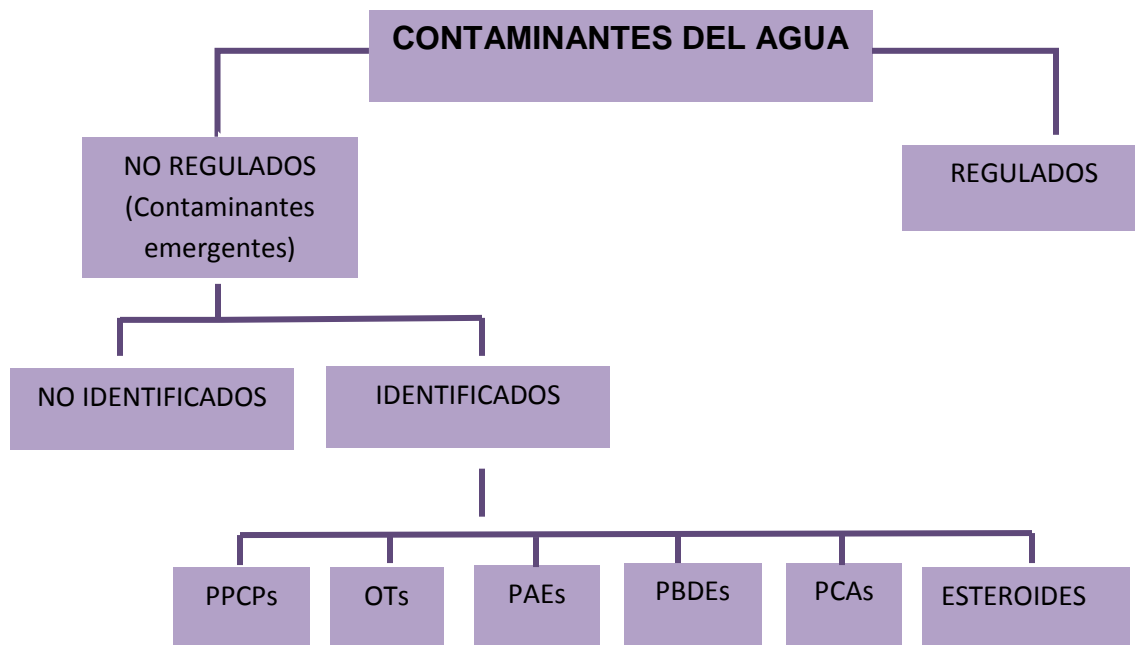


Figura 2.1.5.1 Diagrama de los contaminantes del agua. PPCPs: Productos farmacéuticos y de cuidado personal; OTs: Compuestos orgánicos de estaño; PAEs: Ésteres de ácido ftálico; PBDEs: Éteres difenilpolibromados; PCAs: Alcanos policlorados.<sup>15</sup>

La norma mencionada contempla como contaminantes del agua los patógenos evaluando la cantidad de coliformes fecales; los parásitos según la cantidad de huevos de helminto; la demanda bioquímica de oxígeno y los contaminantes a los que incluso llama “básicos” como son grasas, aceites, sólidos suspendidos y metales pesados.

Existe un grupo de compuestos llamados “contaminantes emergentes” los cuales no están regulados ni se contemplan en la norma anteriormente mencionada. La remoción parcial de contaminantes emergentes en efluentes de plantas de tratamiento sólo se ha reportado en plantas que cuentan con un tratamiento terciario.<sup>22</sup> De las 2,832 plantas de tratamiento que se tienen registradas en el país, tan sólo 85 cuentan con tratamiento terciario. Por esta situación es necesaria una investigación del impacto que pudieran causar en el medio ambiente y el ser humano.<sup>16</sup>

## **2.2. Contaminantes emergentes**

En los últimos años, la investigación del impacto de la contaminación química se ha centrado en compuestos convencionales tales como los plaguicidas, los carcinógenos y los de origen industrial. Varios de ellos ya se encuentran regulados y hay normas límite para su presencia en aguas residuales y tratadas.

Sin embargo, hay sustancias que reciben poca atención como posibles contaminantes ambientales, por ejemplo los ingredientes activos en productos de cuidado personal. Aquí están incluidos los que están presentes en nutraceuticos y cosméticos como fragancias, agentes de protección solar, cremas, entre otros. Estos compuestos constituyen un nuevo tipo de contaminación ambiental y por lo tanto los riesgos asociados a ellos son desconocidos y es necesaria la identificación de los mismos en el medio ambiente. Es a este grupo de contaminantes a los que se conoce como “contaminantes emergentes”.<sup>2</sup>

Se les llama contaminantes ya que es la mano humana la que les dio ingreso al medio ambiente pues son xenobióticos, esto es, no existen en la naturaleza sino son producto de la síntesis química. En contacto con el agua alteran su naturaleza inodora, incolora e insípida.

Son “emergentes” porque es hasta estos días que han recibido atención y aumentado los estudios del impacto que pueden tener. Otro motivo por el que se les denomina así es por que regresan al ser humano, “vuelven” en el agua ya tratada y en el peor de los casos, en los organismos que consume. La detección de contaminantes emergentes en los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales es producto de la ineficiencia del tratamiento de las mismas y el uso de estas aguas en la recarga de aguas superficiales facilita que alcancen otros organismos.

### **2.2.1. Productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs)**

Dentro de los contaminantes emergentes, podemos clasificar a los Productos Farmacéuticos y de Cuidado Personal (*Pharmaceuticals and Personal Care Products, PPCPs por sus siglas en inglés*) que son productos utilizados con fines cosméticos y para el cuidado de la salud humana y animal. Esta clasificación incluye a los fármacos de venta libre y de prescripción, suplementos alimenticios, fragancias, protectores solares e incluso a los excipientes utilizados en la formulación de fármacos y cosméticos. Gran parte de los PPCPs son polares, ópticamente activos y cuando se detectan en el ambiente por lo general su concentración está a nivel trazas.<sup>2</sup>

La mayoría de estos productos se desechan o descargan en el medio ambiente de manera continua a través del hogar y los sistemas de aguas residuales industriales. Los ingredientes activos en los fármacos, una vez consumidos por el usuario final son metabolizados y excretados aunque hay ocasiones en que los ingredientes no son metabolizados completamente, por lo que una fracción de éstos se desecha intacta. En el caso de los productos cosméticos, ya que son

formulados para uso externo en el cuerpo humano, no están sujetos a alteraciones metabólicas lo que les da entrada al ambiente sin modificación química alguna.<sup>15</sup>

El continuo uso y desecho de PPCPs es otro motivo que los cataloga como contaminantes emergentes, ya que la poca o nula capacidad con la que pueden ser eliminados de las aguas residuales se ve rebasada por la cantidad en la que vuelven a ingresar a ellas dado el gran consumo de PPCPs. Esto hace que persistan en las aguas ya tratadas y vuelven al ser humano una vez que estas aguas son reinsertadas a las actividades diarias.<sup>1,2,5</sup>

Dentro de los productos de aseo corporal habitualmente utilizados se encuentran los shampoos, jabones, pastas dentales y enjuagues bucales. En todos ellos es conocida la presencia de triclosán, un eficaz fungicida y bactericida que en los últimos años ha sido objeto de investigación como contaminante emergente.

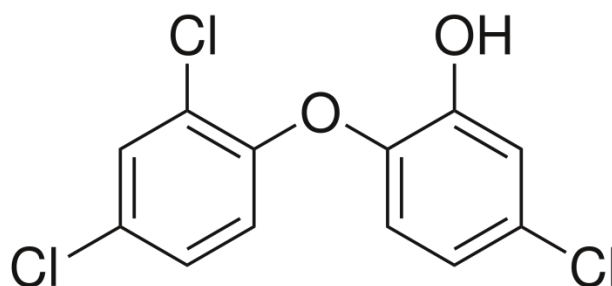
#### **2.2.1.1. Triclosán**

El triclosán (TCS) es un polvo blanco, no iónico, con un olor apenas perceptible, muy poco soluble en agua. Como antimicrobiano de amplio espectro, es utilizado como ingrediente en productos tales como desinfectantes, jabones, detergentes, pastas dentales, enjuagues bucales, talcos, shampoos, empaques para alimentos, entre otros. Además se adiciona en otros productos de uso industrial y veterinario. En su modo de acción permea la membrana celular e impide la síntesis de ácidos grasos formadores de membrana celular a través de la inhibición de la enzima enoil-reductasa que participa en la elongación de cadenas de ácidos grasos.<sup>23,24</sup>

El TCS fue utilizado por primera vez desde los años 70's y desde entonces ha aumentado su participación como ingrediente activo en productos antibacteriales y de uso cosmético, los cuales contienen entre 0.1-0.3% en peso del producto. El problema de su uso radica en su semejanza a bifenilos como el caso del bisfenol A, dioxinas y hormonas tiroidales, por lo que podría causar disrupción endocrina, efecto unido a la resistencia antibiótica y la formación de subproductos cancerígenos que el TCS también puede generar.

La Comisión Europea y la Dirección General de Protección a la Salud y al Consumidor, en conjunto con la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) han establecido que el límite máximo permisible de contenido de TCS en productos cosméticos es de 0.3% considerando a esta concentración como un riesgo aceptable. Sin embargo, la preocupación de estas dependencias radica en que no sólo los productos cosméticos contienen TCS por lo que la exposición real del ser humano al reactivo es mayor que la contemplada. Además, el consumo creciente de cosméticos incrementa la exposición de organismos acuáticos al TCS cuando por las actividades rutinarias de aseo personal son desechados al drenaje.<sup>23, 24</sup>

#### 2.2.1.1.1. Propiedades fisicoquímicas del triclosán (TCS)<sup>24</sup>



Triclosán

- **Apariencia:** polvo blanco cristalino
- **Fórmula:** C<sub>12</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>
- **Nombre IUPAC:** 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) fenol
- **Nombres comunes:** Triclosán, Irgasán DP300, Aquasept, Sapoderm, SterZac, Irgaguard B1000
- **Peso molecular:** 289.541 g/mol
- **Constante de disociación pKa (20°C):** 8.14
- **Constante de reparto octanol-agua LogK<sub>ow</sub> (25°C):** 4.8
- **Punto de fusión:** 55 – 60 °C
- **Solubilidad:** 0.012 g/L en agua. Soluble en metanol y en presencia de bases.
- **Compuestos relacionados:** metiltriclosán

#### **2.2.1.1.2. Triclosán en el medio ambiente**

La presencia de TCS en aguas superficiales ha sido documentada y su principal vía de entrada son las aguas tratadas utilizadas en recarga de ríos y lagos. Así lo demostraron Heinz Singer y colaboradores<sup>25</sup>, quienes preocupados por la bioacumulación de TCS en algas acuáticas en concentraciones de hasta 500 ng/L centraron su investigación en la cuantificación de TCS en efluentes de plantas de tratamiento y sedimentos en Suiza. Utilizando como métodos de preparación de muestra extracción en fase sólida (SPE) y extracción acelerada con solventes (ASE) seguidos de formación de alquil-derivados con diazometano y posterior análisis por cromatografía de gases en tándem espectrometría de masas en modo selectivo de iones (GC-MS-SIM), cuantificaron TCS en el orden de 42-213 ng/L en los efluentes de las plantas de tratamiento y 53 ng/g en sedimentos. Utilizando una metodología similar, Nuria Lozano y colaboradores cuantificaron TCS en cada una de las etapas de tratamiento de aguas residuales que aplica cierta planta, logrando determinar la cantidad de TCS que no fue alterada por el proceso. Concluyeron que el efluente de esta planta vierte al río agua tratada con una concentración de TCS de 100-360 ng/L.<sup>26</sup> A la par de Singer en Suiza, Guang-Guo Ying y su colaborador cuantificaron TCS en efluentes de 19 plantas de tratamiento australianas. Su metodología utilizó SPE, formación de derivados sililados con N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) y GC-MS-SIM, cuantificando TCS en concentraciones de 23-434 ng/L.<sup>27</sup>

Una vez que se generó evidencia de la presencia de TCS y otros contaminantes emergentes en los efluentes de aguas residuales y cuerpos de agua superficiales, algunos grupos de trabajo investigaron la bioacumulación de TCS en organismos de orden superior a las algas. Mohammad A. Mottaleb y colaboradores recolectaron peces en el estado de Texas, EU, después, utilizando extracción líquido-líquido (LLE), separación con silica gel y cromatografía de permeación en gel (GPC) seguido de formación de derivados con MSTFA y posterior análisis mediante GC-MS-SIM cuantificaron TCS en tejido de pescado en concentraciones de 17-25 ng/g.

