



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES EN PECES POR MICROEXTRACCIÓN EN
FASE SÓLIDA *IN VIVO* SEGUIDA DE CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. IRAN OCAÑA RIOS

TUTORA

DRA. ARACELI PATRICIA PEÑA ALVAREZ
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, MAYO DE 2019



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES EMERGENTES EN PECES POR
MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA *IN VIVO* SEGUIDA DE CROMATOGRAFÍA DE
GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. IRAN OCAÑA RIOS

TUTORA
DRA. ARACELI PATRICIA PEÑA ALVAREZ
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM



Ciudad de México, Mayo de 2019

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Posgrado en Ciencias Químicas y a la Facultad de Química, por darme la oportunidad de formarme como profesional y como persona.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para mis estudios de doctorado (No. Becario: 273473) y la beca mixta para realizar la estancia doctoral en la Universidad de Thompson Rivers.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) por el apoyo otorgado a los proyectos PAPIIT: IN218116 y IN214418, y a la Facultad de Química por el apoyo PAIP: 5000-9026.

A la Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez, por darme la oportunidad de colaborar en este proyecto, por su enseñanza, asesoría, consejos, confianza, paciencia, amistad, dedicación y el gran apoyo que me brindó durante todo el doctorado.

A las Doctoras Violeta Múgica Álvarez y Martha Patricia García Camacho, por formar parte de mi comité tutor y los comentarios realizados para enriquecer mi formación.

A la Bióloga María Elena Loeza Fuentes, por su amistad, consejos, enseñanzas y gran apoyo durante todo mi doctorado.

Al Q. Ignacio Zúñiga Pérez, por el gran apoyo brindado en la para la realización de los análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas.

A la maestra Rocío Juárez por su apoyo, confianza, consejos, enseñanzas y amistad, por siempre escucharme y preocuparse por mi.

A la señora Zen, por su amabilidad, atención y compañía durante los fines de semana de trabajo en el laboratorio.

Al señor Pascual Sánchez y al MVZ José Manuel Cobo y González, por su amabilidad y disponibilidad para proporcionar a las truchas.

Al Dr. Kingsley Donkor de la Universidad de Thompson Rivers (Kamloops, Columbia Británica, Canadá), por su valiosa dirección, asesoría, conocimiento, hospitalidad y el gran apoyo brindado durante la estancia que realicé en su laboratorio.

A Debbie Woodd, por su amistad, confianza, enseñanzas, gran apoyo y por recibirme en su hogar durante mi estancia en Kamloops.

A los miembros del jurado por sus valiosas aportaciones en la revisión de este trabajo.

Esta tesis fue revisada y aprobada por los siguientes sinodales:

Dra. Josefina de Gyves Marciniak

(Presidente del jurado)

Dr. José de Jesús García Valdés

(Vocal)

Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez

(Vocal)

Dra. Violeta Múgica Álvarez

(Vocal)

Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero

(Secretario)

A mi madre Silvia Rios y mi hermana Silvia Iris Ocaña, por ser un pilar fundamental para mi, por su comprensión y aliento, siempre han sido mi apoyo incondicional, motivación, amor e inspiración.

A mi esposo José de Jesús Olmos, por estar siempre a mi lado, por su inmenso apoyo, compañía incondicional y ser el gran amor de mi vida.

A mi familia Virginia Espejel, Camilo Olmos, Tania Olmos, Juan Manuel Luna, Danna y Víctor Luna, por recibirme en su hogar, preocuparse por mi y ser un gran apoyo en esta etapa de mi vida.

A mis tías Teresa, Raquel y Rosa Ocaña, por siempre estar dispuestas a escucharme y ayudarme, gracias por el cariño y apoyo que siempre me han brindado.

A mi abuelita Victoria Muciño y mi tío Benjamín Rios, por su cariño y apoyo.

A mis amigos Félix Araujo, Zaira Castañeda, Cecilia Bobadilla, Pilar Espinosa, Alejandra Millán, por su amistad, apoyo y confianza a pesar de estar a kilómetros de distancia.

A mis amigos del Posgrado Ana Heredia, Jerónimo Cabrera, Humberto Gómez, Vicente Esquivel, Fernanda Rosas por su amistad y las experiencias compartidas, los estimo y les agradezco su apoyo en los buenos y malos momentos.

Esta tesis fue realizada bajo la dirección de la

Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez

En el departamento de Química Analítica, laboratorio 101 del edificio B de la
Facultad de Química, UNAM.

TUTORA

Dra. Araceli Peña Alvarez

SUSTENTANTE

M. en C. Iran Ocaña Rios

PRODUCTOS DE LA INVESTIGACIÓN

Publicaciones

Iran Ocaña-Rios, Araceli Peña-Alvarez, Elena Loeza-Fuentes, Ignacio Zuñiga-Perez. Determination of personal care products in fish tissue based on matrix solid-phase dispersion combined with programmable split/splitless injector gas chromatography-mass spectrometry. *Food Analytical Methods*, 11 (2018) 2272-2279. DOI: 10.1007/s12161-018-1206-1

Iran Ocaña-Rios, Araceli Peña-Alvarez, Ignacio Zuñiga-Perez, Elena Loeza-Fuentes. Trace analysis of UV filters and musks in living fish by *in vivo* SPME-GC-MS. *Journal of Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (2019). DOI: 10.1007/s00216-019-01791-5

Congresos

VI Congreso iberoamericano de Química Analítica y Encuentro Nacional de Química Ambiental, realizado del 15 al 18 de noviembre de 2016 en Cancún, México. Título del trabajo “ESTUDIO *IN VIVO* DE CONTAMINANTES EMERGENTES EN PECES POR MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA”.

19th International Symposium on Advances in Extraction Technologies, realizado del 27 al 30 de junio de 2017 en la ciudad de Santiago de Compostela, España. Título del trabajo “*IN VIVO* STUDY OF PERSONAL CARE PRODUCTS IN FISH BY SPME”.

XXII Congreso Nacional de Química Analítica, que se realizará del 10 al 14 de junio de 2019 en la ciudad de San Luis Potosí, México. Título del trabajo “ANÁLISIS DE FILTROS UV Y ALMIZCLES EN TRUCHA Y TILAPIA UTILIZANDO *IN VIVO* SPME-GC-MS”.

Abreviaturas	1
Abstract	2
Resumen	3
Introducción	4
Hipótesis	6
Objetivos	7
1. Antecedentes	8
1.1. Contaminantes emergentes	8
1.2. Productos de cuidado personal	11
1.2.1. Almizcles	13
1.2.2. Filtros UV	16
1.3. Bioacumulación	20
1.4. Metodologías de extracción y análisis de filtros UV y almizcles en biota	21
1.5. Dispersión de matriz en fase sólida	25
1.6. SPME / <i>in vivo</i> SPME	30
1.6.1. Aplicaciones de <i>in vivo</i> SPME	36
1.6.2. Métodos de calibración <i>in vivo</i> SPME	39
1.7. Organismos bioindicadores: Peces	44
1.7.1. Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	46
1.7.2. Tilapia mojarra (<i>Oreochromis urolepis hornorum</i>)	47
2. Desarrollo Experimental	49
2.1. Reactivos, materiales, instrumentos y equipos	49
2.2. Limpieza del material	51
2.3. Preparación de disoluciones estándar	51
2.4. Sistema PSSI-GC-MS	52
2.4.1. Optimización	52
2.4.2. Condiciones optimizadas	52
2.4.3. Optimización de la derivatización	53
2.4.4. Validación del sistema PSSI-GC-MS	53

2.4.2.1. Validación con estándares en acetato de etilo	54
2.4.2.2. Validación con derivados de MSTFA	54
2.5. Método MSPD-PSSI-GC-MS	54
2.5.1. Pretratamiento de muestras	55
2.5.2. Fortificación del músculo	55
2.5.3. Optimización	55
2.5.4. Procedimiento optimizado MSPD	56
2.5.5. Pérdida de los analitos por evaporación	56
2.5.6. Efecto matriz	56
2.5.7. Validación	57
2.6. <i>In vitro</i> SPME-PSSI-GC-MS	57
2.6.1. Fortificación del músculo	58
2.6.2. Acondicionamiento de fibras SPME C18	58
2.6.3. Optimización	58
2.6.4. Extracción optimizada <i>in vitro</i> SPME	58
2.6.5. Efecto matriz	59
2.6.6. Reutilización de las fibras	59
2.6.7. Perfil de extracción y validación	60
2.7. <i>In vivo</i> SPME-PSSI-GC-MS	60
2.7.1. Truchas juveniles	60
2.7.2. Exposición de peces	61
2.7.3. Procedimiento	61
2.7.4. Perfil de extracción, repetibilidad y calibración <i>in vivo</i>	63
2.8. Ensayos de bioacumulación y eliminación	64
2.9. Ensayos con Tilapia	64
2.9.1. Modificación del método MSPD-PSSI-GC-MS para tilapia	65
2.9.2. Tilapias juveniles	65
2.9.3. <i>In vivo</i> SPME-PSSI-GC-MS	65
2.9.3.1. Perfil de extracción y calibración <i>in vivo</i>	65

2.9.4. Ensayos <i>in vivo</i> de bioacumulación y eliminación	66
3. Resultados y discusión	67
3.1. Sistema PSSI-GC-MS	67
3.1.1. Optimización	67
3.1.2. Optimización de la derivatización	67
3.1.3. Validación del sistema PSSI-GC-MS	71
3.1.3.1. Validación con estándares en acetato de etilo	71
3.1.3.2. Validación con derivados de MSTFA	72
3.2. Método MSPD-PSSI-GC-MS	73
3.2.1. Optimización	73
3.2.2. Pérdida de los analitos por evaporación	75
3.2.3. Efecto matriz	75
3.2.4. Validación del método MSPD-PSSI-GC-MS	77
3.3. Método <i>in vitro</i> SPME-PSSI-GC-MS	79
3.3.1. Optimización	79
3.3.2. Efecto matriz	80
3.3.3. Reutilización de las fibras	80
3.3.4. Perfil de extracción <i>in vitro</i>	82
3.3.5. Validación <i>in vitro</i>	86
3.4. Método <i>in vivo</i> SPME-PSSI-GC-MS	88
3.4.1. Perfil de extracción	88
3.4.2. Calibración <i>in vivo</i> SPME	91
3.5. Ensayos <i>in vivo</i> de bioacumulación y eliminación	93
3.6. Ensayos <i>in vivo</i> con tilapia	96
3.6.1. Modificación del método MSPD-PSSI-GC-MS de tilapia	96
3.6.2. Perfil de extracción	96
3.6.3. Calibración <i>in vivo</i>	99
3.6.4. Ensayos <i>in vivo</i> de bioacumulación y eliminación	100
Conclusiones	103

Referencias	104
Anexos	115

Tabla 1. Compuestos en estudio.....	12
Tabla 2. Determinación de filtros UV y almizcles en biota	22
Tabla 3. Aplicaciones de MSPD para el análisis de contaminantes orgánicos e inorgánicos en organismos acuáticos.....	29
Tabla 4. Aplicaciones in vivo SPME para detectar contaminantes en peces	38
Tabla 5. Áreas relativas utilizando MSTFA como derivatizante	67
Tabla 6. Áreas relativas utilizando BSTFA como derivatizante.....	68
Tabla 7. P-values de la prueba t para la reacción de derivatización con MSTFA a 30 y 60 min	68
Tabla 8. Datos de validación del sistema cromatográfico con estándares en acetato de etilo	72
Tabla 9. Resultados de validación del sistema cromatográfico de estándares derivatizados con MSTFA.....	73
Tabla 10. Pérdida por evaporación de los extractos de MSPD	75
Tabla 11. Relación de pendientes de la curva de extractos fortificados y la de disolvente puro ...	76
Tabla 12. Validación del método MSPD-PSSI-GC-MS (certeza, precisión, LD y LC)	78
Tabla 13. Linealidad del método MSPD-PSSI-GC-MS	78
Tabla 14. Recobro promedio de la desorción de la fibra (n=2).....	79
Tabla 15. Evaluación del efecto matriz	80
Tabla 16. Validación y R_s in vitro SPME -GC-MS	87
Tabla 17. Valores de LD y LC reportados en la literatura para filtros UV y almizcles	88
Tabla 18. Valores de R_s (n=6) in vivo SPME-GC-MS	92
Tabla 19. Resultados de prueba t de comparación de R_s in vivo e in vitro	92
Tabla 20. Concentración de los PCPs en los ensayos de acumulación y eliminación (n=3)	95
Tabla 21. Valores de R_s (n=6) in vivo SPME-GC-MS	99
Tabla 22. Concentración de los analitos en el ensayo de acumulación y eliminación de tilapia (n=3)	102

Figura 1. Fuentes y rutas de los productos de cuidado personal (adaptado de referencia 12).....	9
Figura 2. Clasificación de contaminantes emergentes.....	10
Figura 3. Estructuras químicas de los almizcles.....	15
Figura 4. Estructuras químicas de filtros UV.....	19
Figura 5. Bioacumulación de contaminantes (puntos rojos) en un organismo (pez) como un resultado neto de consumo y pérdidas (flechas) ³¹	21
Figura 6. Procedimiento de MSPD (adaptado de referencia 57).	27
Figura 7. Modalidades de muestreo in vivo SPME	34
Figura 8. Selección de la modalidad de muestreo y tipo de dispositivo para in vivo SPME.....	35
Figura 9. Fibras in vivo SPME comerciales.....	36
Figura 10. Proceso de trabajo completo de in vivo SPME en combinación con GC-MS y LC-MS. ...	37
Figura 11. Selección del método de calibración más apropiado para in vivo SPME.	40
Figura 12. Perfil de extracción típico en SPME.....	41
Figura 13. Fotografía de truchas arcoíris.	47
Figura 14. Fotografía de una tilapia mojarra	48
Figura 15. Esquema analítico del proyecto de investigación	49
Figura 16. Análisis in vitro SPME. (a) Acondicionamiento de las fibras, (b) extracción de músculo de trucha fortificado y (c) desorción de la fibra con acetonitrilo y agitación.	59
Figura 17. Inserción de la fibra SPME C18 en trucha (A) y tilapia (B).....	62
Figura 18. Diagrama (analítico) para la determinación de filtros UV y almizcles en peces.....	63
Figura 19. Reacción de derivatización de la oxibenzona.....	68
Figura 20. Cromatograma iónico (SIR) del análisis por GC-MS de un estándar en acetato de etilo (A) y un estándar derivatizado con MSTFA (B) ambos a 200 ng/mL. Condiciones cromatográficas en la sección 2.4. Identificación: 1. Galaxolida, 2. Tonalida, 3. Oxibenzona/Oxibenzona-TMS, 4. 4-MBC, 5. Padimato-O,.....	70
Figura 21. Cromatograma iónico (SIR) del análisis por MSPD-GC-MS de una muestra de músculo control y una muestra de músculo fortificado a 1 µg/g (sección 2.5.2). Condiciones cromatográficas en la sección 2.4. Identificación: 1. Galaxolida, 2. Tonalida, 3. Oxibenzona, 4. 4-MBC, 5. Padimato-O,	74