Esta metodología debe forzosamente incluir una etapa de limpieza con GPC para ser aplicada en peces con más de 1% de grasa total, de lo contrario la efectividad del análisis por GC-MS-SIM se ve muy afectada.<sup>28</sup>

Otros grupos de trabajo han desarrollado metodologías para determinar TCS y otros PPCPs en diferentes animales. Cueva-Mestanza y colaboradores desarrollaron en España una metodología para cuantificar varios principios activos farmacéuticos en moluscos, en concentraciones de 30-220 ng/g utilizando extracción micelar asistida con microondas (MAME) seguida de SPE y cromatografía de líquidos de alta resolución con detector ultravioleta (HPLC-UV);<sup>29</sup> la metodología desarrollada también en España por Pilar Canosa y colaboradores utiliza dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), limpieza con SPE, formación de derivados terbutilsililados con MTBSTFA y análisis por GC-MS-SIM para la determinación de TCS y MTCS en pescado.<sup>30</sup> Un caso más es el de Xi Wei y colaboradores, en el sur de China, quienes utilizando SPE y HPLC-MS cuantificaron bisfenol A en pescado en una concentración de 0.5-0.2 ng/g.<sup>31</sup>

#### **2.2.1.1.3. Situación Nacional**

En México ya también se tienen estudios de la presencia de TCS. El grupo dirigido por Araceli Peña Álvarez identificó TCS en influentes y efluentes de plantas de tratamiento aguas residuales en la Ciudad de México, específicamente en Ciudad Universitaria, Cerro de la Estrella, Coyoacán, Chapultepec, Ciudad Deportiva y San Juan de Aragón. Utilizando microextracción en fase sólida (SPME) seguida de GC-MS-SIM, se identificó y cuantificó TCS en concentraciones de 0.1-10 ng/g.<sup>6</sup>

Este mismo equipo de trabajo analizó matrices vegetales provenientes de cultivos en Xochimilco, ya que se sabe son regados con aguas tratadas provenientes de la planta de tratamiento de Cerro de la Estrella, donde ya se habían cuantificado PPCPs. Muestras de lechuga, cilantro, perejil y epazote fueron sometidos a SPME seguida de GC-MS-SIM. En el caso del TCS, fue detectado pero su concentración estuvo por debajo del límite de cuantificación.<sup>15</sup>

Como ya se mencionó, el efluente de plantas de tratamiento de aguas residuales e incluso las aguas no tratadas son utilizadas para riego y recarga de aguas superficiales. Ejemplo de esta situación es el trabajo de Blanca Jiménez Cisneros y colaboradores quienes tuvieron conocimiento de que aguas no tratadas provenientes de la Ciudad de México, aguas tratadas y superficiales son utilizadas en el estado de Hidalgo para riego de cultivos, por lo que estudiaron las aguas mencionadas; además, el estudio incluyó también a tierras regadas con estas aguas. Los PPCPs bajo análisis fueron TCS, naproxeno y carbamazepina. En el caso de TCS cuantificaron 11401 ng/L, 1.8 ng/L y 1.2 ng/L en aguas no tratadas, superficiales y subterráneas respectivamente. En los cultivos regados con agua no tratada se cuantificó TCS en concentraciones de 7.7 ng/g a 10 cm y 3.1 ng/g a 40 cm.<sup>32</sup>

El TCS puede bioacumularse en los organismos acuáticos y ejercer efectos fisiológicos adversos. Un ejemplo son las algas, extremadamente sensibles al TCS el cual puede inhibir su crecimiento. Los peces son igualmente afectados negativamente por TCS, con efectos reproductivos y de desarrollo notables que incluyen natación errática y de bajo rendimiento, menor capacidad de eclosión de los huevos y la demora en la eclosión.<sup>33, 34</sup>

### **2.3. Acuicultura**

Una actividad de suma importancia a nivel mundial es la acuicultura, que es el cultivo de organismos acuáticos tanto en zonas costeras como del interior que implica intervenciones en el proceso de cría para aumentar la producción. Ha crecido rápidamente y representa casi el 50% del pescado destinado a la alimentación a nivel mundial. Involucra una gran diversidad de ambientes como son los lagos, ríos, esteros, costas y ambientes oceánicos, entre otros, y tecnologías como jaulas, estanques, sistemas de recirculación, entre otros.<sup>35</sup>



En México la acuicultura representa el 16% de la producción pesquera total siendo los estados más productores Baja California, Sinaloa, Michoacán, Estado de México, Veracruz y Tamaulipas.

Dentro de las especies de mayor cultivo en el país podemos distinguir a la “Tilapia”, que ocupa el lugar 5 en la producción pesquera del país pero por su valor y alto consumo en el país se posiciona en el lugar 3. Además su cultivo y comercialización tienen un costo muy accesible.<sup>35</sup>






### **2.3.1. “Tilapia”**

Las “Tilapias” son peces endémicos originarios de África y el Cercano Oriente y fue ahí donde a comienzos del siglo XIX se inició la investigación para el aprovechamiento de sus características, mismas por las cuales se consideró una especie ideal para la piscicultura rural, especialmente en el Congo Belga (actualmente Zaire). A partir de 1924 se intensificó su cultivo en Kenia, sin embargo fue en el extremo Oriente, en Malasia en donde se obtuvieron los mejores resultados y se inició su progresivo cultivo en el ámbito mundial.

La “Tilapia” es un pez tropical que se desarrolla de manera óptima entre los 25 a 35 °C dependiendo de la especie, siendo las temperaturas letales para la especie aquellas menores a 10 °C motivo por el que los principales países productores se encuentran cerca del ecuador terrestre. Su cuerpo es comprimido, a menudo discoidal y raramente alargado; sus aletas dorsal y anal son cortas, la aleta caudal está redondeada. La piel está cubierta de escamas, su boca es ancha y bordeada de labios gruesos. Se adapta al cautiverio, acepta una amplia gama de alimentos, tiene acelerado crecimiento, se puede cultivar en estanques o en jaulas. La especie ha sido introducida en forma acelerada hacia otros países tropicales y subtropicales en todo el mundo, recibiendo el sobrenombre de “gallinas acuáticas” ante la aparente facilidad de su cultivo soportado en la rusticidad para su manejo, alta adaptabilidad a diferentes condiciones del medio, fácil reproducción, alta resistencia a enfermedades y alta productividad. Una de las características importantes de la “Tilapia” en condiciones de cultivo, es que acepta con facilidad

alimentos artificiales o balanceados, dando una conversión alimenticia de 1:1.5 kg es decir, que con 1.5 kg de alimento se puede producir 1 kg de carne de pescado. En general “Tilapia” es el nombre común que se da a las especies pertenecientes a la familia Cichlidae y es una de las más ricas en especies de agua dulce en el mundo. Las principales especies del género “Tilapia” son *T. rendalli* y *T. menopleura*, que aunque son especies muy prolíferas, tienen un lento crecimiento y tallas pequeñas por lo que son menos apropiadas para la explotación acuícola en comparación con las especies del género *Oreochromis* las cuales pueden alcanzar tallas mayores en menor tiempo (Tabla 2.3.1.1).<sup>36</sup>

**Tabla 2.3.1.1. Variedades de “Tilapia” en México**

<p>“Tilapia” de Nilo o nilótica (<i>Oreochromis niloticus</i>) es originaria de África, y comenzó a cultivarse en Tailandia y en Japón en 1962. Se desarrolla a una temperatura de 14°C-33°C. Alcanza un tamaño máximo de 60 cm y un peso reportado de hasta 4 kg.</p>	
<p>“Tilapia” mossámbica (<i>Oreochromis mossambicus</i>) proveniente del Este de África se le puede encontrar en distintas zonas del continente africano en estado salvaje. Se desarrolla en presas, canales o tanques con agua dulce o salobre, en climas con temperaturas de entre 17°C y 35°C. Alcanza un tamaño máximo de 39 cm y un peso reportado de hasta 1.13 kg.</p>	
<p>“Tilapia” Azul (<i>Oreochromis aureus</i>) Se distribuye en África, Europa y Asia. Se desarrolla en temperaturas de 8-30°C. Con un tamaño máximo de 45.7 cm y un peso reportado de hasta 2.01 kg.</p>	
<p>Mojarra (“Tilapia” <i>rendalli</i>) conocida más comúnmente en nuestro país como “mojarra “Tilapia””, tiene cabeza y cuerpo color verde oliva oscuro palideciendo sobre los lados. Se desarrolla a una temperatura de 24-28°C. Con un tamaño máximo de 45 cm y un peso reportado de hasta 2.5 kg.</p>	
<p>“Tilapia” nilótica stirling (<i>O. niloticus</i>, línea stirling), conocida también como “Tilapia” rosada, es de color pardo a rosado intenso, con tonalidades intensas en el pecho y cabeza, presenta bandas verticales de coloración tenue en la aleta caudal.</p>	

Actualmente muchos estudios a nivel mundial se han enfocado en conocer el tipo y cantidad de grasa presente en las diferentes especies de pescados y mariscos. Por su contenido de grasa en la carne, los pescados se pueden dividir en tres grupos:

- a. Magros o blancos. Con un contenido de grasa en peso total menor al 2 %. Se conoce también como pescado blanco.
- b. Semigrasos. 2-5 % de grasa
- c. Grasos. Con un contenido de grasa mayor al 5 %. Se conoce como pescado azul.

El cultivo y consumo de “Tilapia” se convierte en una alternativa viable por su alta productividad y la siguiente composición (base fresca):

- Proteína total-----19.2 %
- Grasas -----2.3 %
- Colesterol -----0.0 %
- Energía metabolizable -----96 kcal/100g

Lo que la hace más saludable y alimenticia que la carne de cerdo, aves y res.

La importancia de la acuicultura en nuestro país requiere el estudio de contaminantes emergentes ya que se conoce que hay granjas piscícolas ubicadas en presas que son recargadas con efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales y en el peor de los casos, aguas no tratadas son vertidas directamente. Un ejemplo de esta última situación es el Centro Acuícola de Jalapa del Marqués en el estado de Oaxaca, que es dependiente de las aguas de la presa “Benito Juárez” que a su vez recibe los residuos de los habitantes del poblado de Santa María Jalapa del Marqués.<sup>37</sup>

El estudio de contaminantes emergentes requiere que éstos sean aislados de la matriz en la que están presentes, concentrados y analizados por el método instrumental adecuado según sus propiedades fisicoquímicas de modo que se pueda obtener información cualitativa y cuantitativa.

## 2.4. Preparación de la muestra: El primer plato teórico

En palabras sencillas, la preparación de la muestra se define como la conversión de una matriz compleja a una forma apropiada para su posterior análisis. Es una etapa fundamental en cualquier análisis y es necesaria ya que en la mayoría de los casos la instrumentación analítica no puede manipular directamente las matrices donde residen los analitos. Llega a representar el 80% del tiempo total de un estudio pero si no se realiza todo el proceso analítico resulta inútil.

Un buen método de preparación de muestra debe cubrir los siguientes requisitos:

- Remover interferentes de la matriz, haciendo más selectivas las etapas de separación y detección.
- Concentrar al analito, incrementando así la sensibilidad en los análisis.
- En caso de ser necesario, convertir al analito en una forma adecuada para su detección y separación. Aquí encontramos a los formadores de derivados como el MTBSTFA, el BSTFA, el diazometano, entre otros.
- Proveer un método robusto y reproducible independiente de las variaciones de la matriz de la muestra.

Algunos métodos clásicos de preparación de muestra siguen en uso hoy en día, como el caso de la extracción líquido-líquido (LLE): efectiva, pero requiere de una labor intensiva, consume gran cantidad de disolventes orgánicos y llega a ser multietapa, representando pérdidas; además genera gran cantidad de residuos representando riesgos tanto para el ambiente como para quien está en contacto con ellos.

Métodos más sencillos como la extracción en fase sólida (SPE) han minimizado los impactos de la LLE: también muy efectiva, consume menos disolventes y hay gran variedad de fases poliméricas disponibles en el mercado para hacer una extracción en particular. Sin embargo, requiere de un proceso de carga, limpieza y elución del analito que si bien se hace en muy poco disolvente, consume tiempo y puede haber pérdidas en cada etapa, aunado a la adsorción de analito en el cartucho de SPE e incluso en la fase polimérica.<sup>38</sup>

#### **2.4.1. Extracción asistida por ultrasonido (UAE) <sup>39-42</sup>**

Un método de preparación de muestras que requiere una muy baja cantidad de disolventes, muy rápida y que puede ser utilizado en conjunto con otros métodos de preparación de muestras, es la extracción asistida por ultrasonido (UAE) fundamentada en la cavitación. En este fenómeno se originan ciclos de alta y baja presión que forman microburbujas que al implotar, erosionan la superficie de la matriz de muestra y lanzan contra ella pequeñas cantidades de disolvente, siendo en este punto cuando se origina la extracción. El fenómeno de cavitación se logra utilizando frecuencias de entre 20-40 KHz, en un rango por encima de la audición humana, por lo que se “escucha” como un sonido agudo.

Como consecuencia de la cavitación la temperatura aumenta hasta 5000 °C y la presión hasta 2000 atm, pero la tasa de enfriamiento después de la implosión es de  $10^{10}$  °C/s.

A diferencia de la típica extracción con ultrasonido que consta de un baño de agua y equipos con potencias de 60 a 100 W, UAE utiliza un procesador ultrasónico que consta de una fuente de energía, un convertidor y una punta, llamada en ocasiones sonda. Este procesador convierte el voltaje en energía eléctrica de alta frecuencia, el convertidor transforma la energía eléctrica en mecánica y finalmente ésta es transmitida al medio de extracción a través de la sonda. La energía que genera un procesador ultrasónico puede superar incluso más de 100 veces a la que genera la extracción con ultrasonido común.

El procedimiento para realizar la UAE es sencillo: la matriz que contiene el analito de interés se coloca en un vaso con el disolvente adecuado y se introduce la punta (sonda) del procesador ultrasónico en el recipiente. Para el control de la temperatura se puede utilizar una parrilla. La amplitud puede ser controlada por botones en el procesador, así como el tiempo de sonicación. Este último suele ser muy corto, inclusive se reportan tiempos de entre 1 y 2 minutos.

#### 2.4.2. Microextracción en fase sólida (SPME) <sup>10,11</sup>

Si hay un método de preparación de muestra que no utiliza disolventes, rápido, sencillo y el cual puede realizar muestreo, extracción, concentración, formación de derivados y acoplable a instrumentos es decir, todo en uno, entonces hablamos de la microextracción en fase sólida (SPME) desarrollada por el Dr. Janusz Pawliszyn y colaboradores en 1989. Consta de una fibra de sílice fundida recubierta de un material adsorbente que es en general un recubrimiento polimérico utilizado para la extracción de compuestos orgánicos volátiles o semivolátiles. La fibra se encuentra en el interior de un tubo hueco de acero inoxidable, de tal forma que ésta puede retraerse y sacarse de su interior quedando así expuesta a la muestra. El tubo en el que está contenida la fibra es semejante a una aguja la cual está contenida en una jeringa (Figura 2.4.2.1).

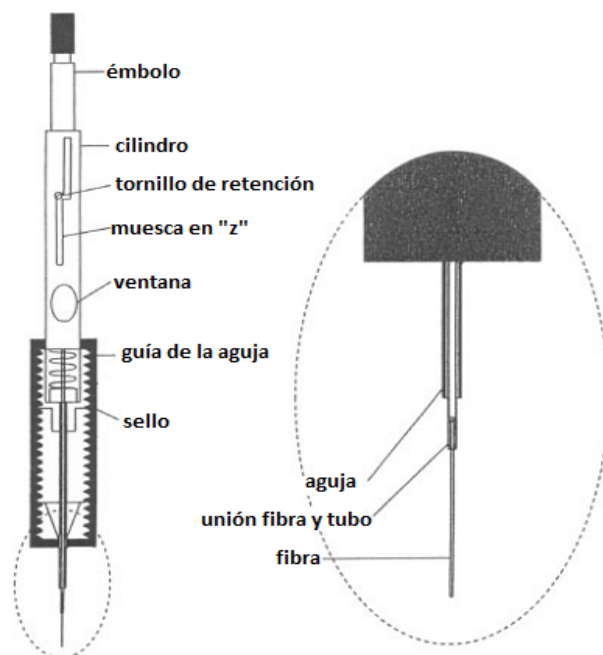


Figura 2.4.2.1. Composición de soporte manual y fibra para SPME.

La SPME se fundamenta en el reparto de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra.

La SPME no realiza una extracción exhaustiva, tiene un máximo de sensibilidad en el equilibrio de reparto de los analitos. En el equilibrio se tiene una relación proporcional entre la cantidad de los analitos adsorbidos en la fibra y la concentración inicial del analito en la matriz de la muestra, por lo que no es necesario un equilibrio completo para el análisis cuantitativo utilizando este método de preparación de muestra.

Hay principalmente dos formas de trabajar con SPME (Figura 2.4.2.2): en modo inmersión y en modo headspace (HS). En el primer caso la fibra es expuesta a la muestra líquida que contiene a los analitos y éstos son concentrados en la fase polimérica. Este modo se utiliza cuando se trabaja con analitos no volátiles. El modo *headspace* consiste en exponer la fibra al espacio que existe entre la muestra líquida y la tapa del vial que la contiene; se utiliza principalmente al trabajar con analitos volátiles los cuales son concentrados en la fibra mientras se desplazan en forma de vapor hacia este espacio de cabeza. Para ambos modos de trabajo, la cinética del proceso de extracción depende de parámetros como son el espesor de la fibra y la agitación del medio. El muestreo en SPME toma sólo algunos minutos.



**Figura 2.4.2.2 Formas de trabajo con SPME: inmersión y headspace.**

Este método de preparación, además de representar un ahorro en tiempo, puede ser acoplado fácilmente a GC y GC-MS por desorción térmica insertando la aguja que contiene la fibra en el inyector del cromatógrafo: al bajar la fibra ésta queda expuesta al flujo del gas acarreador y la temperatura lo que favorece la migración de los analitos hacia la columna del instrumento. Cuando se acopla a HPLC o HPLC-MS la aguja se inserta en una válvula modificada: al bajar la fibra los analitos son eluidos por la fase móvil. En ambos instrumentos la separación y la detección se realizan de la manera convencional.

Las fases poliméricas más utilizadas y las primeras en ser inventadas para SPME son poliacrilato (PA) y polidimetilsiloxano (PDMS), adecuadas para analitos polares y no polares, respectivamente. Posteriormente surgieron las fibras con fases de divinilbenceno (DVB), polietilenglicol (PEG), carboxen (carbón activado, CAR), carbowax (polietilenglicol, CW) y resina templada (TPR), así como las combinadas: PDMS/DVB, CW/TPR, CW/DVB, CAR/PDMS y DVB/CAR/PDMS.

Previo al primer uso de cada fibra o cuando es necesario, éstas deben ser acondicionadas según especificaciones del fabricante. Al ser utilizadas con GC, se introducen al inyector caliente en un tiempo especificado para cada fase (Tabla 2.4.2.1).

**Tabla 2.4.2.1 Especificaciones de las fibras para SPME.<sup>43</sup>**

Fase de la fibra	Espesor de la fase (µm)	Temperatura de acondicionamiento (°C)	Tiempo de acondicionamiento (h)	pH óptimo de trabajo
PDMS/DVB	65	250	0.5	2-10
PA	85	280	1	2-11
CAR/PDMS	75	300	1	2-11
CW/DVB	65	220	0.5	2-9
CW/DVN Stable Flex	70	220	0.5	2-9
PEG	60	240	0.5	2-9



La elección de una fibra dependerá de las propiedades fisicoquímicas del analito o analitos a trabajar. En general, se pueden agrupar como se muestra en la Tabla 2.4.2.2.

**Tabla 2.4.2.2. Fibras de extracción para SPME: Características y usos.**<sup>43</sup>

Fase de la fibra	Espesor de la fase (µm)	Polaridad	Método de recubrimiento	Temperatura máxima de operación (°C)	Instrumentación adecuada	Analitos
PDMS	100	No polar	No enlazado	280	GC/HPLC	Volátiles
PDMS	30	No polar	No enlazado	280	GC/HPLC	Semivolátiles no polares
PDMS	7	No polar	Enlazado	340	GC/HPLC	Semivolátiles polaridad media-no polares
PDMS-DVB	65	Bipolar	Entrecruzado	270	GC	Volátiles polares
PDMS-DVB	60	Bipolar	Entrecruzado	270	HPLC	Uso general
PDMS-DVB	65	Bipolar	Entrecruzado	270	GC	Volátiles polares
PA	85	Polar	Entrecruzado	320	GC/HPLC	Semivolátiles polares (fenoles)
CAR-PDMS	75	Bipolar	Entrecruzado	320	GC	Gases y volátiles
CAR-PDMS	85	Bipolar	Entrecruzado	320	GC	Gases y volátiles
CW-DVB	65	Polar	Entrecruzado	265	GC	Analitos polares (alcoholes)
CW-DVB	70	Polar	Entrecruzado	265	GC	Analitos polares (alcoholes)
TPR	50	Polar	Entrecruzado	240	HPLC	Surfactantes
DVB-PDMS-CAR	50/30	Bipolar	Entrecruzado	270	GC	Fragancias y saborizantes

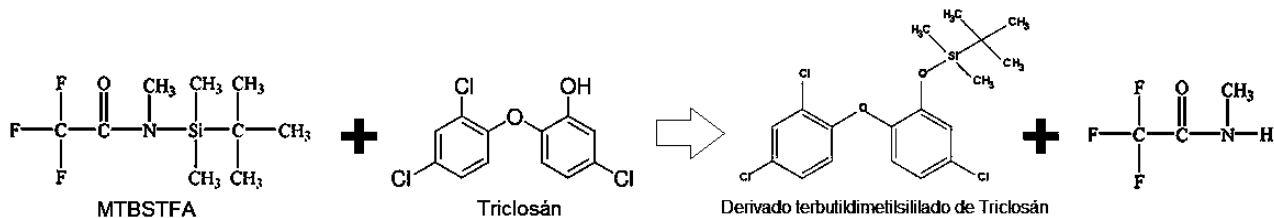
### 2.4.3. Derivatización<sup>44</sup>

En ocasiones, los analitos deben ser convertidos en una forma adecuada para su detección y separación. Un analito que será analizado por GC debe tener principalmente una volatilidad alta y ser termoestable, propiedades que en algunos casos no poseen por lo que es necesario transformarlos para que cubran los requisitos mencionados.