Figura 22. Reutilización de fibras para almizcles	81
Figura 23. Reutilización de fibras para filtros UV.....	81
Figura 24. Perfil de extracción in vitro obtenido con músculo de pescado fortificado a 5 $\mu\text{g/g}$ (n=3)	83
Figura 25. Linealidad de 1-7 $\mu\text{g/g}$ para los almizcles y 4-MBC, la pendiente de la curva es R_s in vitro	84
Figura 26. Linealidad de 1-7 $\mu\text{g/g}$ para padimato-O, oxibenzona y 2-EHMC,.....	85
Figura 27. Linealidad de 1-7 $\mu\text{g/g}$ para octocrileno, la pendiente de la curva es R_s in vitro	86
Figura 28. Perfil de extracción in vivo SPME de truchas expuestas en agua fortificada (100 $\mu\text{g/L}$)	89
Figura 29. Cromatograma iónico (SIR) para el análisis in vivo SPME -PSSI-GC-MS de trucha control y trucha expuesta (5 días a 100 $\mu\text{g/mL}$ de cada analito). Condiciones cromatográficas en la sección 2.4. Identificación: 1. Galaxolida, 2. Tonalida, 3. 4-MBC, 4. Oxibenzona-TMS, 5. Padimato-O, 6. 2- EHMC, 7. Octocrileno, El. B[a]A.	91
Figura 30. Resultados de la concentración de los analitos en los ensayos de (A) bioacumulación y	94
Figura 31. Perfil de extracción in vivo de tilapias expuestas en agua fortificada a 100 $\mu\text{g/L}$	97
Figura 32. Cromatograma iónico (SIR) para el análisis in vivo SPME-PSSI-GC-MS de tilapia control y tilapia expuesta (3 días a 100 $\mu\text{g/mL}$ de cada analito). Condiciones cromatográficas en la sección 2.4. Identificación: 1. Galaxolida, 2. Tonalida, 3. 4-MBC, 4. Oxibenzona-TMS, 5. Padimato-O, 6. 2- EHMC,	98
Figura 33. Resultados de la concentración de los analitos en el músculo de tilapia juvenil en los ensayos de (A) bioacumulación y (B) eliminación (n=3).....	101

2-EHMC	2-etilhexil metoxicinamato
4-MBC	4-metilbenciliden alcanfor
ANOVA	Análisis de varianza
DER	Desviación estándar relativa
EI	Estándar interno
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
<i>In vitro</i> SPME	Microextracción en fase sólida <i>in vitro</i>
<i>In vivo</i> SPME	Microextracción en fase sólida <i>in vivo</i>
LD	Límite de detección
LC	Límite de cuantificación
MSPD	Dispersión de matriz en fase sólida
PCPs	Productos de cuidado personal
PSSI	Inyector split/splitless programable
SIR	Registro selectivo de iones (selected ion recording)
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida
EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos

In this work, a method was developed and validated for the simultaneous determination of two groups of personal care products, UV filters (4-MBC, oxybenzone, padimate-O, 2-EHMC and octocrylene) and polycyclic aromatic musks (galaxolide and tonalide), in fish by *in vivo* solid phase microextraction (*in vivo* SPME) followed by gas chromatography with programmable split/splitless injector coupled to mass spectrometry (PSSI-GC-MS). The *in vivo* method was validated by carrying out *in vitro* experiments, the validation parameters were linearity ($r^2 > 0.98$), inter-day precision (relative standard deviation $< 35.50\%$), and limits of detection and quantification ($2\text{-}25\text{ ng g}^{-1}$ and $5\text{-}70\text{ ng g}^{-1}$, respectively). The *in vivo* and *in vitro* calibrations were performed with the sampling rate calibration method. This kind of calibration requires to know the total analyte concentration in the muscle, for this a method using matrix solid phase dispersion (MSPD) followed by PSSI-GC-MS was developed and validated, this showed good linearity ($r^2 > 0.98$), trueness (recovery $> 55\%$) and precision (relative standard deviation $< 19\%$), also limits of detection at trace level ($4\text{-}12\text{ ng/g}$). The sampling rate (R_s) was higher *in vivo* than *in vitro*; therefore, *in vivo* R_s was applied to the uptake and elimination tracing under controlled laboratory conditions to avoid quantitation error. After five days exposure of the trout in spiked water, all analytes were bioaccumulated in muscle tissue in different concentration depending on its molecular structure and physicochemical properties, tonalide and padimate-O were the most and the least absorbed, respectively. It was observed that the elimination rate was initially high with a rapid decrease of the analyte concentrations for the first 24 h, and then the rate of elimination showed a decreasing tendency, which originated that the target analytes were bioaccumulated. Additionally, to evaluate the robustness, the *in vivo* SPME-GC-MS method developed and validated was applied in tilapias getting results similar to those obtained with trout.

The proposed methodology is a simple, miniaturized, and mainly non-lethal alternative for the determination of emerging contaminants in fish.

En este trabajo, se desarrolló y validó un método para la determinación simultánea de dos grupos de productos de cuidado personal, filtros UV (4-MBC, oxibenzona, padimato-O, 2-EHMC y octocrileno) y almizcles aromáticos policíclicos (galaxolida y tonalida), en peces por microextracción en fase sólida *in vivo* (*in vivo* SPME) seguida de cromatografía de gases con inyector split/splitless programable acoplada a espectrometría de masas (PSSI-GC-MS). El método *in vivo* fue validado realizando experimentos *in vitro*, los parámetros de validación fueron linealidad ($r^2 > 0.98$), precisión inter-día (desviación estándar relativa $< 35.50\%$), y límites de detección y cuantificación (2-25 ng/g y 5-70 ng/g, respectivamente). Las calibraciones *in vivo* e *in vitro* se realizaron con el método de velocidad de muestreo predeterminada. Este tipo de calibración requiere conocer la concentración total del analito en el músculo, para esto se desarrolló y validó un método utilizando dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) seguida de PSSI-GC-MS, éste mostró una buena linealidad ($r^2 > 0.98$), certeza (recobros $> 55\%$) y precisión (desviación estándar relativa $< 19\%$), así como límites de detección a nivel de trazas (4-12 ng/g).

La velocidad de muestreo (R_s) *in vivo* fue mayor que *in vitro*; por lo tanto, para evitar error en la cuantificación la constante R_s *in vivo* se utilizó para cuantificar los analitos en truchas juveniles vivas provenientes de ensayos de acumulación y eliminación en condiciones controladas de laboratorio. Después de cinco días de exposición de las truchas en agua fortificada, todos los analitos se bioacumulaban en el músculo en diferente concentración dependiendo de su estructura molecular y características fisicoquímicas; tonalida y padimato-O fueron el más y el menos absorbido, respectivamente. Se observó una velocidad alta de eliminación con un rápido decremento de la concentración de los analitos en las primeras 24 h, después la velocidad de eliminación disminuyó, provocando que los analitos se bioacumularan. Adicionalmente para evaluar la robustez, el método *in vivo* SPME-PSSI-GC-MS desarrollado y validado se aplicó en tilapias obteniéndose resultados similares a los obtenidos para la trucha.

La metodología propuesta es una alternativa simple, miniaturizada, y principalmente no letal para la determinación de contaminantes emergentes en peces.

Los ingredientes de productos de cuidado personal (PCPs) forman parte de los denominados contaminantes emergentes, cuya principal vía de introducción en el medio ambiente es a través de las aguas residuales urbanas, debido a que en las plantas de tratamiento los procesos no están diseñados para eliminar este tipo de compuestos. Los filtros UV y almizcles pertenecen a un subgrupo de PCPs que representan un peligro potencial debido a su efecto de disrupción endócrina, además por su carácter lipofílico pueden acumularse en organismos acuáticos como los peces, que son algunos de los principales organismos bioindicadores. Los estudios de bioconcentración y eliminación tienen un papel muy importante para sustentar que los PCPs se sometan a futuras regulaciones. Sin embargo, en este tipo de experimentos pueden ocuparse hasta 100 animales por ensayo. Por otro lado, cuando se realiza monitoreo ambiental se recomienda muestrear entre 13 y 36 peces por cada lugar para ver la variación inter-sitio. Actualmente, en la mayoría de los procedimientos analíticos para determinar PCPs los peces son sacrificados, ya que se basan en la extracción con disolventes, por lo que se requiere el desarrollo de análisis alternativos no letales que disminuyan la cantidad de organismos y no alteren el equilibrio natural en el ecosistema muestreado.

Existen pocos métodos no letales para la determinación de contaminantes emergentes, los más comunes son los biosensores y la microdiálisis. Recientemente también se ha utilizado la microextracción en fase sólida *in vivo* (*in vivo* SPME) sin embargo, son escasos los estudios reportados, y en su mayoría se analizan fármacos con fibras de polidimetilsiloxano (PDMS). En este trabajo, por primera vez, se desarrolló y validó satisfactoriamente un método *in vivo* SPME seguido de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (*in vivo* SPME-GC-MS) para determinar simultáneamente dos grupos de PCPs en truchas arcoíris. Los analitos fueron seis filtros UV (4-metilbenciliden alcanfor, oxibenzona, padimato-O, 2-etilhexil metoxicinamato y octocrileno) y dos almizcles aromáticos policíclicos (galaxolida y tonalida). Para la extracción se utilizaron fibras C18 (usada principalmente para análisis clínicos) y no hubo necesidad de sacrificar a los peces. Por otro lado, se realizaron ensayos de acumulación y eliminación que contribuyen a entender el destino ambiental de estos compuestos, ya que existen muy pocos estudios reportados. El proyecto de investigación se realizó en cinco etapas: (1) optimización y validación del sistema GC-MS, para establecer las condiciones de separación y detección de los analitos, (2) optimización y validación de la metodología de dispersión de matriz en fase sólida seguida de cromatografía de

gases acoplada a espectrometría de masas (MSPD-GC-MS), para cuantificar la concentración total de los analitos en el músculo del pez, (3) optimización y validación de la metodología *in vitro* SPME-GC-MS con músculo de trucha, para demostrar la aplicabilidad del método en la cuantificación de muestras *in vivo*, (4) obtención del perfil de extracción y validación de la metodología *in vivo* SPME-GC-MS con trucha, (5) aplicar la metodología *in vivo* SPME-GC-MS para la cuantificación de los analitos en muestras de trucha provenientes de ensayos de acumulación y eliminación y (6) evaluación de la robustez del método *in vivo* SPME-GC-MS desarrollado, y su aplicación en tilapias provenientes de ensayos de acumulación y eliminación.

La aplicación *in vivo* de SPME para la extracción de PCPs en trucha seguida del análisis por GC-MS, permitirá desarrollar una metodología analítica certera, precisa, sencilla (tiempos cortos de extracción, mínima manipulación de la muestra y sin limpieza de los extractos) y con límites de detección y cuantificación adecuados para cuantificar simultáneamente filtros UV y almizcles sin necesidad de sacrificar al pez.

Los peces serán capaces de absorber y acumular los filtros UV y almizcles si se encuentran en el medio acuático dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas.

Los peces contaminados serán capaces de eliminar los filtros UV y almizcles, dependiendo de su carácter lipofílico, si se colocan en agua libre de estos compuestos.

La bioacumulación y eliminación de los analitos dependerá de la naturaleza del pez y su metabolismo, debido a esto será diferente para un pez lóxico (trucha) que para un pez léxico (tilapia).

Objetivo General:

Desarrollar y validar una metodología utilizando microextracción en fase sólida *in vivo* (*in vivo* SPME), seguido de GC-MS para la determinación de filtros UV (4-metilbenciliden canfor, oxibenzona, padimato-O, 2-etilhexil metoxicinamato y octocrileno) y almizcles aromáticos policíclicos (galaxolida y tonalida) en peces.

Objetivos Particulares:

1. Establecer los parámetros cromatográficos y realizar la validación del método cromatográfico GC-MS para la determinación simultánea de almizcles y filtros UV.
2. Desarrollar y validar un método de dispersión de matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés) para determinar la concentración de filtros UV y almizcles en músculo de pescado.
3. Desarrollar y validar un método de microextracción en fase sólida *in vitro* (*in vitro* SPME-GC-MS, por sus siglas en inglés)^a para demostrar la aplicabilidad de la metodología para realizar la cuantificación *in vivo*.
4. Determinar la constante de velocidad de muestreo predeterminada (R_s) tanto *in vivo* como *in vitro* para seleccionar la más adecuada en la cuantificación *in vivo*.
5. Aplicar el método de microextracción en fase sólida *in vivo* (*in vivo* SPME-GC-MS, por sus siglas en inglés ^a) en peces expuestos en agua fortificada con los compuestos en estudio para determinar el perfil de bioacumulación y eliminación.

^a En todo el documento se utilizarán las siglas en inglés

1.1. Contaminantes emergentes

En décadas pasadas, la investigación en el área ambiental se enfocó principalmente en los contaminantes convencionales como dioxinas, pesticidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos y metales, entre otros, de estos se conocen sus efectos tóxicos, genotóxicos, carcinógenos, así como su persistencia en el ambiente¹. Para estos compuestos se han establecido normas y métodos analíticos certificados para su determinación, tanto a nivel nacional como internacional. Además de estos contaminantes reconocidos, muchos otros compuestos químicos se liberan al ambiente como resultado de su uso en la industria, agricultura y actividades humanas².

Estas sustancias, clasificadas como contaminantes emergentes, y su cuantificación, análisis e identificación de riesgos potenciales ha cobrado importancia durante los últimos años y ha despertado interés y preocupación por parte de la comunidad científica. Estos contaminantes pueden ser candidatos para futuras regulaciones, dependiendo de sus efectos potenciales en la salud y los datos de monitoreo de su incidencia³. Estos compuestos son muy utilizados por lo que pueden entrar en el ambiente acuático directamente como consecuencia de actividades recreacionales cuando las personas se bañan, broncean y nadan en lagos y ríos, o de manera indirecta a través de las plantas de tratamiento de agua, por esta razón existe una necesidad para monitorear estos compuestos tanto en matrices ambientales como biológicas (Figura 1)^{4,5}.