La derivatización es un método de preparación de muestra que transforma químicamente un analito para hacerlo termoestable y volátil, incrementa su selectividad en el proceso cromatográfico y mejora su detección. Es aplicada

principalmente a compuestos polares sustituyendo hidrógenos lábiles por reactivos alquilantes, acilantes o sililantes, siendo estos últimos los más utilizados ya que proceden por una sustitución nucleofílica bimolecular (SN<sub>2</sub>) lo que hace rápida y muy cuantitativa a la derivatización. Además no forman residuos que impliquen una limpieza posterior del derivado.

Dentro de estos agentes derivatizantes podemos distinguir al N-metil-N-(t-butildimetilsilil) trifluoroacetamida (MTBSTFA) ya que al formar derivados terbutildimetilsililados añade átomos de carbono al analito por lo que será mejor detectado, por ejemplo, en un detector de ionización en llama (FID). Se muestra un ejemplo de derivatización en la Figura 2.4.3.1.



**Figura 2.4.3.1. Reacción de derivatización con MTBSTFA**

Este método de preparación de muestra puede acoplarse fácilmente con SPME ya que los analitos extraídos en la fibra pueden exponerse al agente derivatizante en modo headspace y así formar el derivado sobre la misma fibra.

En conjunto, UAE-SPME-Derivatización son importantes métodos de preparación de muestra que nos ayudan a tener al analito extraído de la matriz, concentrado y en una forma tal que podemos continuar con su análisis en un método instrumental cuantitativo como la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

## 2.5. Cromatografía de gases <sup>45,46</sup>

La cromatografía es un método de separación fisicoquímico que consiste en la separación de uno o más analitos entre una fase móvil y una fase estacionaria. Si la fase móvil es un líquido se denomina cromatografía de líquidos; en el caso de la cromatografía de gases la fase móvil es un gas, siendo los más usados helio (He) e hidrógeno (H<sub>2</sub>).

La separación cromatográfica se basa en la distribución de los analitos entre la fase estacionaria (columna) y la fase móvil (gas acarreador), se lleva a cabo por sorción y depende de la afinidad de los analitos por la fase estacionaria y su presión de vapor.

La fase estacionaria se encuentra en las paredes internas de la columna, la composición de esta le otorga una polaridad que va desde la polar, polaridad intermedia y la no polar. El espesor de la fase en el interior de la columna se encuentra entre 0.1-5 µm. Estas columnas trabajan y son acondicionadas en temperaturas que van desde los -60 hasta 320°C, otras incluso pueden trabajar a altas temperaturas (400°C) como en el caso de las separaciones de ácidos grasos o hidrocarburos de alto peso molecular.

Se utilizan gases como fase móvil siendo los más empleados He y H<sub>2</sub> ya que por su bajo peso molecular pueden ser sometidos a mayores velocidades de flujo, proporcionando una buena resolución. Además el H<sub>2</sub> es también el combustible cuando se trabaja con un detector FID.

La GC está limitada a muestras volátiles y termoestables ya que el inyector, el punto principal de entrada de un cromatógrafo de gases, es una parte caliente (200-300 °C) encargada de volatilizar la muestra y dirigirla hacia la columna. El inyector es principalmente usado en 2 modos: split y splitless. En el primer modo sólo una pequeña fracción de la muestra es dirigida hacia la columna y el resto sale por una parte llamada purga; es utilizado principalmente en muestras

relativamente concentradas en las que una porción de la muestra puede arrojar una buena señal cromatográfica.

Se trabaja el modo splitless cuando la muestra contiene al analito en concentración a nivel trazas y en este modo toda la muestra presente en el inyector pasa hacia la columna.

El análisis cuantitativo (y cualitativo al mismo tiempo cuando se tienen sistemas acoplados) se realiza en el detector, encargado de la cuantificación de los analitos que ya fueron separados de la columna. Los más utilizados son el detector de ionización en llama (FID) y el detector de conductividad térmica (TCD).

El detector FID sólo aplica para compuestos que tienen átomos de carbono. Funciona quemando la muestra en una mezcla de  $H_2$  y aire conforme esta sale de la columna, formando iones  $CHO^+$  y electrones, los cuales conducen corriente eléctrica que es detectada y transformada en una señal.

El detector TCD utiliza He y se considera universal, ya que responde a todos los analitos. Cuando el eluato (gas) sale de la columna pasa por un filamento de wolframio-renio y hay una conductividad térmica constante, pero al salir un analito esta conductividad disminuye provocando que el filamento se caliente y aumente su resistencia, lo que provoca una variación de voltaje. Esta variación es medida y transformada en una señal.

### **2.5.1. Sistema acoplado GC-MS <sup>45,46</sup>**

El mejor y más costoso detector para cromatografía de gases es la espectrometría de masas (MS). Este sistema acoplado GC-MS brinda análisis cualitativo y cuantitativo. Consta de una cámara de ionización y un analizador másico. La muestra se introduce en el inyector del sistema cromatográfico acoplado al espectrómetro de masas, el efluente que sale de la columna capilar es ionizado y fragmentado por un bombardeo de electrones en la cámara de ionización (70 eV), los iones son acelerados y dirigidos hacia el analizador másico en donde son separados en función de su relación  $m/z$ .

Este detector puede ser trabajado, entre otros, en dos modos: barrido total de iones (SCAN) y por monitoreo selectivo de iones (SIM). En el modo SCAN se registra la corriente de todos los iones en un intervalo seleccionado de masas. En el modo SIM sólo se registra la corriente de iones de una masa elegida por el usuario.

El perfil de iones obtenido en un espectro de masas es el resultado de la fragmentación de cada analito, esta fragmentación es única para cada analito lo que indica información precisa de su identidad.

### **3. Justificación**

La tendencia actual en la química analítica es la miniaturización de los métodos de preparación de muestra y las técnicas instrumentales con el fin de promover una química verde, que consuman poco disolvente o lo eliminan y preconcentran como es el caso de UAE y SPME, técnicas fácilmente acoplables a GC-MS. Debido al continuo uso de productos de cuidado personal, es necesario desarrollar una metodología que permita la determinación de contaminantes emergentes en organismos acuáticos.

### **4. Objetivos**

#### **4.1. Objetivo general**

- ✓ Proponer una metodología para la determinación de Triclosán en pescado mediante UAE-SPME-GC-MS.

#### **4.2. Objetivos particulares**

- ✓ Desarrollar un método para la determinación de triclosán en pescado.
- ✓ Optimizar parámetros de UAE como: tiempo, temperatura y disolventes empleados.
- ✓ Determinar precisión, linealidad del sistema y del método, límites de detección y cuantificación.

## 5. Desarrollo experimental

### 5.1. Materiales

- Vasos de precipitados de 10, 30 y 50 mL
- Matraces volumétricos de 25, 50 y 100 mL
- Barras magnéticas de 10 x 3 mm
- Espátulas de cromo-níquel
- Tubos de ensayo
- Pipetas volumétricas de 4, 5 y 10 mL
- Matraces Kitasato de 50 y 100 mL
- Embudo Buchner
- Viales de 11 mL con tapón horadado de polipropileno y septas de PTFE (politetrafluoroetileno)
- Membranas de nylon para filtración de 0.45  $\mu\text{m}$  marca Phenomenex.
- Fibra de Poliacrilato para microextracción en fase sólida SPME-PA (85  $\mu\text{m}$ ) con soporte manual de Supelco EUA
- Soporte universal
- Pinzas de tres dedos con nuez
- Viales de vidrio color ámbar de 4 mL con tapón horadado
- Pipetas Pasteur plásticas y de vidrio
- Jeringas Hamilton de vidrio de 10, 50, 100 y 250  $\mu\text{L}$

### 5.2. Equipos

- Parrilla de calentamiento con agitación Cole-Palmer modelo 04644-Series
- Balanza analítica Sartorius modelo CP124S
- Potenciómetro OAKTON modelo pH 510
- Procesador ultrasónico con sonda Cole-Parmer modelo 04714-52
- Baño de agua Thermo Scientific series 280
- Centrífuga International Clinical

- Liofilizadora HetoDrywinner DW 1.0-110
- Picadora Moulinex modelo DPA 139 capacidad 300 g.
- Rotavapor Büchi modelo KRvr 65/45
- Bomba de vacío Büchi modelo V-700
- Sistema purificador y desionizador de agua Thermolyne Nanopure Barnstead modelo 04747.

### 5.3. Reactivos y estándares

Agua desmineralizada, metanol 99.5% pureza J.T Baker Alemania, acetona Q.P ALVI México, acetona R.A EMD EUA, acetato de etilo 99.9% pureza J.T Baker Alemania, hexano HPLC EMD EUA, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 98.5% pureza Merck Alemania, HCl 37.2% pureza J.T Baker Alemania, diclorometano 99.9% pureza J.T Baker Alemania.

Estándar Irgasán (Triclosán) 97% pureza Fluka Sigma Aldrich EUA. Agente derivatizante N-tert-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) 97% pureza Sigma-Aldrich EUA.

Disoluciones estándar de triclosán en metanol de 10 y 2 mg/L. A partir de estas disoluciones se obtuvieron las disoluciones de trabajo, manteniéndose en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

### 5.4. Condiciones Cromatográficas

Cromatógrafo de gases Agilent serie 6890N equipado con un detector selectivo de masas Agilent 5973. Columna capilar de sílice fundida ZB-5 Zebrón Phenomenex, 5% fenil 95% polidimetilsiloxano (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) con inyector split/splitless en modo splitless (1 min). El gas acarreador fue Helio a flujo constante de 1 mL/min. La temperatura de la fuente de ionización fue 230 °C con energía de 70 eV, la temperatura del cuadrupolo 150 °C y la línea de transferencia 280 °C. Programa de temperatura: temperatura inicial 100 °C durante 1 min,



después se incrementó a 7 °C/min hasta 300 °C manteniéndose así durante 10 min. El análisis se hizo por impacto electrónico a 70 eV utilizando el modo SCAN. Para la optimización de los parámetros evaluados en la UAE (tiempo, disolvente y temperatura de extracción) así como la identificación del analito en las muestras de pescado fresco se realizó en modo SIM. El software de adquisición de datos fue MSD ChemStation versión D.00.00.38 de Agilent Technologies.

### **5.5. Muestras de pescado**

Durante el desarrollo de esta metodología se utilizaron muestras de filete de pescado fresco “Tilapia” adquiridas en un supermercado de la Ciudad de México y en el mercado pesquero de La Nueva Viga.

### **5.6. Tratamiento previo a la muestra**

El filete de pescado fresco “Tilapia” de aproximadamente 100 g se homogeneizó en una picadora de carne Moulinex y se transfirió a dos bolsas de cierre hermético. Bajo condiciones de refrigeración a 4°C el pescado tuvo una vida útil promedio de 5 días; manteniéndose congelado a -20°C la vida útil promedio del mismo fue de 12 días.

### **5.7. Determinación del contenido de grasa total**

Con el fin de conocer el contenido lipídico en “Tilapia”, éste fue determinado en una muestra del pescado ya que se sabe que en una matriz con bajo contenido de grasa habrá menor presencia de interferentes al realizar el análisis cromatográfico. Previo al análisis fue necesario liofilizar filete de pescado, utilizando nitrógeno líquido y a presión de vacío en la liofilizadora por 19 horas.

#### **5.7.1. Extracción Soxhlet**

Por triplicado, se pesaron 1.3 g de pescado liofilizado y se colocaron en un cartucho de papel filtro para extraer el contenido graso empleando un equipo de extracción Soxhlet, utilizando 55 mL de una mezcla hexano-diclorometano (1:1) como disolvente de extracción durante 16 horas. Concluido el tiempo de

extracción, el disolvente se evaporó a sequedad en rotavapor y por diferencia de peso se determinó el porcentaje de grasa, referido al peso de pescado húmedo.

### 5.7.2. UAE

Por triplicado, se colocaron 0.5 g de pescado liofilizado en un vaso de precipitados de 50 mL y se agregaron 30 mL de una mezcla hexano-diclorometano (1:1). El contenido de este vaso se sometió a UAE por 15 min al 60 % de la potencia del procesador ultrasónico.

Posteriormente se centrifugó por 10 min a 3600 rpm. El sobrenadante se filtró a través de membrana de nylon 0.45  $\mu\text{m}$  y el filtrado se transfirió cuantitativamente a un matraz de bola de 50 mL. El disolvente se evaporó a sequedad en un rotavapor y por diferencia de peso se determinó el contenido de grasa referido al peso de pescado húmedo.

### 5.8. Identificación de TCS por GC-MS

Debido a que el TCS no es un analito volátil fue necesario formar el derivado terbutildimetilsililado (TBDMS) con MTBSTFA por lo que se preparó una disolución de TCS [100 ng/mL] para obtener su tiempo de retención y su espectro de masas en modo SCAN. En la Figura 5.8.1 se muestran las condiciones de formación del derivado TBDMS del TCS así como su estructura.

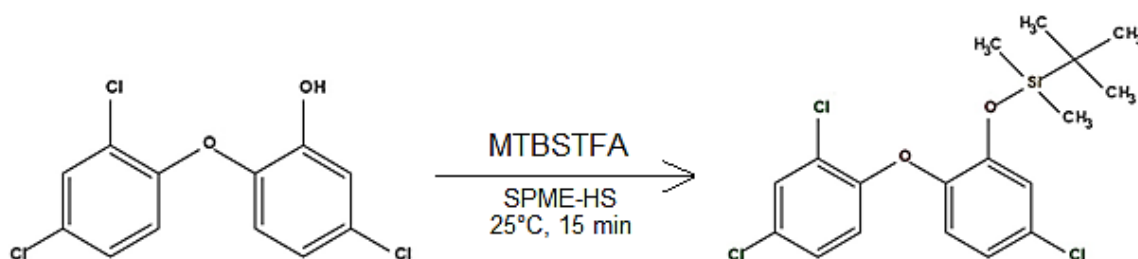


Figura 5.8.1. Formación del derivado TBDMS del TCS con MTBSTFA

### 5.9. Metodología para la determinación de TCS en pescado

El estudio de TCS en pescado requirió añadir el analito en concentraciones conocidas a la muestra con el fin de comprender el comportamiento de éste en presencia de la matriz; al mismo tiempo fue necesario aislarlo de la misma en el disolvente adecuado y a través de métodos de preparación de muestra disponer de él en la forma conveniente para su análisis instrumental.

Por lo anterior, se desarrolló la siguiente metodología en la que fueron retomadas algunas condiciones de trabajo ya conocidas por estudios previos.<sup>6,15,17,47</sup>

**Fortificación de pescado.** Se pesó 1.0 g de pescado fresco picado en la picadora Moulinex, se colocó en un vaso de precipitados de 10 mL y se fortificó durante 60 min con 250 µL de triclosán en metanol a 400 ng/mL. Al término de la fortificación el disolvente se evaporó a sequedad bajo flujo de nitrógeno en baño María a 30 °C.

**UAE.** En un vaso de precipitados de 50 mL se colocaron 0.25 g de pescado fortificado, se agregaron 25 mL de una mezcla agua-metanol (95:5) y se sometió a UAE a 30°C por 15 min al 60% de la potencia del procesador ultrasónico. Enseguida, la solución se centrifugó por 10 min a 3600 rpm y el sobrenadante se filtró a través de membrana de nylon 0.45 µm utilizando vacío. El filtrado obtenido se ajustó a pH 3 con HCl (0.1 M) y 8 mL de éste se colocaron en un vial de 11 mL de capacidad, se introdujo una barra de agitación magnética y se selló con cinta teflón y tapón horadado con septa de PTFE. Esta disolución se puso en equilibrio durante 5 min con agitación constante a 1200 rpm y temperatura ambiente.

**SPME-GC-MS.** Previo al análisis, la fibra fue acondicionada de acuerdo a las especificaciones del proveedor y un blanco de fibra se realizó antes de cada extracción exponiendo la fibra en el inyector del GC-MS. Posteriormente se colocó la fibra de SPME-PA en modo de inmersión y se realizó la extracción durante 30 min a 25°C y 1200 rpm. Al cabo de este tiempo se retrajo la fibra y se transfirió a un vial color ámbar de 4 mL de capacidad conteniendo 100 µL del derivatizante

MTBSTFA y se colocó la fibra en modo headspace a temperatura ambiente durante 15 min para obtener el derivado de triclosán terbutildimetilsililado. Finalmente, la fibra se desorbió durante 10 min en el inyector del GC-MS-SIM.

### 5.10. Optimización de la UAE

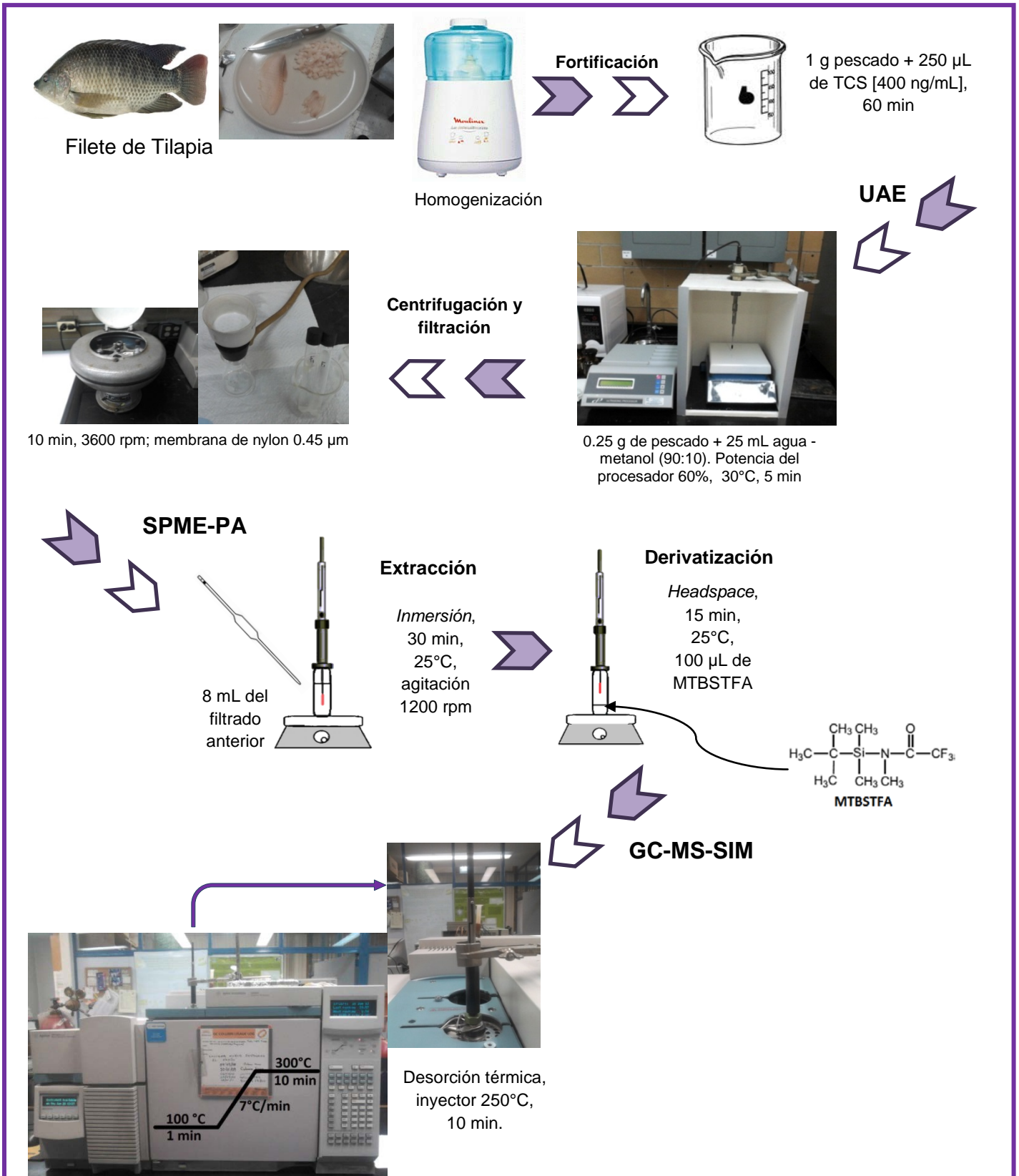
Para la extracción de triclosán mediante UAE se optimizaron los siguientes parámetros: tiempo, disolvente y temperatura de extracción. Se utilizó un diseño de experimentos factorial  $2^3$  en el cual se evaluaron tres variables en 2 niveles como se muestra en la Tabla 5.10.1.

**Tabla 5.10.1. Diseño de experimentos factorial  $2^3$  con las variables a optimizar.**

tiempo (min)	Temperatura (°C)	Disolvente
5	30	agua
5	30	agua: metanol (95:5)
5	40	agua
5	40	agua: metanol (95:5)
15	30	agua
15	30	agua: metanol (95:5)
15	40	agua
15	40	agua: metanol (95:5)

Para evaluar este diseño de experimentos se utilizó pescado fortificado a 100 ng/g siguiendo la metodología descrita en el inciso 5.9. Cada punto del diseño de experimentos se evaluó por duplicado.

## 5.11. Diagrama analítico propuesto para la determinación de TCS en pescado.



### **5.12. Blanco de pescado**

Se analizó pescado sin fortificar siguiendo la metodología descrita en el inciso 5.11 esto es, sin agregar el TCS al pescado.

Una vez establecida la metodología, se procedió a la validación evaluando repetibilidad, linealidad del sistema y linealidad del método.

### **5.13. Repetibilidad del sistema**

Se evaluó la repetibilidad con un estándar de TCS en concentración igual a la fortificación de pescado a 100 ng/g partiendo de un estándar de TCS a 400 ng/mL. La repetibilidad se evaluó por triplicado.

### **5.14. Linealidad del sistema**

Se preparó una serie de 5 disoluciones estándar de TCS a concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 ng/mL en concentraciones equivalentes a las fortificaciones de pescado a 50, 100, 150, 200 y 250 ng/g. Cada punto de esta curva se evaluó por duplicado.

### **5.15. Repetibilidad del método**

Utilizando la metodología optimizada, se analizaron 3 muestras independientes de pescado fortificado a una concentración de 100 ng/mL.

### **5.16. Linealidad del método**

Se preparó una curva de calibración, fortificando pescado a concentraciones de 50, 100, 150, 200 y 250 ng/g. Cada punto de esta curva se evaluó por duplicado.

## 6. Resultados y análisis de resultados

### 6.1. Determinación del contenido de grasa total

Se determinó el contenido graso en el pescado realizando el análisis por triplicado. Para la extracción Soxhlet se obtuvo un porcentaje de grasa total (referida al peso de pescado húmedo) de  $1.43 \pm 0.25$  % y CV de 17 %; en el caso de UAE se obtuvo un porcentaje de grasa total de  $1.11 \pm 0.06$  % con un CV de 5 % (también referida al peso de pescado húmedo).

Para demostrar que los promedios de ambas técnicas son estadísticamente iguales, se utilizó *t de Student* con un valor del estadístico para 2 grados de libertad (n-1) de 4.303 y  $\alpha=0.025$ ; siendo  $H_0: \mu_1 = \mu_2$  y  $H_1: \mu_1 \neq \mu_2$

$$t_c = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}} = \frac{1.43 - 1.11}{\sqrt{\frac{(0.25)^2}{3} + \frac{(0.06)^2}{3}}} = 2.19 < 4.303$$

Por lo que se acepta  $H_0: \mu_1 = \mu_2$  demostrando que los métodos arrojan un valor promedio estadísticamente equivalente, con un 95% de confianza.