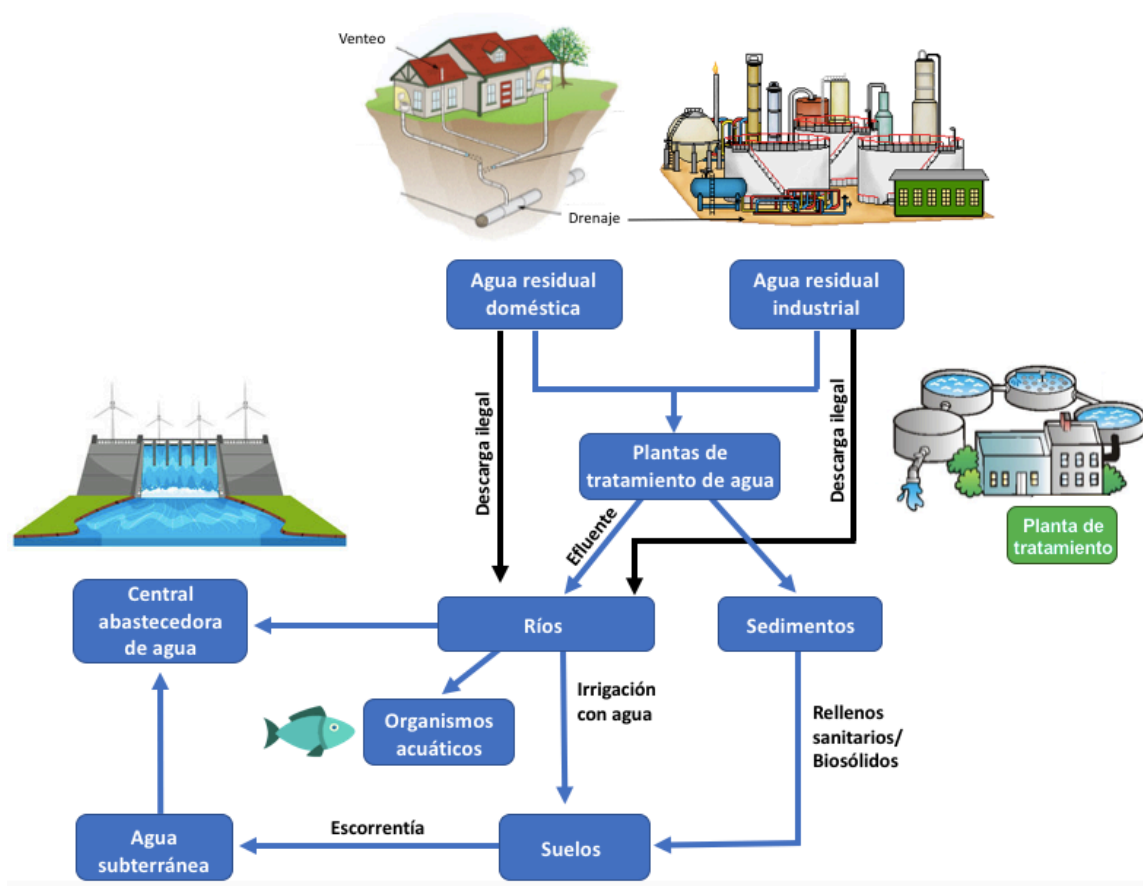


Figura 1. Fuentes y rutas de los productos de cuidado personal (adaptado de referencia 12)

Las propiedades fisicoquímicas de la mayoría de los contaminantes emergentes contribuyen a que su remoción en los procesos de tratamiento de agua convencionales sea difícil. Por esto las plantas de tratamiento de aguas residuales son las mayores contribuyentes de contaminantes emergentes en el ambiente acuático, lo que representa un riesgo potencial para los organismos acuáticos y la salud pública⁶. Debido a su continua introducción en el medio ambiente pueden ser considerados como pseudo persistentes y causar la misma exposición potencial de los contaminantes persistentes regulados^{7,8}. Los contaminantes emergentes son un grupo de diversos compuestos que incluyen fármacos, productos de cuidado personal (PCPs), surfactantes, compuestos perfluorados, retardantes de llama y plastificantes, aditivos de gasolina, nanomateriales, subproductos de desinfección y endulzantes artificiales^{6,9}. En la Figura 2 se muestra una clasificación de los contaminantes emergentes y se dan ejemplos de compuestos pertenecientes a cada grupo^{10,11}.

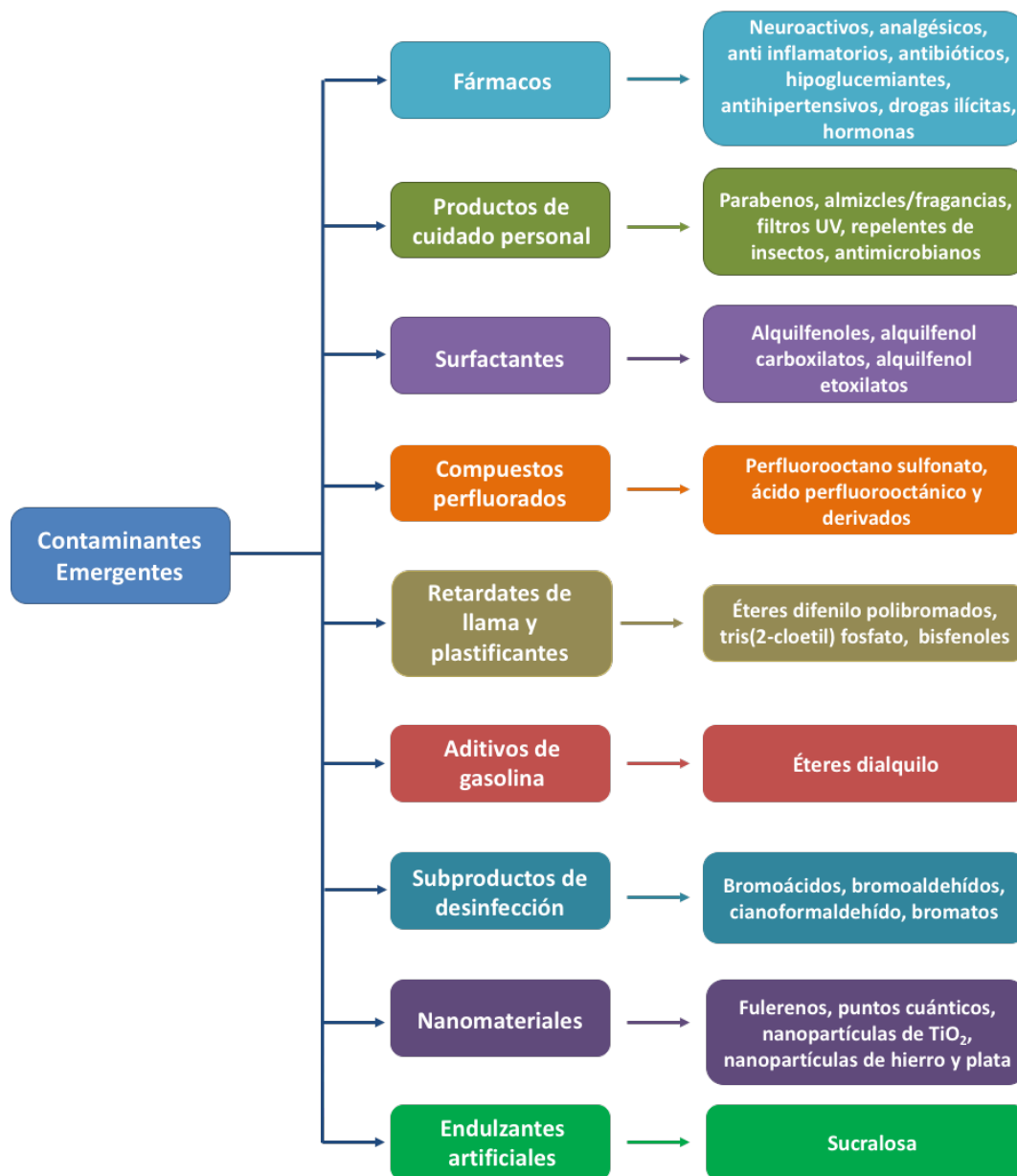


Figura 2. Clasificación de contaminantes emergentes.

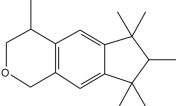
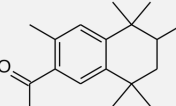
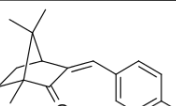
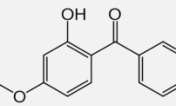
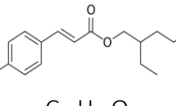
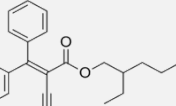
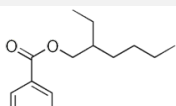
Las dos principales clases de contaminantes emergentes de origen urbano son los PCPs y los fármacos, por tanto, contaminan suelos y ecosistemas acuáticos, por lo que han sido los más estudiados. Su amplio uso, disposición indebida y tratamiento ineficiente en las plantas de tratamiento de agua contribuyen a la contaminación de estos compuestos y sus metabolitos en los cuerpos de agua¹². En la Figura 1 se muestra un diagrama de la dinámica y destino ambiental de los productos de cuidado personal. Los contaminantes emergentes se detectaron en el ambiente

acuático en concentraciones relativamente bajas (ng/L a $\mu\text{g/L}$), sin embargo, por su capacidad de bioacumularse son peligrosos para organismos acuáticos. Pueden alterar la función del sistema endócrino afectando el desarrollo, la reproducción y otras funciones del organismo influenciadas por hormonas (metabolismo, crecimiento, balance de fluidos y función cardiovascular). Esta disrupción se puede provocar por diferentes mecanismos como interacción con el tejido diana (a través de la ruta hormona receptor o no receptor), afectando la secreción de hormonas o su vida media biológica, así como modulando la relación hipotálamo-pituitaria que existe en el órgano diana^{9,13}.

1.2. Productos de cuidado personal

Los PCPs constituyen un grupo diverso de contaminantes emergentes, son compuestos químicos usados en productos cosméticos y de higiene (jabones, champús, lociones, pasta de dientes, perfumes, cremas, desinfectantes y bloqueadores solares, entre otros) por lo que se usan diariamente para mejorar la calidad de vida. Las principales clases de PCPs incluyen filtros UV, almizcles, repelentes de insectos, desinfectantes y conservadores. Debido a que se usan en grandes cantidades, la mayoría de los PCPs son desechados al ambiente de manera continua a través de sistemas de aguas residuales domésticas e industriales, llegando así a los cuerpos de agua (Figura 1)^{1,9}. Entre los productos de cuidado personal se encuentran los filtros UV y los almizcles aromáticos policíclicos, que son los compuestos de interés en este proyecto de investigación, ya que ambos son disruptores endócrinos, por ello se describen en detalle en las siguientes secciones¹⁴. Las propiedades de los compuestos estudiados en el presente trabajo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Compuestos en estudio

Tipo	Analito	Nombre IUPAC	Estructura Fórmula molecular/ Peso molecular (g/mol)	Solubilidad en agua (mg/L)	Log K _{ow} ^a	Iones SIR (m/z) ^b
Almizcles aromáticos policíclicos	Galaxolida	4,6,6,7,8,8-hexametil- 1,3,4,6,7,8-hexahidro- ciclopenta[g]isocromeno	 C ₁₈ H ₂₆ O 258.40	1750 ¹⁵	5.9 ¹⁶	243, 258
	Tonalida	1-(3,5,5,6,8,8-hexametil- 5,6,7,8-tetrahydro-2- naftalenil)etanona	 C ₁₈ H ₂₆ O 258.40	1250 ¹⁵	5.8 ¹⁶	243, 258
Filtros UV	4-MBC	1,7,7-trimetil-3-[(4- metilfenil)metilen] biciclo[2.2.1]	 C ₁₈ H ₂₂ O 254.37	1.3 ¹⁷	5.5 ¹⁸	171, 211, 254
	Oxibenzona	(2-hidroxi-4- metoxifenil)fenil metanona	 C ₁₄ H ₁₂ O ₃ 228.24	13 ¹⁹	3.5 ¹⁸	77, 151, 228 242 ^c , 285 ^c , 300 ^c
	2-EHMC	Ácido 3-(4-metoxifenil)-2- etilhexiléster-2- propiónico	 C ₁₈ H ₂₆ O ₃ 290.40	0.15 ²⁰	5.8 ¹⁸	161, 178, 290
	Octocrileno	Ácido 2-ciano-3,3-difenil- 2-etilhexiléster-2- propiónico	 C ₂₄ H ₂₇ N O ₂ 361.48	1.3 ²¹	6.9 ¹⁸	204, 249, 360
	Padimato-O	Ácido 4-(dimetilamino)-2- etilhexiléster benzoico	 C ₁₇ H ₂₇ NO ₂ 277.40	0.2 ²¹	5.8 ¹⁸	148, 165, 277

^a Log K_{ow}, coeficiente de reparto octanol-agua

^b Todos los iones se utilizaron para identificar y cuantificar en el modo de registro selectivo de iones (SIR, por sus siglas en inglés).

^b Iones para oxibenzona derivatizada (oxibenzona-TMS).

1.2.1. Almizcles

Los primeros almizcles se obtuvieron de una secreción producida por el venado almizclero macho (*Moschus moschiferus L.*) así que se usaron como materiales de fragancias durante siglos. Para obtener los almizcles era necesario sacrificar al animal para quitarle la glándula que producía la secreción, por esta razón hacía que fuera un producto natural extremadamente caro. Debido a esto el desarrollo de compuestos sintéticos se convirtió en una prioridad. De manera general los almizcles se dividen en cuatro clases principales:

- a) Nitroaromáticos: son derivados de benceno sustituido con 2 o 3 grupos nitro, también pueden tener en su estructura grupos alquilo, ceto o metoxi (Figura 3). Estos surgieron primero y durante muchos años fueron los más utilizados en la industria de las fragancias debido a su olor, su papel en la fijación y el bajo costo de su producción. Sin embargo, en 1985 disminuyó su uso debido a que provocaban reacciones alérgicas al contacto con la piel y fueron detectados en peces, leche materna y grasa humana, demostrando su potencial para bioacumularse. Los compuestos más representativos son el almizcle xileno, almizcle cetona y almizcle ambreta.
- b) Aromáticos policíclicos: son compuestos sin grupos nitro que se dividen en derivados de indano, derivados de tetralina, compuestos tricíclicos y derivados de cumarina (Figura 3). Al igual que los nitroalmizcles, son compuestos sintéticos que no están presentes en la naturaleza. Se utilizan en la industria de las fragancias debido a sus propiedades de olor y a que su costo de producción es menor que el de los almizcles macrocíclicos. Además, comparados con los nitroalmizcles tienen mayor resistencia a la luz y a compuestos alcalinos, así como su capacidad de adherirse a telas. Se usan principalmente en cosméticos y detergentes. Se incrementó la producción de estos compuestos cuando disminuyó la producción de nitroalmizcles. Los compuestos más importantes de este grupo son galaxolida, tonalida y pantolida, y se demostró que actúan como disruptores endócrinos ya que afectan los receptores de estrógeno.
- c) Macrocíclicos: inicialmente se obtuvieron de manera natural, tienen en su estructura grupos cetona (provenientes de animales) o lactona (provenientes de plantas). Son anillos que contienen de 15 a 17 átomos de carbono (Figura 3), el tipo de olor que presentan

está influenciado por el tamaño del anillo. Son estables a la luz y a compuestos alcalinos, tienen una fuerte fijación y buena calidad de aroma, por este motivo tienen un alto valor en la industria de las fragancias, pero su síntesis es difícil y en ocasiones requiere de múltiples pasos, lo que hace que sus costos de producción sean elevados y su uso en la industria limitado. Se dividen en cetonas, dicetonas, lactonas, oxalactonas (éter lactonas), dilactonas, cetolactonas y ésteres. Algunos de los compuestos más importantes de este grupo son la civetona, muscona, exaltolida y etileno brasilato²².

d) Alicíclicos: debido a los debates acerca del uso de los nitro aromáticos y policíclicos, la industria de las fragancias ha puesto énfasis en el desarrollo de nuevos compuestos, los alicíclicos que son relativamente los más recientes. En su estructura tienen un éster cicloalquílico y una cadena lineal, tienen una estructura diferente a las otras tres clases mencionadas ya que son ésteres alquílicos modificados (Figura 3). Su uso en productos de cuidado personal es limitado así que son menos importantes que los anteriores en la industria de fragancias. Son estables, tienen baja toxicidad y su aroma es fácil de dispersar, por consiguiente, se espera que su uso y aplicaciones se incrementen en la industria. Los más representativos de este grupo son romandolida y helvetolida²³.

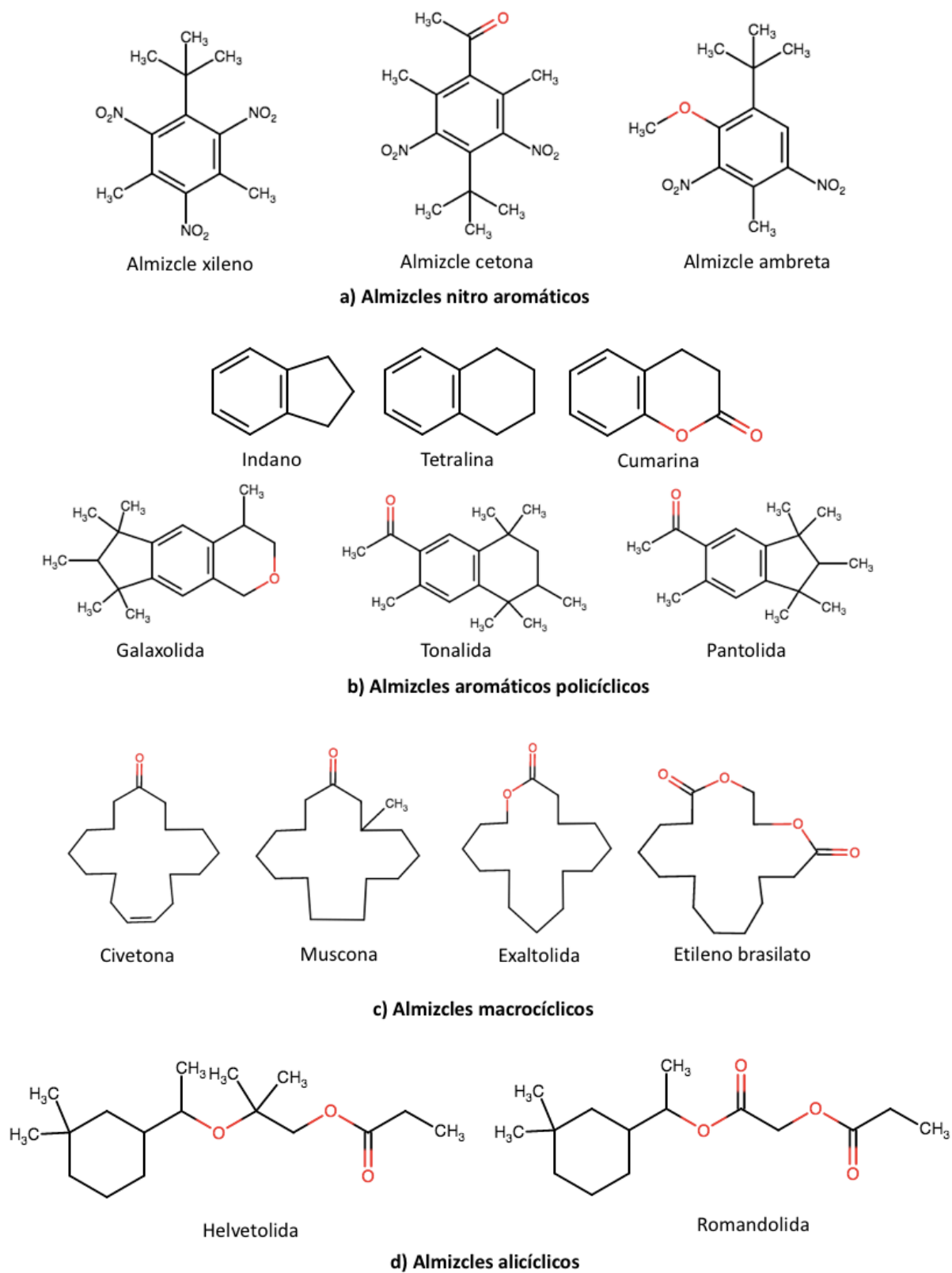


Figura 3. Estructuras químicas de los almizcles

Los almizcles sintéticos son los compuestos más utilizados en la industria de las fragancias, ya que mejoran la fijación al disminuir la liberación de los compuestos volátiles, contribuyendo a que la fragancia sea estable por un gran periodo de tiempo. Por esto se usan como ingredientes de perfumería no sólo en cosméticos, sino también en detergentes, cremas, jabones y limpiadores. En años recientes, los almizcles policíclicos se han convertido en los más importantes a nivel comercial, pues sustituyeron a los nitroaromáticos, que son tóxicos^{24,25}. Después de su uso se desechan al ambiente acuático a través de las plantas de tratamiento, en agua superficial, potable, tratada y sedimentos, por consiguiente, tienen una distribución ubicua en el ambiente acuático. Entre los principales compuestos encontrados en organismos acuáticos están dos nitroalmizcles (almizcle xileno y almizcle cetona) y dos almizcles policíclicos (galaxolida y tonalida). Los compuestos galaxolida y tonalida tienen la mayor incidencia y están presentes en el orden de $\mu\text{g/L}$, cuya concentración es mayor a los nitroaromáticos. Estos compuestos se han identificado en organismos acuáticos del Mar del Norte y en ríos, lagos y estuarios de América y Europa. Se han determinado principalmente en peces, aunque también en mejillones y camarones, lo que indica que estos compuestos se bioacumulan en organismos acuáticos y hay evidencia de que se transfieren a través de la cadena alimenticia (biomagnificación)²². Estos compuestos son contaminantes ubicuos, persistentes, bioacumulativos y algunos de ellos altamente tóxicos. Se reportó que los nitroalmizcles son fototóxicos, neurotóxicos, carcinogénicos y tienen actividad estrogénica; también se encontró que los almizcles policíclicos tienen actividad estrogénica y anti-estrogénica por este motivo es necesario monitorearlos en el ambiente acuático²⁶. Debido a esto, en 2007 los almizcles fueron identificados como candidatos para futuros contaminantes emergentes prioritarios⁶.

1.2.2. Filtros UV

Los filtros UV son compuestos utilizados para proteger la piel de daños causados por la radiación UV, por esto están presentes en productos de uso diario como cosméticos, cremas, lociones, lápices labiales, aerosoles, tintes de cabello y champús, entre otros, en concentraciones que van de 0.1 a 10% (p/p). Existen dos tipos principales de filtros UV de acuerdo con su estructura y mecanismo de acción, los compuestos inorgánicos y orgánicos. Los compuestos inorgánicos (TiO_2 , ZnO) reflejan y dispersan la luz UV, mientras que los compuestos orgánicos absorben la radiación

UV con excitación a un nivel más alto de energía, y este exceso se disipa por emisión a longitudes de onda mayores o relajación por procesos fotoquímicos. Generalmente ambos tipos de filtros UV dan una buena protección contra la radiación UVB (280-315 nm) y UVA (315-400 nm)^{27,28}.

Específicamente se discutirán los filtros UV orgánicos, porque son los compuestos de interés en este trabajo. Estos se clasifican como derivados de:

- a) *p*-aminobenzoatos (PABA): son derivados del ácido *p*-aminobenzoico, su estructura tiene dos grupos funcionales reactivos, amino y ácido carboxílico, sustituidos en orientación *para* en el núcleo de benceno (Figura 4). Se usan para proteger de la radiación UVB. El principal representante de este grupo es el padimato-O (Tabla 1), que es un líquido cuyo coeficiente de extinción molar es uno de los más altos, llegando a 28400 en disolventes polares, este valor es más del doble que el del ácido *p*-aminobenzoico, por lo que es uno de los compuestos más usados en productos cosméticos.
- b) salicilatos: fueron los primeros filtros UV utilizados en productos cosméticos. Son compuestos orto-disustituidos, tienen un acomodo espacial que les permite un puente de hidrógeno interno en la molécula (Figura 4), por lo que tienen una gran estabilidad y seguridad, absorben la radiación UVB (alrededor de 300-310 nm) y tienen coeficientes de extinción bajos, por tanto son más utilizados para disolver otros ingredientes cosméticos no solubles como las benzofenonas. El principal representante de este grupo es el homomentil salicilato (HMS).
- c) cinamatos: son los filtros UV más populares para proteger la radiación de la región UVB del espectro electromagnético. Los cinamatos tienen una insaturación conjugada extra tanto en el anillo aromático como en el grupo éster (Figura 4), esto les permite absorber alrededor de 305 nm y tienen coeficientes de extinción molar muy altos (> 23000). El principal representante de este grupo es el 2-EHMC (Tabla 1).
- d) benzofenonas: a diferencia de los otros grupos de compuestos de filtros UV, las benzofenonas son los únicos compuestos que pertenecen a las cetonas aromáticas (Figura 4), por lo que tienen una fácil resonancia de los anillos aromáticos con el grupo carbonilo, absorben alrededor de los 330 nm (región UVA). Tienen la desventaja de que son sólidos difíciles de solubilizar en productos cosméticos. Los

principales representantes de este grupo son la oxibenzona (Tabla 1), dioxibenzona (en la Figura 4 inciso d: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OCH}_3$, $R_3, R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{OH}$) y sulisobenzona (en la Figura 4 inciso d: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OCH}_3$, $R_3 = \text{SO}_3\text{H}$, $R_4, R_5 = \text{OH}$).

- e) antranilatos: también llamados o-aminobenzoatos, al igual que los salicilatos tienen un puente de hidrógeno interno dentro de la molécula (Figura 4), lo que les confiere estabilidad y provoca que el coeficiente de extinción molar de los antranilatos sea mucho menor al del p-aminobenzoato. Absorben alrededor de los 330 nm (región UVA). Uno de los principales representantes de este grupo es el mentil antranilato (en la Figura 4 inciso e: $R_1 = \text{C}_{10}\text{H}_{18}$, $R_2, R_3 = \text{H}$).
- f) dibenzoilmetanos: son dicetonas sustituidas (Figura 4), presentan tautomerismo ceto-enol, absorben alrededor de los 345 nm, por lo que protegen contra la radiación UVA. Tienen coeficientes de extinción molar excepcionalmente altos (>30000) aunque tienen baja fotoestabilidad. Uno de sus principales representantes es la avobenzona (en la Figura 4 inciso f: $R_1 = \text{OCH}_3$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{C}_4\text{H}_9$).
- g) alcanfor: son compuestos bicíclicos (Figura 4) lo que les confiere estabilidad y fotoestabilidad, en su mayoría son sólidos, tienen un alto valor de coeficiente de extinción molar (>20000) y absorben alrededor de los 290-300 nm (región UVB). Uno de sus principales representantes es el 4-MBC (Tabla 1).
- h) otros compuestos orgánicos: otros compuestos usados como filtros UV, son el trioleato de digaloilo, dihidroxiacetona (DHA), dibenzalazina, ácido 2-fenilibencimidazol-5-sulfónico y 5-metil-2-fenilbenzoxazol, entre otros²⁹.

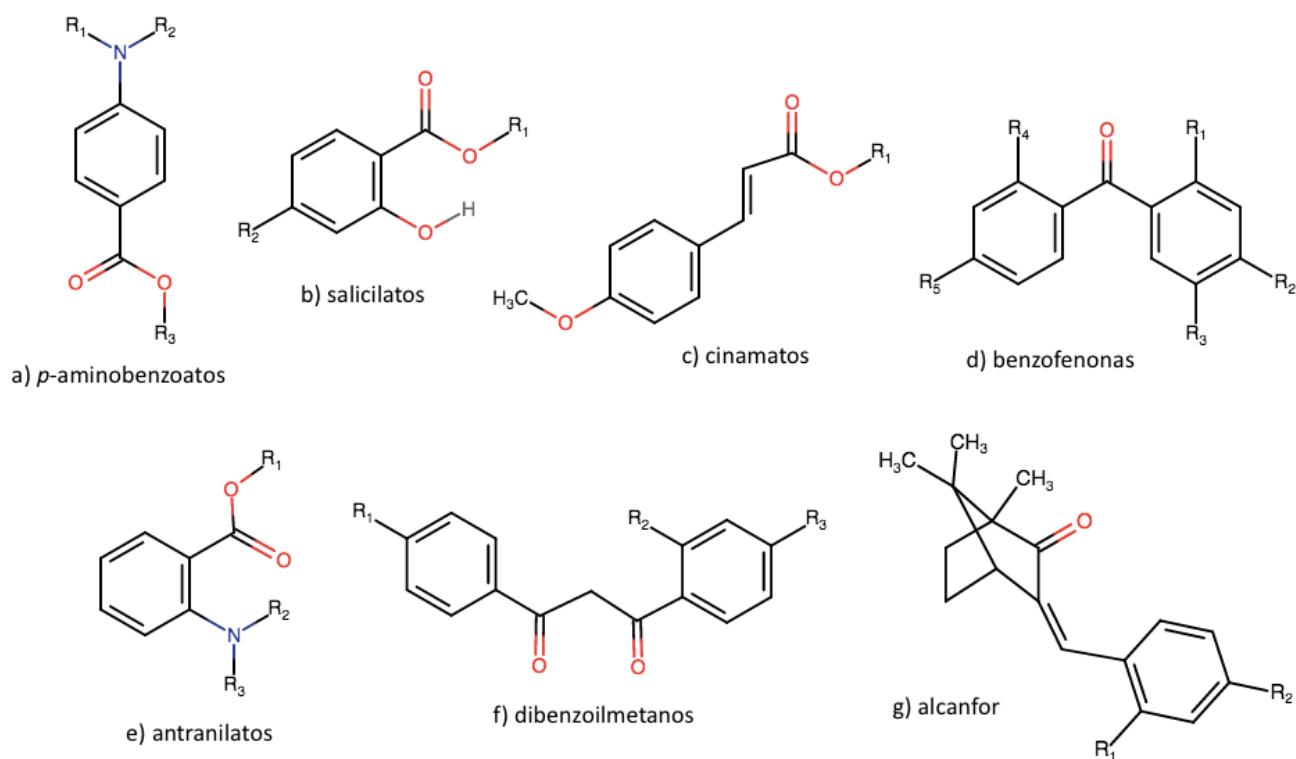


Figura 4. Estructuras químicas de filtros UV

Debido a la preocupación por la relación entre la exposición al sol y el cáncer de piel, en los últimos años se ha incrementado el uso de filtros UV en productos de protección solar y de cuidado personal usados diariamente por millones de personas. Estos compuestos se encontraron en agua superficial (lagos y ríos), agua tratada, suelo, sedimentos y peces²⁷. Los humanos también están expuestos por dos vías, directamente por el uso de productos cosméticos (a través de la piel) o indirectamente a través de la cadena alimenticia. Algunos filtros UV usados presentan actividad hormonal (estrogénica) tanto *in vitro* como *in vivo*. En peces los compuestos de tipo benzofenona y alcanfor causan inducción de vitelogenina, alteraciones en las gónadas, disminución de fertilidad y reproducción, así como feminización de las características sexuales en machos³⁰. Las concentraciones más bajas determinadas para causar estos efectos (3 µg/L para 3-benciliden alcanfor) son generalmente mayores a las encontradas en el ambiente acuático (ng/L en agua). Sin embargo, su propensión a bioacumularse debido a su alta lipofilicidad (Log K_{ow} 4-8), estabilidad relativa a degradación biótica y una exposición a largo plazo les confiere un alto potencial para desarrollar toxicidad^{27,30}.