Un parámetro más que se evaluó fue la equivalencia entre las varianzas de las dos técnicas mediante *F de Fisher* con un valor del estadístico para 2 grados de libertad en el numerador y denominador (n-1/n-1) de 19.00 y  $\alpha=0.05$ ; siendo  $H_0: S_1^2 = S_2^2$  y  $H_1: S_1^2 > S_2^2$

$$F_c = \frac{S_1^2}{S_2^2} = \frac{(0.25)^2}{(0.06)^2} = 17.36 < 19.00$$

Por lo que se acepta  $H_0: S_1^2 = S_2^2$  demostrando que ambos métodos tienen una varianza estadísticamente equivalente, al 95% de confianza.

Si bien el método Soxhlet es el más utilizado en la determinación de grasa total, estos resultados demuestran que puede ser sustituido por UAE arrojando resultados equivalentes y ofreciendo además ventajas sobre el método clásico como son: menor tiempo de extracción lo que representa un significativo ahorro en energía ya que no es necesario suministrar calor al medio para realizar la extracción; cantidad de muestra menor por lo tanto menor costo en liofilización;

menor consumo de disolventes y por lo tanto amigable con el medio ambiente. Además disminuye considerablemente los riesgos que la extracción Soxhlet conlleva a quien la utiliza: exposición prolongada a solventes y acumulación de vapores en el medio que pueden generar una atmósfera altamente inflamable.

El bajo contenido graso determinado en el pescado tendrá un impacto positivo en el desarrollo de la metodología ya que habrá poca presencia de interferentes que ocasionen que el TCS coeluya con alguna interferencia e impida la correcta cuantificación del analito.

## 6.2. Identificación de TCS por GC-MS

Previo a la determinación de TCS en pescado se identificó por GC-MS al derivado TBDMS empleando un estándar de TCS [100 ng/L]. En la Figura 6.2.1 se muestra el cromatograma iónico total del derivado TBDMS del TCS con un tiempo de retención de 23.13 min. La Figura 6.2.2 presenta el espectro de masas obtenido por barrido total (SCAN) del derivado de TCS en el cual el pico a  $m/z$  345 corresponde a la pérdida del terbutilo ( $m/z$   $[M-57]^+$ ); al tratarse de un compuesto que contiene tres cloros observamos la isotopía característica de  $[M-57]^+$  en  $[[M-57]+2]^+$  ( $m/z$  347), en  $[[M-57]+4]^+$  ( $m/z$  349) y en  $[[M-57]+6]^+$  ( $m/z$  351). El ión molecular de relación  $m/z$  402 no se observa.

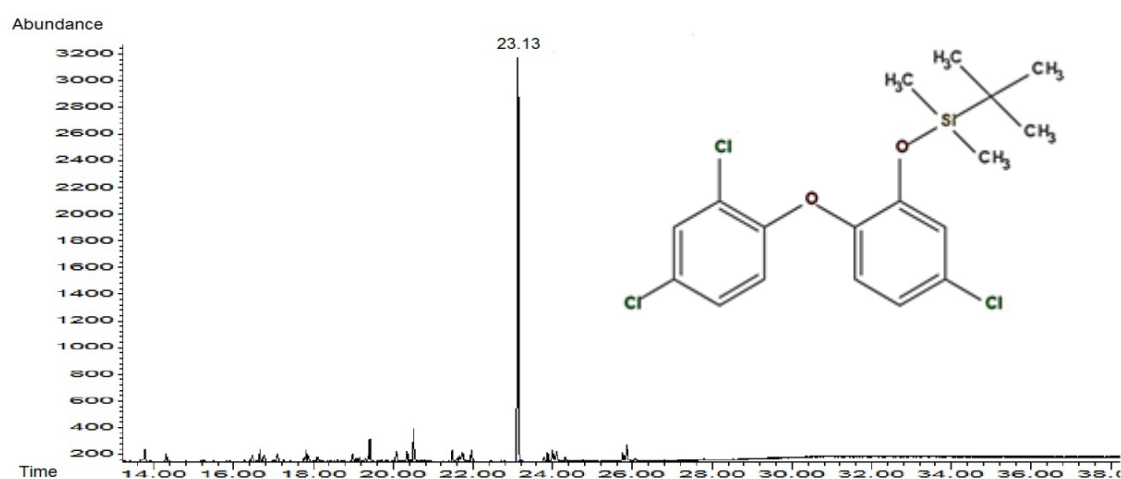


Figura 6.2.1. Cromatograma iónico total del derivado TBDMS de triclosán.



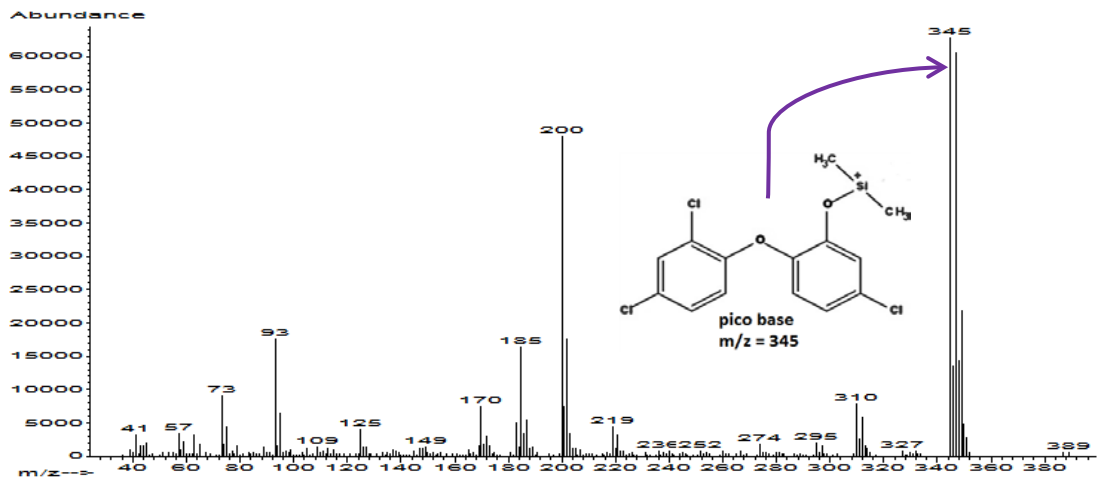


Figura 6.2.2. Espectro de masas del derivado TBDMS de triclosán.

### 6.3. Optimización de la UAE

Utilizando un diseño de experimentos factorial  $2^3$  (evaluación de tres variables en dos niveles de tratamiento) se determinaron las condiciones óptimas de UAE. Utilizando el software estadístico StatGraphics Centurion versión XV se obtuvieron los Diagramas de Pareto y de Efectos Principales donde es posible ver de manera gráfica las variables que influyen en la obtención de la respuesta cromatográfica (área) que a su vez representa la extracción o recuperación del analito.

El diagrama de Pareto (Figura 6.3.1) nos muestra en orden decreciente de importancia las causas que influyen en la obtención de la respuesta. Si bien ninguna de las variables es estadísticamente significativa se observa que el disolvente y la interacción tiempo-disolvente son las variables que más influyen en el incremento del área cromatográfica.

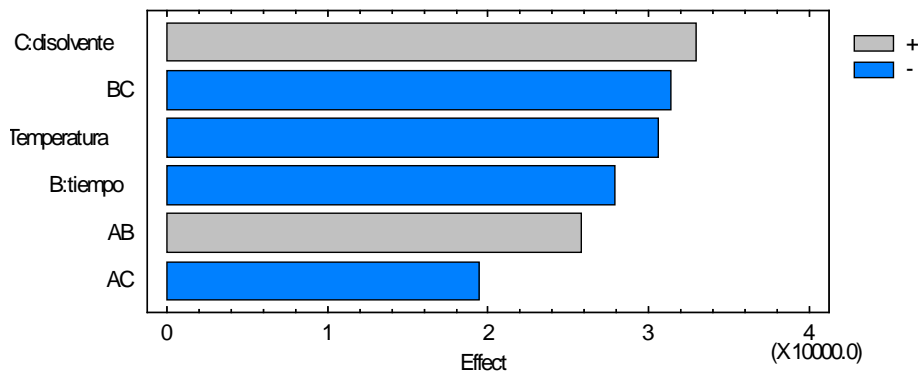
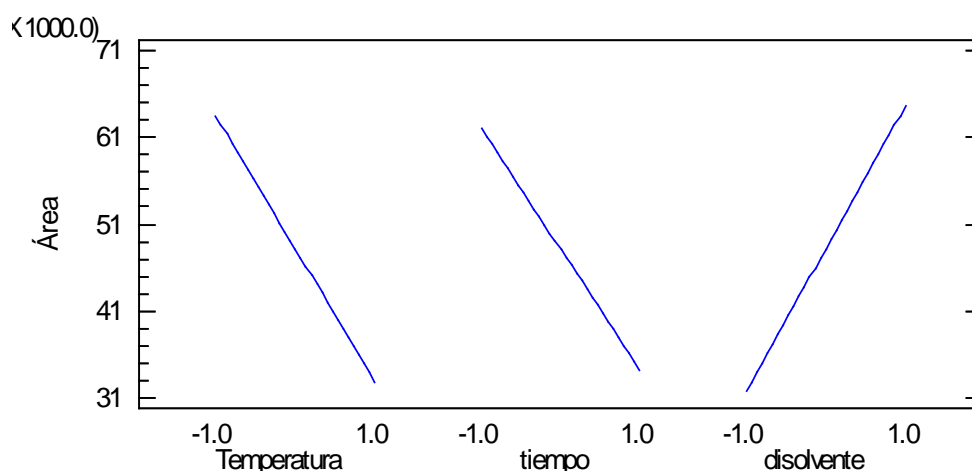


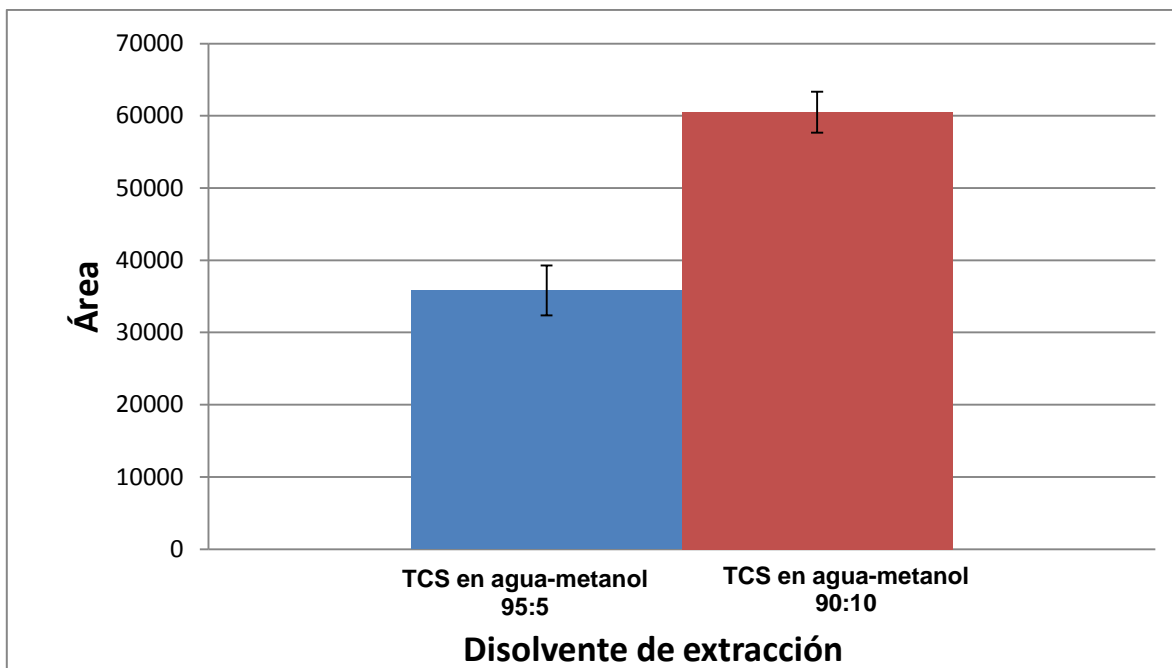
Figura 6.3.1. Diagrama de Pareto de las variables principales y sus interacciones.

El gráfico de Efectos Principales (Figura 6.3.2) es una forma visual de conocer el impacto de los niveles de tratamiento en las variables estudiadas e inclusive elegir las óptimas. Este gráfico indica por ejemplo, que para el tiempo se obtendrá mayor respuesta (área) si se utiliza el nivel bajo del mismo (5 minutos). En el caso del disolvente, por ejemplo, este gráfico indica que se obtendrá una mayor respuesta de área si se utiliza el nivel alto, esto es agua-metanol 95:5 en lugar de sólo agua. En el caso de la temperatura, a partir de este gráfico es posible concluir que se obtendrá mayor respuesta si se utiliza el valor bajo de temperatura, esto es, 30°C.



**Figura 6.3.2. Diagrama de efectos principales para las variables estudiadas.**

Se concluyó a partir de los gráficos anteriores que el parámetro que más influye en la extracción es el disolvente y el tiempo de UAE. Cuando hubo presencia de metanol la respuesta fue mayor, por lo que se incrementó la proporción de metanol en la mezcla de extracción para corroborar este hallazgo. Se muestran los resultados en la Figura 6.3.3.

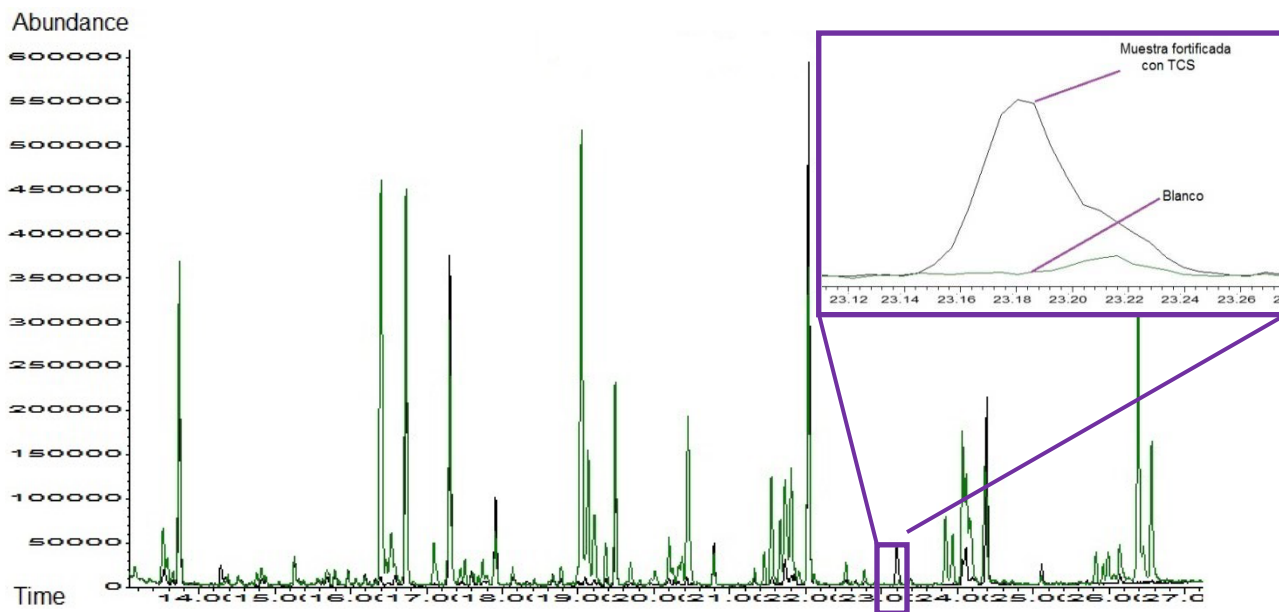


**Figura 6.3.3. Efecto de la composición de la mezcla del disolvente de extracción de TCS por UAE.**

Ya que la señal que se obtiene utilizando mayor cantidad de metanol en la mezcla de extracción es aproximadamente el doble, se decidió que la mezcla para UAE tendría una composición de agua-metanol 90:10. Además se eligió como tiempo de extracción 5 min y una temperatura de 30 °C.

#### 6.4. Blanco de pescado

Se aplicó la metodología a un blanco para corroborar la ausencia de TCS en el pescado. Se obtuvo el cromatograma iónico total que se muestra en la Figura 6.4.1.



**Figura 6.4.1. Cromatograma iónico total (TIC) que compara las áreas obtenidas en el blanco de pescado (en verde) y una muestra fortificada con TCS (en negro).**

A partir de este cromatograma se concluye que el TCS no se encuentra en el blanco de pescado, ya que no se observa señal en el tiempo de retención del analito (23.17 min). Esto es confirmado en el espectro de masas donde los iones  $m/z$  200, 345 y 347 característicos del TCS, no se observan (Figura 6.4.2).



**6.4.2. Espectro de masas en modo SCAN del blanco de pescado en el tiempo de retención del TCS (23.17 min).**

**6.5. Repetibilidad del sistema**

Se evaluó la repetibilidad utilizando un estándar en concentración igual a la equivalente a una fortificación de triclosán en pescado [100 ng/g]. El cálculo teórico es el siguiente:

Si se tomaron 250  $\mu$ L de TCS a partir de un estándar [400 ng/mL]

$$\frac{400 \text{ ng de TCS}}{\text{mL}} \times 0.25 \text{ mL} = \frac{100 \text{ ng de TCS}}{1 \text{ g de pescado}} = \frac{100 \text{ ng}}{\text{g}} \text{ fortificación}$$

Si de este pescado fortificado se tomaron 0.25 g para UAE en 25 mL de agua-metanol (90:10):

$$\frac{100 \text{ ng de TCS}}{1 \text{ g de pescado}} \times 0.25 \text{ g de pescado} = \frac{25 \text{ ng de TCS}}{25 \text{ mL de agua: MeOH (90:10)}} = \frac{1 \text{ ng de TCS}}{1 \text{ mL de agua: MeOH (90:10)}}$$

Lo que significa que en el paso de UAE, la concentración de TCS en el medio es de 1 ng/mL.

Una vez que la disolución se centrifugó, filtró y se ajustó el pH, se tomaron 8 mL para extraer con SPME-PA.

$$\frac{1 \text{ ng de TCS}}{1 \text{ mL de agua: MeOH (90:10)}} \times 8 \text{ mL} = 8 \text{ ng de TCS.}$$

Por lo anterior, se preparó una solución estándar de TCS [1 ng/mL] y se ajustó a pH=3. Se tomaron 8 mL para SPME-PA, se derivatizó con MTBSTFA y finalmente se desorbió en GC-MS-SIM. Este experimento se realizó por triplicado y se obtuvo un área promedio para n=3 de 1000612 unidades con una DE=43012 y un CV de 4.8 %.

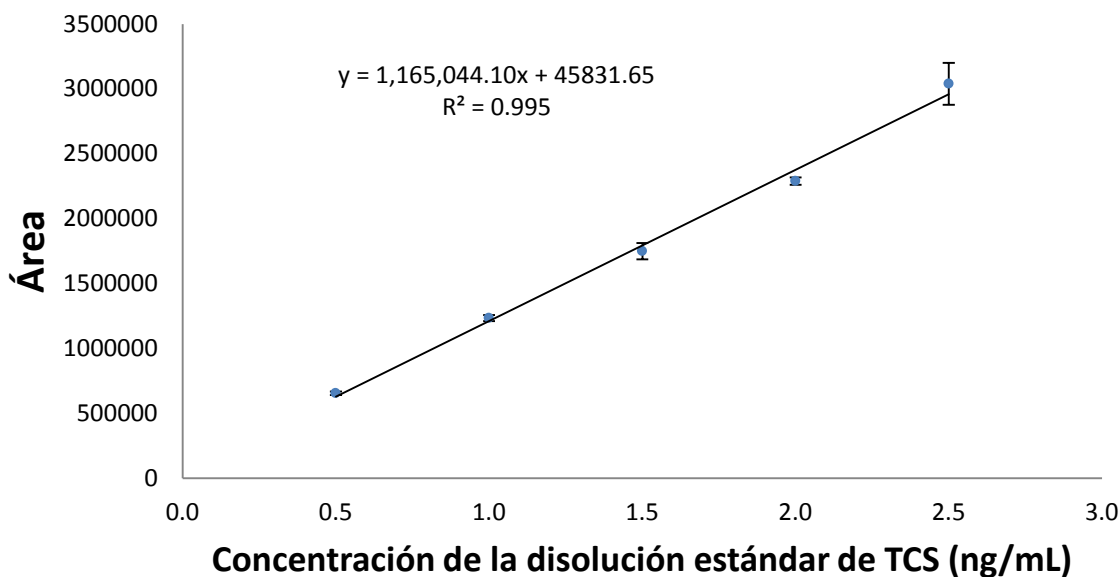
Se demuestra que pese a tener TCS en una concentración muy baja, se logró su identificación con una precisión aceptable por lo que se concluye que el instrumento puede cuantificar al analito en bajas concentraciones.

## 6.6. Linealidad del sistema

Se preparó una serie de 5 disoluciones estándar de TCS a concentraciones de 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 ng/mL en concentraciones equivalentes a las fortificaciones de pescado a 50, 100, 150, 200 y 250 ng/g (ver cálculo teórico en inciso 6.5). Cada punto de esta curva se evaluó por duplicado, se calculó el área promedio, la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (% CV) de las áreas obtenidas. Los resultados se muestran en la Tabla 6.6.1 y la Figura 6.6.1.

**Tabla 6.6.1. Resultados obtenidos de la linealidad del sistema.**

Punto	Concentración (ng/mL)	Área ± DE (n = 2)	%CV
1	0.5	654681±14407	2.2
2	1.0	1233914±23880	1.9
3	1.5	1749258±62957	3.6
4	2.0	2289779±27580	1.2
5	2.5	3039359±160969	5.3



**Figura 6.6.1. Linealidad del sistema.**

Cada punto de esta curva se obtuvo con una precisión de 1-5% por lo que se demuestra con este parámetro que el instrumento no tendrá problema en cuantificar TCS en una serie de concentraciones entre 0.5 a 2.5 ng/mL en forma lineal ya que se obtiene una respuesta (área) directamente proporcional a la concentración del analito.

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) obtenidos para la linealidad del sistema fueron 0.214 y 0.649 ng/mL, respectivamente. Para calcularlos se utilizaron las siguientes fórmulas <sup>48</sup>:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - m \sum xy - b \sum y}{n - 2}}$$

$$LC = \frac{10 S_{y/x}}{m}$$

$$LD = \frac{3.3 S_{y/x}}{m}$$

### **6.7. Repetibilidad del método**

Se evaluó la repetibilidad utilizando pescado fortificado a 100 ng/g. Este experimento se realizó por triplicado y se obtuvo un área promedio para n=3 de 63371 unidades con una DE=5189 y un CV de 8.2 %.

Se demuestra que a esta concentración y en presencia de pescado, se logró la identificación de TCS con una precisión aceptable por lo que se concluye que el instrumento será capaz de cuantificar al analito en bajas concentraciones y se espera que se obtenga una respuesta lineal en concentraciones similares.

### **6.8. Linealidad del método**

Se preparó por duplicado una curva de calibración, fortificando pescado según la metodología del inciso 5.11 en concentraciones de 50, 100, 150, 200 y 250 ng/g sin embargo los resultados no mostraron un comportamiento lineal en la curva de calibración obteniendo un valor de  $R^2 = 0.6369$ .