1.3. Bioacumulación

La bioacumulación describe la acumulación y enriquecimiento de contaminantes en organismos, con relación a lo existente en el ambiente (Figura 5). Es el resultado neto de los procesos de consumo (la dieta y la respiración) y pérdidas (egestión^b, difusión pasiva, metabolismo y crecimiento). La bioacumulación comprende los procesos más específicos de biomagnificación y bioconcentración. Este último es el proceso del reparto directo de los compuestos entre el agua y el organismo, llevando a concentraciones elevadas. La biomagnificación es el resultado del consumo del contaminante en la dieta llevando a mayores concentraciones en el organismo consumidor que en el alimento.

La bioacumulación no es un proceso pasivo, está influenciado por las propiedades fisicoquímicas del compuesto, la cantidad de material particulado en el agua y las propiedades del animal como dieta, tamaño y contenido lipídico. Para que un compuesto pueda ser bioacumulado por un organismo, debe estar biodisponible. Para su acumulación directa del agua, esto significa que el compuesto debe estar disuelto y no asociado a partículas. Sin embargo, si no está disponible para un consumo pasivo por las superficies respiratorias, o por adhesión a la superficie, puede estarlo para su consumo a través de la dieta, por ingestión de las partículas. El reparto entre el material particulado o el agua se determina por sus propiedades fisicoquímicas, especialmente su hidrofobicidad, reflejada en su K_{ow} ³¹. En un contexto regulatorio, compuestos con $\log K_{ow}$ igual o mayor a 5 se consideran bioacumulables, aunque también algunos que tienen un valor menor. Además de las propiedades y estabilidad de los contaminantes, existen diferencias en la forma en que los diferentes organismos bioacumulan por factores como el contenido de lípidos, la alimentación, reproducción, edad, habilidad de biotransformación y demanda energética. El conocimiento de este comportamiento es importante ya que estos compuestos pueden biomagnificarse y tener efectos tóxicos en el organismo, también pueden provocar alteraciones en la fisiología normal del animal. La acumulación ayuda a entender la forma en que los contaminantes se distribuyen en el ecosistema y su importancia en los procesos ecológicos, por

^b Egestión: es el proceso de descarga o expulsión de materiales no digeridos por el organismo en forma de heces.

esta razón los legisladores usan este conocimiento para evaluar la regulación y uso de nuevos ingredientes de PCPs^{31,32}.

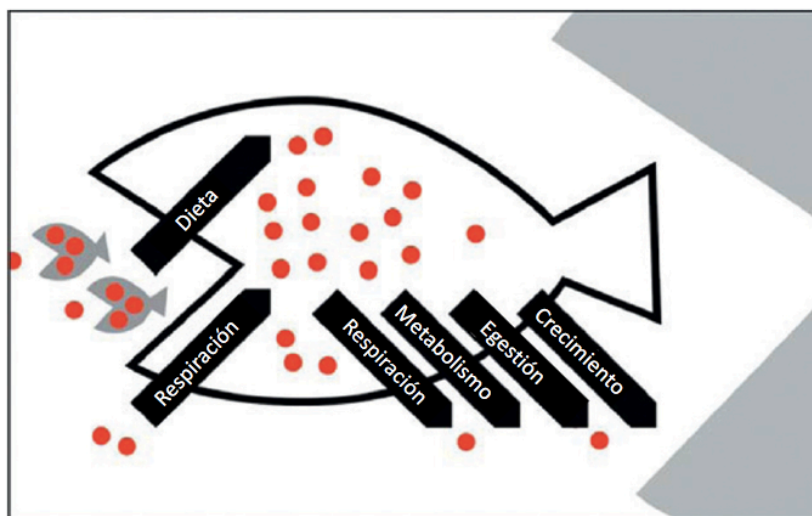


Figura 5. Bioacumulación de contaminantes (puntos rojos) en un organismo (pez) como un resultado neto de consumo y pérdidas (flechas)³¹.

1.4. Metodologías de extracción, análisis de filtros UV y almizcles en biota

Los filtros UV y almizcles tienen un Log K_{ow} entre 4 y 8, por esta razón se detectaron en varios organismos acuáticos, incluyendo peces, mejillones, almejas y delfines. En consecuencia, existe una creciente necesidad por desarrollar métodos analíticos confiables, rápidos, sensibles y selectivos en particular en dos direcciones: por un lado que tengan alta sensibilidad para permitir la determinación de estos compuestos a nivel de ultratrazas (menor a 1 ppm de acuerdo con la IUPAC) y, por otro, que sean versátiles para analizar simultáneamente diferentes tipos de PCPs con propiedades fisicoquímicas diversas^{7,8}.

Se han reportado diversos procedimientos analíticos para determinar PCPs en organismos acuáticos que involucran tratamiento de la muestra, limpieza, separación y detección (Tabla 2). La separación y detección se realizan, principalmente, por cromatografía de líquidos (LC) o cromatografía de gases (GC) generalmente acopladas a espectrometría de masas (MS). También se utilizan acopladas a espectrometría de masas en tándem (MS/MS), debido a su selectividad y sensibilidad; con este sistema se alcanzan límites de cuantificación muy bajos, a nivel de ng/g (MS) y pg/g (MS/MS)^{33,34}. Usualmente los análisis se realizan con impacto electrónico y la cuantificación se realiza por monitoreo selectivo de iones (SIM, por sus siglas en inglés).

Tabla 2. Determinación de filtros UV y almizcles en biota

Analito	Organismo	Técnica de extracción	Limpieza	Análisis	Referencia
Filtros UV	Peces	PLE	SPE (fase C ₁₈)	LC-MS	35
Filtros UV	Peces	MSPD	Co-columna de florisil	GC-MS	18
Filtros UV	Peces	PLE	SPE (fase C ₁₈)	LC-MS/MS	36
Filtros UV	Peces	Extracción sólido-líquido	GPC y columna de sílice	GC-MS	37
Filtros UV	Peces	Soxhlet	GPC y columna de florisil	LC-MS/MS	38
Filtros UV	Peces	Extracción sólido-líquido	GPC y columna de sílice	GC-MS	39
Filtros UV	Peces	Extracción sólido-líquido	LC en fase reversa (C ₁₈)	LC-MS/MS	40
Filtros UV	Mejillones	MAE	LC en fase reversa (C ₁₈)	GC-MS/MS	41
Filtros UV y almizcles	Peces	Extracción sólido-líquido	Columna de sílice y GPC	GC-MS/MS	42
Filtros UV y almizcles	Peces, mejillones, almejas y macroalgas	Almizcles: PLE Filtros UV: QuEChERS	Almizcles: DLLME	GC-MS/MS	43
Filtros UV	Delfines	PLE	SPE (fase alúmina)	LC-MS/MS	44
Almizcles	Peces	Extracción sólido-líquido	GPC	GC-HRMS	45
Almizcles	Peces	Soxhlet	GPC y SPE (fase sílice)	GC-MS	46
Almizcles	Oso polar, nutrias, focas, delfines	Soxhlet	GPC y SPE (fase sílice)	GC-MS	47
Almizcles	Marsopas, tiburones	Soxhlet	GPC y SPE (fase sílice)	GC-MS	48

PLE: extracción con líquidos presurizados; MSPD: dispersión de matriz en fase sólida; MAE: extracción asistida con microondas; QuEChERS: acrónimo en inglés de rápido, fácil, económico, eficaz, robusto y seguro, técnica de extracción en fase sólida dispersiva; SPE: extracción en fase sólida; GPC: cromatografía por permeación en gel; DLLME: microextracción líquido-líquido dispersiva; LC: cromatografía de líquidos; GC: cromatografía de gases; MS: espectrometría de masas; HRMS: espectrometría de masas de alta resolución.

Los almizcles son fácilmente analizados por GC debido a su estabilidad térmica, para esto se han utilizado diferentes inyectores (split/splitless, vaporización a temperatura programada (PTV) y on-column) siempre y cuando la muestra esté libre de lípidos y otras macromoléculas⁴⁹. Los filtros UV, generalmente, son determinados por LC en productos cosméticos mientras que para análisis ambientales se prefiere GC, aunque ambas técnicas se han utilizado para el análisis de biota. Cuando los filtros UV son muy polares o térmicamente inestables se requiere un paso adicional de derivatización para analizarlos por GC-MS²⁸. Estos métodos producen resultados precisos y con una alta especificidad por los compuestos de interés, pero tienen la desventaja de que son laboriosos y requieren tiempos largos de análisis. Además, es necesario sacrificar a los organismos lo que significa que un animal debe ser utilizado por cada análisis y repetición, lo que disminuye la precisión de los resultados debido a la variación inter-organismo⁵⁰.

Por otro lado, el tratamiento de la muestra generalmente incluye preparación de muestra y limpieza, que son pasos críticos. Particularmente el análisis de contaminantes en biota es obstaculizado por la presencia de interferentes presentes en las matrices complejas, porque tienen una gran cantidad de compuestos que son co-extraídos con los analitos y pueden afectar su respuesta. Además, la mayoría de los PCPs se encuentran a nivel de trazas en organismos acuáticos^{33,34}. Para resolver estos problemas se requiere usar técnicas de preparación de muestra, cada una apropiada para diferente tipo de analitos y matrices, lo que hace difícil el análisis⁵¹.

En lo que respecta a los organismos acuáticos los más analizados son los peces, una matriz representativa del ambiente acuático, que se asume es capaz de bioacumular PCPs lipofílicos. La muestra comúnmente analizada es el músculo, probablemente debido a que representa entre un 35-60% del peso del pez. Su composición bioquímica contiene aproximadamente 75% agua, 20% proteína, 1% de glicógeno y un bajo contenido de grasa en comparación con otros tejidos (entre 1-10%). Sus principales componentes son tejido fibroso, conectivo, adiposo, vascular y nervioso, la mayor parte de los contaminantes se concentran en él y, además, es la parte de consumo humano⁵². En la mayoría de los procedimientos, las muestras de biota se deben homogenizar y secar antes de la extracción. Los filtros UV y almizcles se extraen comúnmente con alta temperatura y disolventes de polaridad media. Se utilizan generalmente técnicas como Soxhlet y extracción con líquidos presurizados (PLE), sólido-líquido o asistida con microondas (MAE), asumiendo que los compuestos lipofílicos serán co-extraídos con los analitos. Posteriormente, es

necesario realizar una limpieza que se realiza usualmente en dos pasos. Primero para remover los lípidos y otras macromoléculas co-extraídas de la matriz se usa la cromatografía de exclusión (especialmente la cromatografía de permeación en gel), seguido de una limpieza por cromatografía de adsorción con columnas de sílice, florisil o alumina. Algunas veces también se usa LC en fase reversa para purificar los extractos ya que es una alternativa apropiada cuando se tiene un amplio intervalo de propiedades fisicoquímicas en los analitos. Este paso es crucial para evitar contaminación en el sistema cromatográfico, respuestas inestables del detector y efecto matriz. Este último se compensa con el uso de surrogados y estándares internos (generalmente compuestos marcados isotópicamente). La cuantificación de filtros UV y almizcles por calibración con estándar externo no se recomienda^{28,49}.

Para disminuir la dificultad y el tiempo de análisis, se han desarrollado técnicas de microextracción, que además de reducir el consumo de disolventes y el tamaño de la instrumentación, facilitan la rápida y apropiada preparación de muestras. Entre estas tenemos a la microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés), esta es una técnica desarrollada para el análisis de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles en diferentes matrices. Se basa en la utilización de fibras recubiertas con materiales adsorbentes que se exponen a la muestra por un tiempo definido para extraer los analitos, con esto se integra la extracción y preconcentración en un solo paso. Su modalidad *in vivo* se ha aplicado exitosamente en la extracción de fármacos en músculo de pescado⁵³. Otra técnica muy utilizada es la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés), que consiste en dispersar la muestra en un adsorbente adecuado y realizar la limpieza y elución de los analitos con volúmenes bajos de disolventes. Se puede miniaturizar y es muy selectiva con la combinación adecuada de materiales dispersantes y de limpieza, es decir es posible realizar la extracción y limpieza en un solo paso. Se ha utilizado con éxito en la extracción de fármacos y productos de cuidado personal en biota¹⁸.

Existen pocas referencias donde se utilice la MSPD^{18,54,55} e *in vivo* SPME⁵⁶ para el análisis de PCPs en peces. Estas dos técnicas son más recientes que la extracción Soxhlet y han demostrado buen desempeño en la extracción de diferentes tipos de contaminantes. La MSPD e *in vivo* SPME se utilizaron en el presente trabajo por lo que se describen con mayor detalle a continuación.

1.5. Dispersión de matriz en fase sólida

La MSPD es una técnica de preparación de muestras introducida en 1989 por Steven A. Barker, involucra el macerar muestras sólidas, semi-sólidas o altamente viscosas con un soporte sólido, que sirve como un abrasivo. Inicialmente las muestras se maceran manualmente con un adsorbente sólido, como sílice derivatizada para enlazarle una fase orgánica como C₁₈, en un mortero de vidrio o ágata, utilizando un pistilo para romper la estructura de la matriz y lograr una distribución homogénea alrededor de las partículas del adsorbente. Los componentes de la muestra se distribuyen en la superficie con base en sus polaridades relativas. Los componentes no polares se dispersan en la fase orgánica no polar basados en sus coeficientes de distribución. Las moléculas pequeñas altamente polares (como agua) se asocian con los grupos silanol en la superficie de la partícula de sílice y dentro de los poros del soporte sólido, así como los componentes de la matriz capaces de formar puentes de hidrógeno. Las moléculas grandes menos polares se distribuyen en toda la superficie bifásica, estructura soporte sólido/muestra dispersada-lípidos^{57,58}.