Probablemente la variación y la no linealidad del método se podría deber a la etapa de fortificación ya que el pescado pudo haber absorbido TCS en una forma no homogénea, lo que impactó en todas las etapas siguientes. Se tomó solución nueva de derivatizante para eliminarlo como causante de lo observado, pero de igual forma se obtuvieron resultados desfavorables. Uno de los puntos de mejora para esta metodología será optimizar la etapa de fortificación del pescado por diseño de experimentos  $2^3$ .



## 7. Conclusiones

1. Se propuso una metodología para la determinación de triclosán en pescado fresco mediante UAE combinada con SPME seguida de GC-MS.
2. Se evaluó la repetibilidad y linealidad del sistema obteniendo un CV de 4.8 % y  $R^2 = 0.995$ , respectivamente. Se obtuvieron bajo estas condiciones los Límites de Detección y Cuantificación con valores de 0.214 y 0.649 ng/mL, respectivamente.
3. Una vez optimizada la etapa de UAE, se evaluó la repetibilidad del método en pescado fortificado a 100 ng/g obteniendo un CV de 8.2 % considerándose ésta una precisión aceptable.
4. Se demostró estadísticamente que se puede utilizar la UAE como alternativa a la extracción por Soxhlet para la determinación de lípidos. El contenido graso que se determinó fue de 1.1-1.5 % y permitió observar mínimos interferentes en el análisis cromatográfico y ninguna interferencia con el triclosán.
5. Se evaluó la linealidad del método pero no se obtuvo un comportamiento lineal. Probablemente la variación en la etapa de fortificación influyó en el resultado, por lo se propone su optimización.
6. La presente propuesta metodológica permite la determinación de TCS en pescado con un bajo contenido en grasa. A diferencia de lo reportado en estudios previos<sup>25-29</sup>, esta metodología utiliza pescado sin previo tratamiento, utiliza solamente agua y metanol para la extracción y en la misma fibra de SPME el analito es extraído, derivatizado y desorbido en un sistema acoplado GC-MS.

## 8. Referencias

1. Xia, K., Bhandari, A., Das, K. & Pillar, G. Occurrence and Fate of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in Biosolids. *Journal of Environment Quality*, **34 (1)**, 91 (2005).
2. Daughton C. G., Thomas A. Ternes, Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change? *Environmental Health Perspectives* **107 (6)**, 907 (1999).
3. United States Environmental Protection Agency (USEPA)  
Contaminants of Emerging Concern including Pharmaceuticals and Personal Care Products  
<https://www.epa.gov/wqc/contaminants-emerging-concern-including-pharmaceuticals-and-personal-care-products>.  
Consultado el 17 de mayo del 2017.
4. Dan. A., Hontela, A., Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action. *Journal of Applied Toxicology* **31(4)**, 285–311 (2011).
5. Products That Contain Triclosan.  
<http://drbenkim.com/articles/triclosan-products.htm>  
Consultado el 17 de enero del 2017
6. Castillo, L.A. Identificación y cuantificación de PPCP's en aguas residuales por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM) (2009). Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México.
7. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA)  
Anuario Estadístico de Acuacultura y Pesca 2013,  
<http://www.gob.mx/conapesca/documentos/anuario-estadistico-de-acuacultura-y-pesca>.  
Consultado el 11 de febrero del 2017.

8. Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca (CONAPESCA).  
Guía Empresarial para el Cultivo, Engorda y Comercialización de la Tilapia (Mojarra).  
<http://www.gob.mx/conapesca/documentos/bibliografia-pesquera-y-acuicola>.  
Consultado el 11 de febrero del 2017.
9. Nutrición y Alimentación de Tilapia Cultivada en América Latina y el Caribe.  
[http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion\\_acuicola/IV/archivos/8toledo.pdf](http://www.uanl.mx/utilerias/nutricion_acuicola/IV/archivos/8toledo.pdf)  
Consultado el 14 de febrero del 2017
10. Pawliszyn, Janusz, *Solid Phase Microextraction: Theory and practice*, Wiley-VCH Inc., New York. Capítulos 1-5, (1997).
11. Vas, G. & Vékey, K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, **39 (3)**, 233–254 (2004).
12. El agua ¿Qué es?  
<http://www.agua.org.mx/el-agua/que-es>  
Consultada el 17 de abril del 2017.
13. Agua en México  
<http://www.agua.org.mx/el-agua/agua-en-mexico>.  
Consultada el 17 de abril del 2017.
14. El agua. Datos y cifras.  
<http://www.agua.org.mx/el-agua/agua-en-mexico/datosycifrasaguaenmexico>  
Consultada el 17 de abril del 2017.
15. Fernández, F. Desarrollo de un método para la determinación de contaminantes emergentes en matrices vegetales utilizando extracción con barra magnética (SBSE) seguido de cromatografía de gases-espectrometría de masas. (2012). Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México.

16. Comisión Nacional del Agua (CONAGUA)  
Situación del Subsector Agua Potable, Drenaje y Saneamiento, Edición 2016.  
[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/184667/DSAPAS\\_2016\\_w eb\\_Parte1.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/184667/DSAPAS_2016_w eb_Parte1.pdf)  
Consultada el 17 de abril del 2017.
17. Badillo, S.J. Identificación y cuantificación de fármacos en aguas residuales de la Ciudad de México por microextracción en fase sólida cromatografía de gases espectrometría de masas (MEFS-CG-EM) (2010). Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México.
18. Tratamiento de aguas  
<https://www.tratamientodeaguas.org.mx>  
Consultada el 17 de abril del 2017.
19. New York City Department of Environmental Protection  
New York City's Wastewater Treatment System  
<http://www.nyc.gov/html/dep/pdf/wssystem.pdf>  
Consultada el 17 de abril del 2017.
20. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)  
Tratamiento de aguas residuales  
<http://www.fao.org/docrep/t0551e/t0551e05.htm>.  
Consultada el 17 de abril del 2017.
21. Comisión Nacional del Agua (CONAGUA)  
Normas Oficiales Mexicanas NOM-001-SEMARNAT-1996, NOM-002-SEMARNAT-1996, NOM-003-SEMARNAT-1997  
<http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Publicaciones/Publicaciones/SG AA-15-13.pdf>  
Consultada el 17 de abril del 2017

22. Mailler, R. *et al.* Removal of a wide range of emerging pollutants from wastewater treatment plant discharges by micro-grain activated carbon in fluidized bed as tertiary treatment at large pilot scale. *Science of The Total Environment* **542, Part A**, 983–996 (2016).
23. Saleh, S., Haddadin, R. n. s., Baillie, S. & Collier, P. j. Triclosan – an update. *Letters in Applied Microbiology* **52 (2)**, 87–95 (2011).
24. United States Environmental Protection Agency (USEPA)  
Estatus de registro de pesticidas.  
<https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/html/status.html>  
Consultada el 21 de abril del 2017.
25. Singer, H., Müller, S., Tixier, C. & Pillonel, L. Triclosan: Occurrence and Fate of a Widely Used Biocide in the Aquatic Environment: Field Measurements in Wastewater Treatment Plants, Surface Waters, and Lake Sediments. *Environmental Science Technology*, **36 (23)**, 4998–5004 (2002).
26. Lozano, N., Rice, C. P., Ramirez, M. & Torrents, A. Fate of Triclocarban, Triclosan and Methyltriclosan during wastewater and biosolids treatment processes. *Water Research* **47 (13)**, 4519–4527 (2013).
27. Ying, G.-G. & Kookana, R. S. Triclosan in wastewaters and biosolids from Australian wastewater treatment plants. *Environment International*, **33 (2)**, 199–205 (2007).
28. Mottaleb, M. A. *et al.* Gas chromatography–mass spectrometry screening methods for select UV filters, synthetic musks, alkylphenols, an antimicrobial agent, and an insect repellent in fish. *Journal of Chromatography A*, **1216 (5)**, 815–823 (2009).
29. Cueva-Mestanza, R., Torres-Padrón, M. E., Sosa-Ferrera, Z. & Santana-Rodríguez, J. J. Microwave-assisted micellar extraction coupled with solid-phase extraction for preconcentration of pharmaceuticals in molluscs prior to determination by HPLC. *Biomedical Chromatography*, **22 (10)**, 1115–1122 (2008).

30. Canosa, P., Rodríguez, I., Rubí, E., Ramil, M. & Cela, R. Simplified sample preparation method for triclosan and methyltriclosan determination in biota and foodstuff samples. *Journal of Chromatography A* **1188** (2), 132–139 (2008).
31. Wei, X., Huang, Y., Wong, M. H., Giesy, J. P. & Wong, C. K. C. Assessment of risk to humans of bisphenol A in marine and freshwater fish from Pearl River Delta, China. *Chemosphere*, **85** (1), 122–128 (2011).
32. Gibson, R., Durán-Álvarez, J. C., Estrada, K. L., Chávez, A. & Jiménez, B. Accumulation and leaching potential of some pharmaceuticals and potential endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley, Mexico. *Chemosphere*, **81** (11), 1437–1445 (2010).
33. Contardo-Jara, V. *et al.* Exposure to human pharmaceuticals Carbamazepine, Ibuprofen and Bezafibrate causes molecular effects in *Dreissenapolyomorpha*. *Aquatic Toxicology*, **105** (3-4), 428–437 (2011).
34. Hontela, A. & Habibi, H. R. in *Fish Physiology* (ed. Keith B. Tierney, A. P. F. and C. J. B.), **33**, 411–437 (Academic Press, 2013).
35. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO)  
Acuicultura  
<http://www.fao.org/aquaculture/es/>  
Consultada el 17 de Febrero del 2017
36. Comisión Nacional de Acuicultura y Pesca (CONAPESCA)  
Guía para el cultivo de tilapia *Oreochromis* spp. (Gunter, 1984)  
<http://www.gob.mx/conapesca/documentos/bibliografia-pesquera-y-acuicola>  
Consultada el 17 de mayo del 2017.
37. México: Centro Acuícola de Jalapa del Marqués  
<http://www.aquahoy.com/component/content/article?id=5577:mexico-centro-acuicola-de-jalapa-del-marques>  
Consultada el 26 de febrero del 2017

38. Smith, R. M. Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A*, **1000 (1-2)**, 3–27 (2003).
39. Moreta, C. & Tena, M. T. Determination of UV filters in packaging by focused ultrasonic solid–liquid extraction and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1218 (21)**, 3392–3399 (2011).
40. Bizkarguenaga, E. *et al.* Focused ultrasound assisted extraction for the determination of PBDEs in vegetables and amended soil. *Talanta*, **119**, 53–59 (2014).
41. Navarro, P., Etxebarria, N. & Arana, G. Development of a focused ultrasonic-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine sediment and mussel samples. *Analytica Chimica Acta*, **648 (2)**, 178–182 (2009).
42. Catálogo de Procesadores Ultrasónicos Cole-Parmer  
<https://www.coleparmer.com/c/ultrasonic-processors>  
Consultada el 26 de febrero del 2017
43. Solid Phase Microextraction (SPME)  
<http://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/analytical-products.html?TablePage=9644384>
44. McMurry John, *Química Orgánica*, Cengage Learning, 8ª Ed. Capítulos 10 y 11 (2012).
45. Harris D., *Análisis químico cuantitativo*. Ed. Reverté, 3ª edición, España. Capítulos 23 y 24 (2007).
46. Skoog D. A., Holler F. J., *Principios de análisis instrumental*, Cengage Learning, 6ª edición. Capítulos 26 y 27 (2008).
47. Alvarado, L.A. Determinación de capsaicina y dihidrocapsaicina en chiles por extracción asistida con ultrasonido seguida de cromatografía de gases-espectrometría de masas (2010). Tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química, México.
48. Guía de Validación de Métodos Analíticos, editada por el Colegio Nacional de QFB's México (2002).