El material macerado se transfiere y empaca en un cartucho, normalmente de polipropileno, para realizar una elución secuencial con disolventes. Este se empaca con una nueva fase que consiste en los componentes macerados de la muestra y su distribución en el soporte sólido, esta fase tiene un carácter único para el fraccionamiento de la muestra. La capa delgada y homogénea de muestra alrededor de las partículas del dispersante lleva a un proceso de transferencia de masa muy eficiente. Posteriormente, se puede usar un disolvente o una secuencia adecuada de disolventes para limpiar la columna o directamente aislar los analitos. Se pueden incorporar co-columnas, que consisten en otro soporte sólido con comportamiento de adsorción diferente al dispersante, para ayudar en el aislamiento del analito o para limpieza del extracto. Algunas ventajas de la MSPD son: que reduce el consumo de disolventes, la manipulación de la muestra y el tiempo total de análisis. Tiene muchas aplicaciones debido a que elimina la mayoría de las complicaciones de usar Soxhlet o extracción sólido-líquido^{58,59}.

En la MSPD se emplean adsorbentes de fase reversa como dispersantes, siendo el más usado la sílice octadecil (C₁₈); también se han utilizado materiales C₈ y C₃₀. Otros adsorbentes utilizados son sílice con amino-propil o aminos primarias y secundarias cuando se tienen muestras con alto contenido de lípidos. Los adsorbentes de fase normal florisil, alúmina y sílice también se han usado

como dispersantes, éstos interaccionan con los componentes de la muestra únicamente por adsorción y no son capaces de disolver la matriz de la muestra como los adsorbentes en fase reversa. También se han utilizado materiales inertes como arena, tierra de diatomeas o celita, aunque éstos tienen una menor selectividad⁵⁷. Actualmente, se han utilizado algunos otros adsorbentes como los polímeros moleculares impresos, que son compuestos sintéticos que tienen una alta selectividad, por lo que se usan para la extracción de moléculas específicas. También el grafeno, que tiene una gran área superficial por tanto mejora la capacidad de adsorción; microesferas de óxido de magnesio funcionalizadas con feniltriclosilano, que tienen una gran afinidad por compuestos no polares y evitan la extracción de compuestos clorados; atapulgita modificada con polietilenimina, para la extracción de metales como el cadmio, entre otros⁶⁰.

La selección de los eluyentes se realiza en función de la polaridad del analito. Las sustancias no polares se pueden recuperar usando disolventes como hexano, diclorometano o mezclas de ambos. Cuando los analitos tienen una polaridad intermedia o alta, se utilizan disolventes como acetonitrilo, acetona, acetato de etilo, o mezclas de agua con etanol o metanol⁵⁸.

El procedimiento para realizar un análisis con MSPD se describe de manera detallada a continuación y se ilustra en la Figura 6.

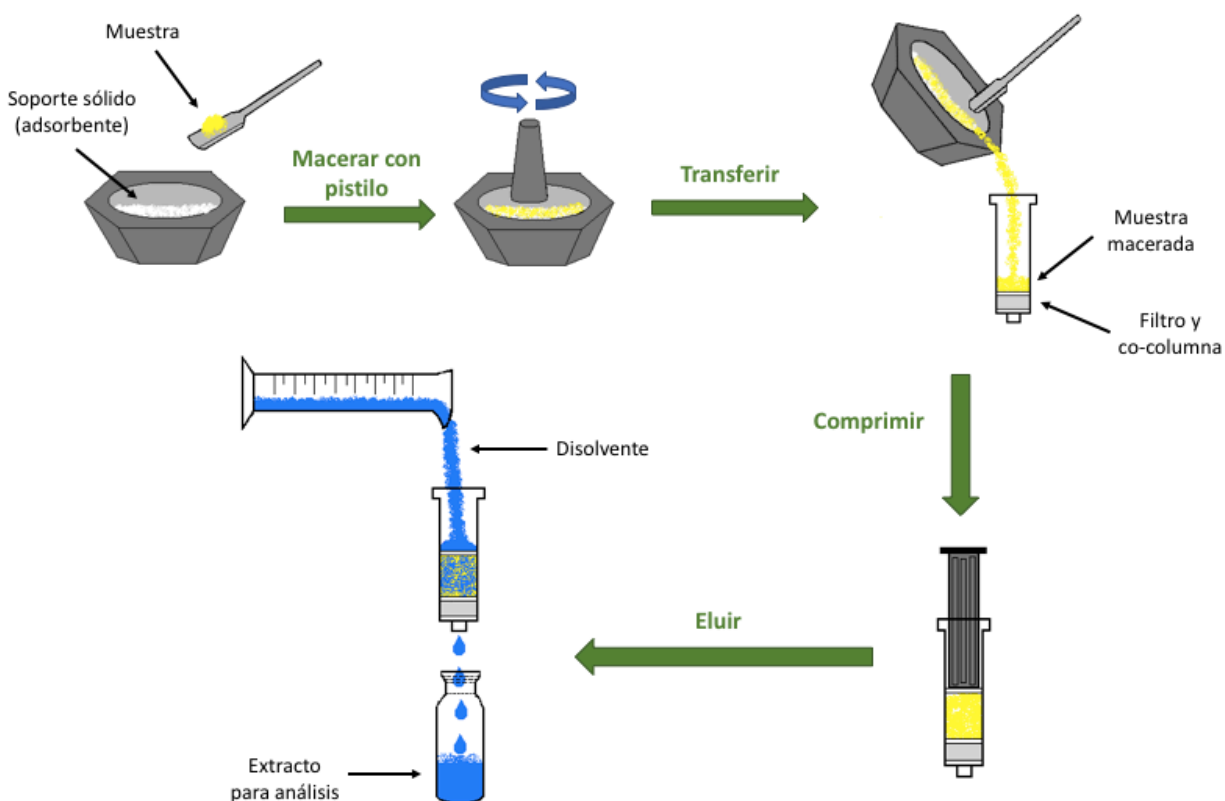


Figura 6. Procedimiento de MSPD (adaptado de referencia 57).

- a) **Macerar:** una muestra viscosa, semi-sólida o sólida se coloca en un mortero y se macera con un soporte sólido (adsorbente), usando un pistilo para obtener una completa ruptura y dispersión de la muestra. La cantidad de adsorbente depende del tipo de muestra, comúnmente las proporciones de muestra/adsorbente van de 1:1 a 1:4. El proceso de macerado no requiere de un esfuerzo vigoroso, diferentes analistas pueden aplicar diferentes cantidades de presión o pueden obtener diferentes grados de dispersión de la muestra, sin embargo de manera general se obtienen resultados similares con poca variabilidad.
- b) **Transferir y empacar:** una vez completo el proceso de macerado, la muestra se puede empacar en un cartucho de SPE u otro dispositivo apropiado (como una columna de vidrio) con un filtro en el fondo para retener la muestra, y si es necesario una co-columna con un adsorbente diferente al soporte sólido. Se puede colocar un segundo filtro encima de la muestra antes de su compresión. Para empacar la columna se comprime usando un émbolo, se debe evitar la formación de canales sin compactar de manera excesiva el macerado.

c) **Elución:** es posible utilizar un solo disolvente o una mezcla para eluir los compuestos de interés, se pueden realizar eluciones múltiples o secuenciales de la muestra. Este procedimiento permite aislar un solo compuesto, una clase e incluso varios tipos. Por ejemplo cuando se usa adsorbente de sílice C₁₈ se eluye con una secuencia de disolventes empezando con el menos polar (hexano) e incrementando la polaridad (acetato de etilo, acetonitrilo, metanol) hasta llegar al agua⁵⁷.

La técnica de MSPD se ha aplicado al análisis de una gran variedad de contaminantes orgánicos en frutas, vegetales y tejidos animales, entre otras matrices. En análisis ambiental esta técnica y algunas de sus variantes (como la MSPD asistida con vortex) se aplicó para extraer contaminantes orgánicos e inorgánicos de muestras de pescado, camarón, calamar, almeja, entre otros. Los contaminantes incluyen metales, pesticidas y fármacos, una descripción detallada de aplicaciones recientes de la MSPD se presenta en la Tabla 3. La principal ventaja de la MSPD, comparada con las extracciones clásicas de sólido-líquido y Soxhlet, es que el aislamiento y purificación del analito se realiza en un solo paso, por lo que se reduce el consumo de disolventes y el tiempo de análisis. Sin embargo, algunas de sus limitaciones son el empaque manual de los cartuchos y el flujo de elución, se necesita de personal con experiencia en la técnica para lograr buena precisión y un recobro óptimo de los analitos⁶¹.

Tabla 3. Aplicaciones de MSPD para el análisis de contaminantes orgánicos e inorgánicos en organismos acuáticos.

Matriz	Analito	Técnica	Análisis	Referencia
Pescado	Clorotalonil, diclofluanida, DCOIT, TCMTB	VA-MSPD	GC-ECD	62
Pescado	Irgarol, diuron	VA-MSPD	LC-MS	63
Surimi, calamar	Cadmio	MSPD	AAS	64
Pescados, caviar	Colorantes	MSPD	LC-DAD	65
Pescado, camarón, ostión, almeja	Pesticidas organoclorados y bifenilos policlorados	MSPD	GC-MS/MS	66
Pescado	Mercurio	MWCNTs-MSPD	AFS	67
Pescado	Sulfonamidas	PT-MSPD	LC-MS/MS	68
Pescado, camarón, calamar, cangrejo	Verde de malaquita	MIPs-MSPD	LC-UV/VIS	69
Pescado	Fármacos	VA-MSPD	LC-MS/MS	70
Pescado	Fármacos	MSPD	LC-MS/MS	71
Pescado	Hipoxantina, inosina	MIPs-MSPD	LC-DAD	72
Moluscos	Compuestos organofosforados, pesticidas organoclorados, almizcles policíclicos, bifenilos policlorados, éteres difenilo polibromados, PAHs,	MSPD	GC-MS/MS	73
Pescado	Retardantes de llama clorados	MSPD	GC-MS	74
Pescado	Fluoroquinolonas	MIPs-MSPD	LC-FLD	75
Pescado	Filtros UV	MSPD	GC-MS/MS	55
Pescado, camarón	Fármacos	MSPD	LC-MS/MS	76
Pescado	Triclosán	VA-MSPD	LC-MS/MS	54
Pescado	PAHs	UA-MSPD	GC-MS	77
Pescado	Filtros UV	MSPD	GC-MS	18
Pescado	Compuestos organoclorados	MSPD	GC-MS	78
Ajolote	Pesticidas organoclorados	MSPD	LC-DAD	79

MSPD: dispersión de matriz en fase sólida; VA: asistida con vortex; UA: asistido con ultrasonido; MWCNTs: nanotubos de carbono de multipared; PT: punta de pipeta; MIPs: polímeros moleculares impresos; GC: cromatografía de gases; ECD: detector de captura de electrones; LC: cromatografía de líquidos; MS: espectrometría de masas; AAS: espectroscopia de absorción atómica; DAD: Detector de arreglo de diodos; AFS: espectrometría atómica de fluorescencia; UV/VIS: detector ultravioleta/visible; FLD: detector de fluorescencia; DCOIT: 4,5-dicloro-2-n-octil-4-isotiazolina-3-ona; TCMTB (1,3-Benzotiazol-2-ilsulfanil)metil tiocianato; PAHs: hidrocarburos aromáticos policíclicos.

1.6. SPME / *in vivo* SPME

SPME

La microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés) se introdujo en la década de 1990 por Janusz Pawliszyn, es una técnica miniaturizada que consiste en el uso de fibras recubiertas con materiales adsorbentes que son expuestos a la muestra por un tiempo definido para la extracción de los analitos, posteriormente se retiran y analizan por cromatografía de gases o líquidos. La SPME se desarrolló para satisfacer la necesidad de métodos de preparación de muestra rápidos, libres de disolventes y compatibles para trabajo en campo. En combinación con cromatografía de gases se ha aplicado exitosamente a una gran variedad de compuestos, especialmente para la extracción de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles de muestras ambientales, biológicas y alimenticias. También se acopló con cromatografía de líquidos y electroforesis capilar para analizar compuestos poco volátiles o termolábiles. Proporciona ventajas sobre los métodos de muestreo convencionales al integrar la extracción del analito, concentración e introducción de la muestra en el sistema cromatográfico en un solo paso^{80,81}. De acuerdo con la teoría de SPME, la cantidad de analito extraída por la fibra en el equilibrio es proporcional a su concentración en la muestra, de acuerdo con las siguientes ecuaciones.

Si la masa total del analito se define como:

$$n_0 = n_f + n_s \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde: n_0 = masa total del analito
 n_f = cantidad del analito extraída por la fibra
 n_s = cantidad del analito en la muestra

Reescribiendo en función de la concentración y el volumen:

$$C_0V_s = C_sV_s + C_fV_f \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde: C_0 = concentración total del analito en la muestra
 V_s = volumen de la muestra
 C_s = concentración del analito en la muestra
 V_f = volumen de la fibra
 C_f = concentración del analito en la fibra

La constante de distribución se define como:

$$K_{fs} = \frac{C_f}{C_s} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde: K_{fs} = constante de distribución del analito entre el recubrimiento de la fibra y la muestra

C_f = concentración del analito en la fibra

C_s = concentración del analito en la muestra

Despejando C_f de la Ecuación 3 y sustituyendo en la Ecuación 2:

$$C_f = C_0 \frac{K_{fs}V_s}{K_{fs}V_f + V_s} \quad \text{Ecuación 4}$$

Si definimos la cantidad del analito en la fibra como:

$$n_f = C_f V_f \quad \text{Ecuación 5}$$

Despejando C_f de la Ecuación 5 y sustituyendo en la Ecuación 4 tenemos:

$$n_f = \frac{C_0 K_{fs} V_s V_f}{K_{fs} V_f + V_s} \quad \text{Ecuación 6}$$

La Ecuación 6 indica que la cantidad de analito extraída por la fibra (n_f) es linealmente proporcional a la concentración del analito en la muestra (C_0), que es la base analítica para la cuantificación usando SPME.

Cuando el volumen de la muestra es grande ($V_s \gg K_{fs}V_f$), entonces la ecuación se simplifica:

$$n_f = C_0 K_{fs} V_f \quad \text{Ecuación 7}$$

Es decir, no es necesario definir un tamaño de muestra específico (este puede ser desconocido) ya que no tiene impacto en los resultados y la fibra puede exponerse directamente a la matriz. En esta ecuación la cantidad extraída del analito es independiente del volumen de la muestra y corresponderá directamente a su concentración en la matriz. Al eliminar la toma de muestra se disminuye el tiempo de análisis y se evitan errores asociados con la descomposición o adsorción del analito en las paredes del contenedor, que es importante para el muestreo en sitio^{82,83}.

Además, la tecnología es fácil de miniaturizar lo que la hace apropiada para sistemas pequeños e instrumentos microanalíticos, esto hace a SPME ideal para los ensayos *in vivo*⁸⁴.

Análisis *in vivo* SPME

La investigación *in vivo* es importante ya que es una buena representación de lo que sucede en un sistema biológico complejo. Debido a que los analitos no se extraen de manera exhaustiva del sistema que se investiga, se evita la perturbación del balance normal de los compuestos en los organismos. Un muestreo *in vivo* también puede eliminar errores, reducir el tiempo asociado con el transporte y almacenamiento de la muestra para obtener datos analíticos más exactos. Una técnica ideal de muestreo *in vivo* debe ser portátil, libre de disolventes e integrar en un solo paso muestreo, preconcentración, limpieza y análisis. Actualmente las técnicas que cumplen con estas características y se aplican en análisis *in vivo* son la microdiálisis, biosensores, microfluídica, nanomateriales y SPME. Además, si estas técnicas se usan en conjunto con instrumentos altamente selectivos como GC-MS o LC-MS, se mejora la confiabilidad y exactitud de los resultados obtenidos^{82,85}.

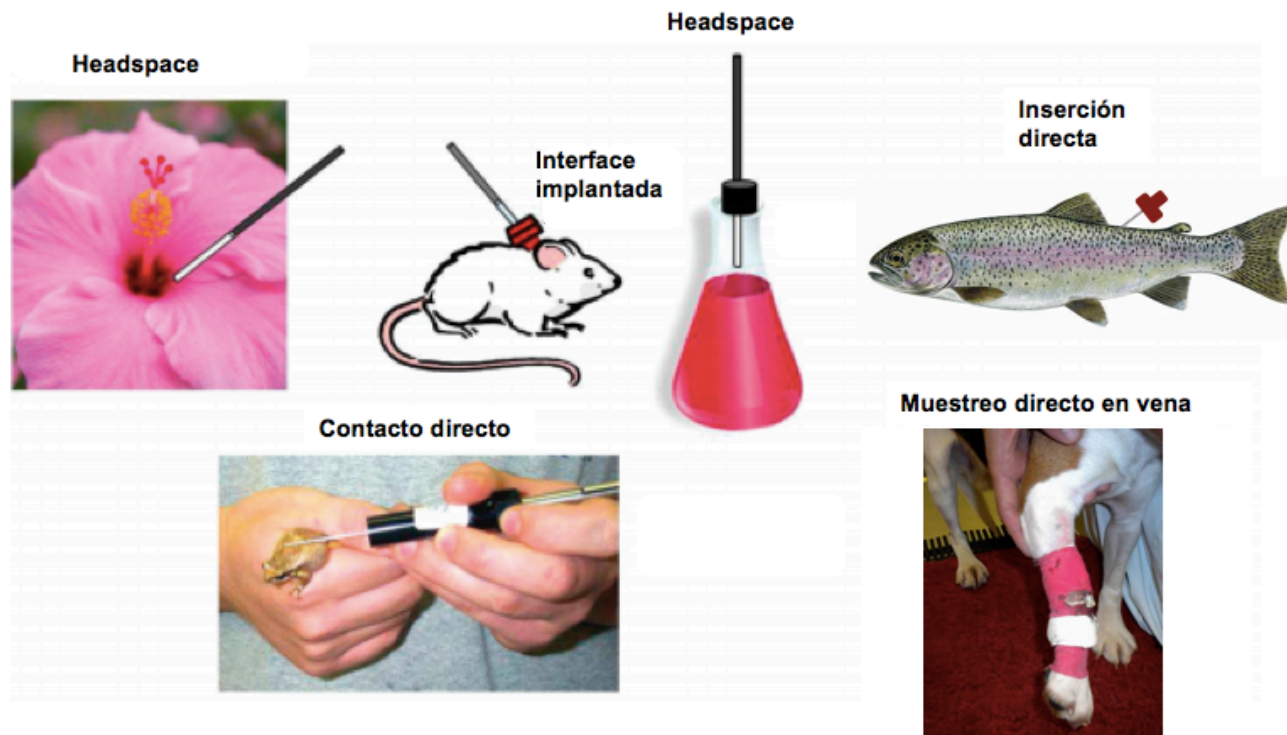
La microdiálisis emplea un catéter compuesto por una sonda, revestida en su punta con membranas semipermeables de diálisis, se basa en la capacidad de los analitos para atravesarlas hasta alcanzar el equilibrio en ambos lados; la sonda es implantada en el tejido y perfundida con una velocidad de flujo lenta para realizar el muestreo⁸⁶. Esta técnica tiene problemas importantes como la pérdida del fluido de perfusión, las membranas se obstruyen fácilmente, requiere el uso de tubería y bombas, lo que genera dificultad para obtener datos cuantitativos confiables. Los biosensores se desarrollaron para el análisis de compuestos dentro de los animales, consiste en implantar en el organismo un sensor específico con un transductor asociado, el dispositivo produce una señal que es proporcional a los compuestos que detecta. Su principal limitación es que normalmente responde a una gran cantidad de compuestos en lugar de ser específico para uno solo, por esto es muy susceptible a presentar interferentes lo que limita su exactitud y sensibilidad, además son difíciles de producir. Los sistemas microfluídicos usan un volumen pequeño de muestra y reactivos acoplados con métodos de detección integrados, éstos son complejos, en la mayoría de los casos requieren reservorios de reactivos, así como sistemas ópticos, bombas y detectores externos para controlar las señales de respuesta, por esto su aplicación *in vivo* es

problemática. Finalmente, el uso de nanomateriales en sensores se utiliza en muchas nuevas tecnologías de transducción de señales, pero los nanosistemas presentan citotoxicidad, por consiguiente, su aplicación *in vivo* es muy limitada⁸⁷.

***In vivo* SPME**

En años recientes una de las técnicas más prometedoras para análisis *in vivo* es SPME. Ésta consiste en la inmersión directa del recubrimiento de la fibra en un sistema vivo con el fin de extraer el analito sin necesidad de tomar una muestra representativa del fluido o tejido del sistema vivo. Con SPME acoplado a sistemas cromatográficos se obtienen señales que son proporcionales a la concentración libre del analito, con lo que se puede definir la fracción biodisponible. Sin embargo, este procedimiento es más exigente que el muestreo convencional, como consecuencia se desarrolló un nuevo formato de fibras más resistentes, biocompatibles y esterilizables para evitar reacciones adversas en el sistema vivo^{88,89}. Como fases extractantes se han utilizado polipirrol, polietilenglicol, polidimetil siloxano (PDMS) y sílice C18, debido a su biocompatibilidad. Las dos primeras son hidrofílicas y tienen el problema de la adsorción de proteínas y macromoléculas (masa molecular mayor a 10 000 uma) en la superficie de la fibra, que ponen una barrera de difusión y disminuyen su capacidad extractante. La PDMS y sílice C18 son las fases más utilizadas, estas son lipofílicas y se combinan con membranas biocompatibles (como poliuretano, quitosan, celulosa y poliacrilonitrilo) para evitar la adsorción de macromoléculas⁹⁰. La biocompatibilidad se refiere al no rechazo de dispositivos artificiales que están en contacto con un tejido vivo, la incompatibilidad puede llevar a reacciones tóxicas o un rechazo inmunológico, un material se considera biocompatible si la suma de la respuesta humoral adversa y las reacciones celulares que ocurren durante la exposición son menores que para un material de referencia⁸².

El diseño de las fibras *in vivo* incorporó un soporte mecánicamente fuerte, flexible y una fibra resistente. Para los procedimientos de muestreo *in vivo* existen diferentes modalidades como son espacio de cabeza (headspace), contacto directo, inserción directa, interfase implantada y muestreo directo en vena, como se ilustra en la Figura 7⁸⁸.

Figura 7. Modalidades de muestreo *in vivo* SPME

El muestreo *in vivo* SPME se describe en la Figura 8, de éstas las modalidades más utilizadas son inserción directa y headspace. En inserción directa, la fibra se inserta en la muestra y los analitos se transportan directamente de la matriz a la fase de extracción. Este modo es muy utilizado para muestrear compuestos no volátiles o semivolátiles, como el muestreo de fármacos en tejido animal. Los analitos se desorben de la fase de extracción con un disolvente e inyectados en el sistema cromatográfico. En el headspace, la fibra se inserta por encima de la matriz. Solo los compuestos relativamente volátiles se extraen con este modo, lo que lo hace apropiado para muestrear la respiración, así como emisiones de compuestos volátiles de plantas, animales, insectos y microorganismos.

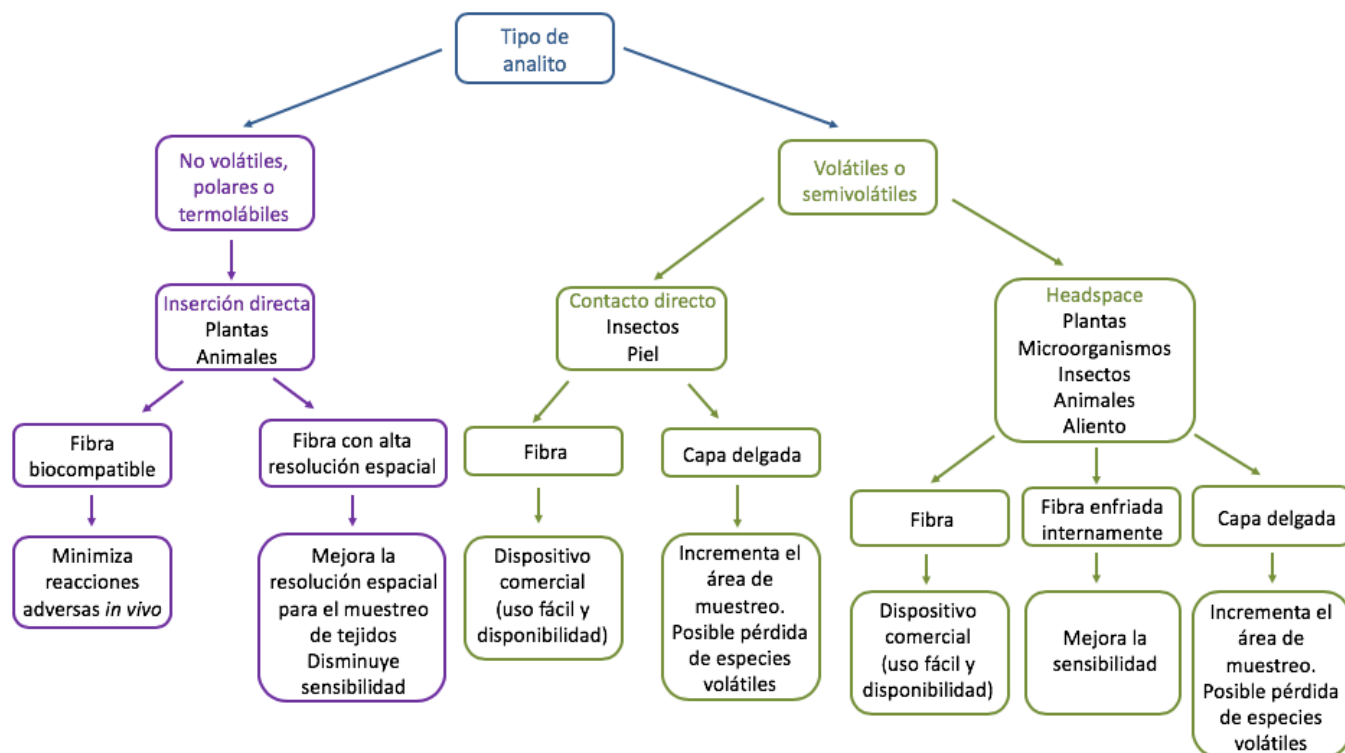


Figura 8. Selección de la modalidad de muestreo y tipo de dispositivo para *in vivo* SPME de acuerdo con el tipo de analito ⁸⁰

Un dispositivo *in vivo* disponible comercialmente, consiste en una fibra recubierta con un adsorbente poroso de sílice C_{18} soportado en un polímero biocompatible, que eno se hincha y resiste los componentes biológicos de la matriz, éste se adhiere a un alambre de una aleación de metales flexibles (0.02 cm de diámetro) que se encuentra dentro de una aguja hipodérmica calibre 22 con un sello incorporado para prevenir pérdidas del analito durante el muestreo (Figura 9). La aguja se utiliza para proteger el recubrimiento durante el almacenamiento y transporte, así como para perforar el tejido. Después de la extracción, la desorción se realiza en un volumen pequeño de disolvente (50-200 μ L). Debido a que la fase es C_{18} la extracción se realiza por absorción. El dispositivo se puede utilizar *in vivo* o *in vitro* y tiene como ventajas:

- a) es biocompatible, por lo que previene reacciones adversas y/o tóxicas durante el muestreo y minimiza obstrucción de la superficie del recubrimiento por adhesión de macromoléculas presentes en la muestra;

- b) está inmovilizado en una aleación de metales flexibles que lo hacen suficientemente robusto para análisis *in vivo*;
- c) es compatible con la mayoría de los disolventes orgánicos para facilitar la desorción⁸⁰.

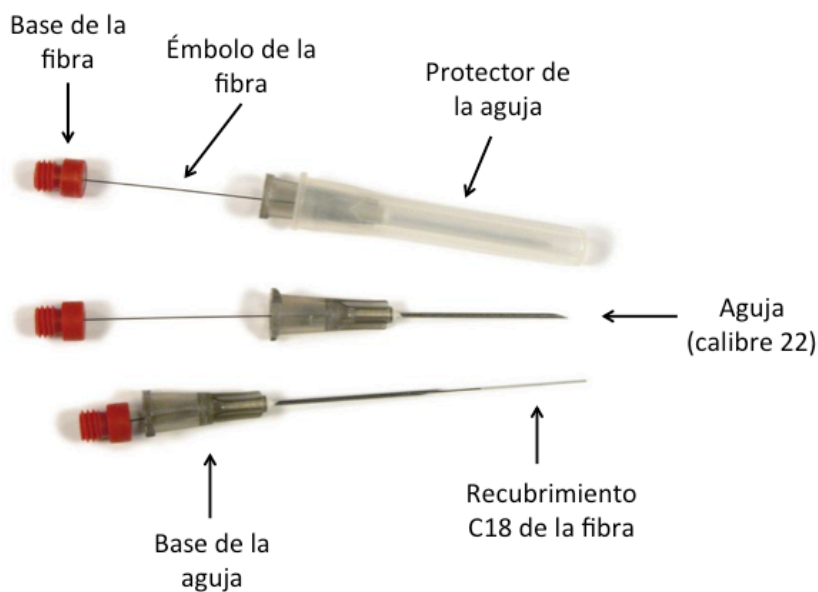


Figura 9. Fibras *in vivo* SPME comerciales

1.6.1. Aplicaciones *in vivo* SPME

In vivo SPME es una alternativa excelente a los métodos clásicos para separar los analitos de interés de las muestras biológicas. Es más sencillo, rápido y proporciona extractos mucho más limpios que otros métodos como la extracción sólido-líquido, líquido-líquido o en fase sólida. La Figura 10 resume los pasos típicos de un proceso de trabajo *in vivo* SPME en combinación con LC-MS y GC-MS, en éste se muestra la rapidez del protocolo entero⁸⁰.

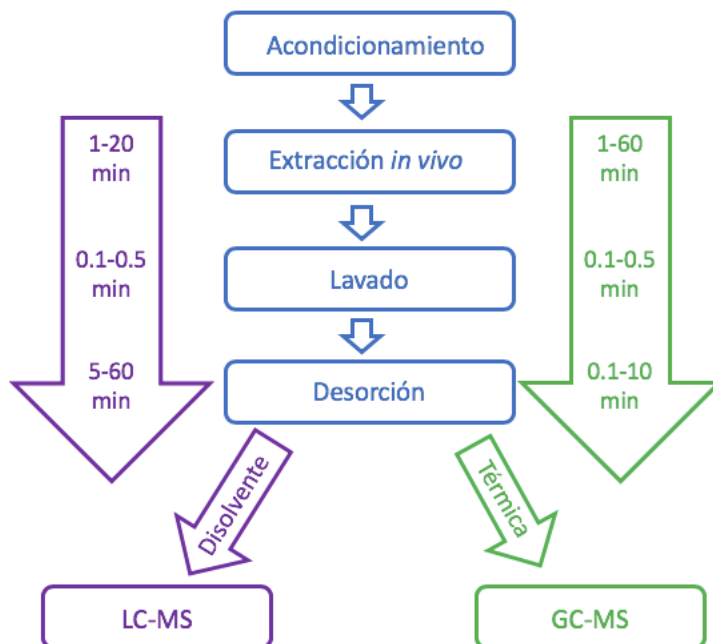


Figura 10. Proceso de trabajo completo de *in vivo* SPME en combinación con GC-MS y LC-MS.

Las primeras investigaciones *in vivo* se centraron en compuestos emitidos por insectos, hongos y bacterias. Estas se extendieron a analitos biogénicos volátiles emitidos por plantas y animales. Recientemente la tecnología de *in vivo* SPME se ha usado para el muestreo de animales⁸². Inicialmente la técnica tuvo un enfoque clínico, se aplicó a estudios farmacocinéticos de diferentes fármacos directamente en las venas de animales (principalmente perros)^{91,92}, y para utilizarse en pequeños roedores (ratones y ratas) se desarrolló una interfase especializada de muestreo debido a la dificultad de estos análisis por el volumen limitado de sangre (< 2 mL/ 25 g ratón)^{93,94}. Por otro lado, las aplicaciones ambientales de la técnica *in vivo* SPME están enfocadas principalmente en la extracción de fármacos del músculo de peces usando el modo de inserción directa, también se han extraído algunos PCPs (almizcles sintéticos y retardantes de llama), algunas de sus aplicaciones ambientales se muestran en la Tabla 4. Una de las ventajas de utilizar *in vivo* SPME para estos análisis es que se puede extraer trazas de contaminantes orgánicos de tejidos de peces con un muestreo no letal, que permite monitorear la presencia de un analito en el mismo pez por varios días, además esta técnica demostró la misma certeza que las técnicas convencionales de análisis con menos pasos y un sistema mucho más simple.

Tabla 4. Aplicaciones *in vivo* SPME para detectar contaminantes en peces

Analito	Especie de pez	Tipo de fibra	Análisis instrumental	Referencias
Fármacos (diltiazem, difenhidramina, carbamazepina, fluoxetina, norfluoxetina, ibuprofeno, sertralina, paroxetina, atorvastatina, diclofenaco, vanlafaxina, gemfibrozil, atrazina, naproxeno)	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>), Lechón blanco (<i>Catostomus commersoni</i>), Muskallonga americano (<i>Esox masquinongy</i>), Dardo de costado verde (<i>Etheostoma blennioides</i>)	PDMS (165 μm)	LC-MS/MS	95-101
Fármacos (ácido tolfenámico, ácido mefenámico, gemfibrozil, ácido flufenámico, fluoxetina, norfluoxetina)	Tilapia (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	Nanofibras de poliestireno/dopamina-glutaraldehído	LC-MS/MS	102
Fármacos (fluoxetina, norfluoxetina)	Tilapia (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	Silicona con polielectrolito (36.5 μm)	LC-MS/MS	103
Fármacos (carbamazepina, ácido flufenámico, ácido mefenámico, flurbiprofeno, ketoprofeno, ácido tolfenámico, gemfibrozil, naproxeno, ibuprofeno)	Tilapia (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	Cuarzo-polianilina con partículas de poli(dialildimetil amonio)-óxido de grafeno-C18	LC-MS/MS	104
Fármacos (fluoxetina, ácido tolfenámico, ácido mefenámico, ácido flufenámico, duloxetina, sulfadiazina, sulamerazina, sulfametoxazol, sulfafurazol, sulfadimetoxipirimidina, fenacetina)	Tilapia (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	Copolímero poli(ácido láctico-co-caprolactona) dopado con nanopartículas de $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ sulfonadas	LC-MS/MS	105
Fármacos (ácido tolfenámico, ácido mefenámico, ácido flufenámico, gemfibrozil)	Tilapia (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	Nanotubos de carbono-polipirrol-polinorepinefrina	LC-MS/MS	106
Anestésicos (2-phenoxyethanol, benzocaína, isoeugenol, tricaína, eugenol)	Tilapia (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	PDMS	GC-MS	107

Continuación de Tabla 4

Analito	Especie de pez	Tipo de fibra	Análisis instrumental	Referencias
Geosmina y 2-metilisoborneol	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	PDMS	GC-MS	108
Pesticidas organoclorados y organofosforados, y metabolitos de fention	Tilapia (<i>Oreochromis mossambicus</i>) y japuta (<i>Piaractus brachypomus</i>)	PDMS (44 y 165 μm)	LC-MS/MS y GC-MS	109
Almizcles sintéticos	Tilapia (<i>Oreochromis mossambicus</i>)	PDMS (44 μm)	GC-MS	56
4-nonilfenol, 2,4,6-tertbutilfenol, clorpirifos, almizcle xileno, HCB, PCB, 2,5- diclorobifenil, p,p'-DDT, 2,3,4-tricloroanisol, y p-DIPB	Trucha arcoíris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Silicona (160 μm)	GC-MS	110
HAPs, compuestos organoclorados y PBDEs	Trucha marrón (<i>Salmo trutta</i>)	Silicona	GC-MS	111
Tetrodoxina	Pez globo (<i>Fugu</i>)	Nanofibras de poliestireno/dopamina-glutaraldehído	LC-MS/MS	112

1.6.2. Métodos de calibración *in vivo* SPME

Debido a que SPME es una técnica de extracción no exhaustiva, es decir solo una pequeña cantidad del analito se extrae de la matriz, se necesitan métodos de calibración apropiados para el análisis cuantitativo, la cuantificación se basa en la cantidad del analito extraída en condiciones apropiadas. Entre los métodos de calibración que existen para *in vivo* SPME, la extracción al equilibrio y la cinética son las más utilizadas. En la Figura 11 se muestra un criterio para la selección más apropiada dependiendo de lo que requiere la aplicación.

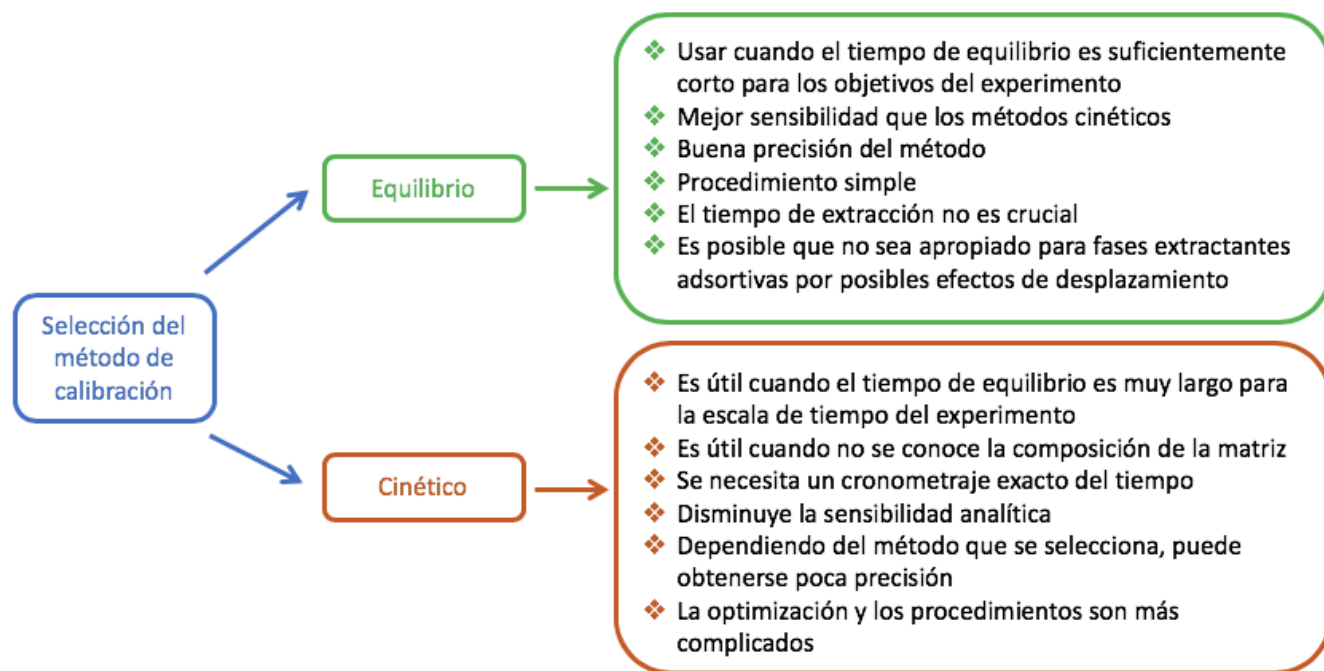


Figura 11. Selección del método de calibración más apropiado para *in vivo* SPME.

Como se mencionó anteriormente, uno de los métodos más usados es la extracción al equilibrio, en donde se utiliza una constante de distribución conocida o una curva de calibración externa para correlacionar la cantidad de analito extraída con la fibra con su concentración en la muestra. Para disminuir el tiempo largo de equilibrio y los efectos de desplazamiento que ocurren cuando se usan adsorbentes porosos, la extracción se puede interrumpir antes de llegar al equilibrio. Aunque se trabaje en el intervalo cinético, existe una relación lineal entre la cantidad del analito extraída y su concentración en la matriz, si la temperatura y el tiempo de extracción se mantienen constantes. Otro método importante para el análisis de campo es la calibración basada en la difusión (basada en la ley de Fick), que elimina el uso de curvas de calibración convencionales. Además de estos métodos “clásicos”, existen los de calibración cinética (KC, por sus siglas en inglés), éstos son más apropiados para análisis *in vivo*⁸².

En la Figura 12 se muestra el perfil de extracción que generalmente se sigue en el proceso de extracción de SPME e *in vivo* SPME, se observa inmediatamente después de que la muestra entra en contacto con la fibra, hay un rápido incremento en la masa adsorbida por la fibra, la velocidad de este incremento disminuye hasta llegar al equilibrio. Si el tiempo de muestreo es menor a t_{95} ,

la extracción es un proceso cinético y si es menor a t_{50} hay una absorción lineal del analito. En los métodos de calibración cinética el corto tiempo de extracción se encuentra comúnmente en la región cinética del perfil. Esto es benéfico para los experimentos *in vivo* porque en esta región la extracción está controlada preferentemente por la difusión a través de la capa límite en lugar de las interacciones cinéticas y/o termodinámicas con el adsorbente¹¹³.

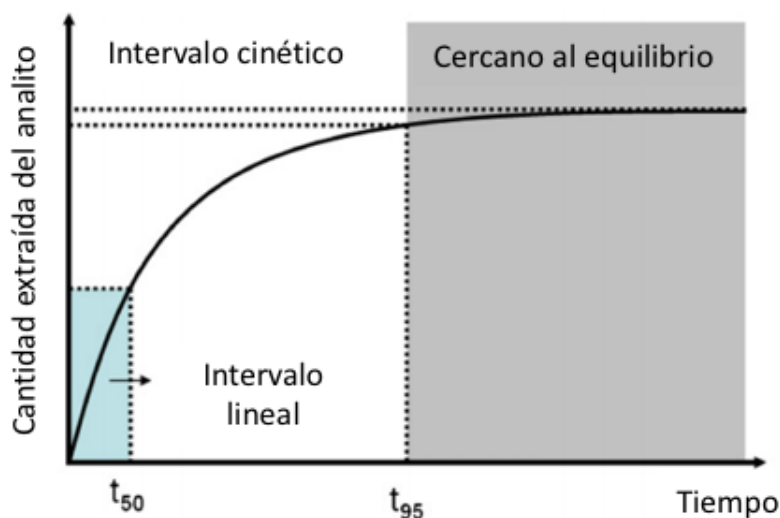


Figura 12. Perfil de extracción típico en SPME

Los métodos de calibración cinética son los más utilizados ya que al muestrear animales vivos no es factible usar tiempos de extracción suficientemente largos para alcanzar el equilibrio. Por ejemplo, con las fibras comerciales *in vivo* SPME C18 de 45 μm de grosor, el tiempo típico requerido para llegar al equilibrio para compuestos polares e hidrofóbicos fue ≤ 5 min y varias horas o días, respectivamente. Entonces, conocer el $\text{Log } K_{ow}$ de los analitos proporciona un buen punto de partida para estimar el tipo de calibración más apropiada para una aplicación determinada¹¹⁴.

Método de estandarización en fibra

La calibración cinética más usada es la estandarización en fibra, que se basa en la difusión controlada del proceso de transferencia de masa. Para esto es necesaria una relación simétrica entre la desorción de la fibra al tejido muestra de un estándar deuterado precargado, y la subsecuente absorción del analito del tejido a la fibra; es decir, si la extracción es controlada por la capa límite de difusión existe simetría entre la adsorción del analito y la desorción del estándar

deuterado precargado. Aunque esto es cierto en la mayoría de los casos, en cada experimento, en particular, es necesario verificar que esta relación se mantiene. Esta simetría se pierde en algunos casos cuando la cinética de la interacción del analito con la superficie del adsorbente es muy lenta y la capa límite muy delgada. Al ser un método de calibración *in situ*, existen diferentes factores que afectan la transferencia de masa SPME (temperatura, interacciones con la matriz, tortuosidad, valores locales de pH y fuerza iónica), que pueden ser compensados con estándares precargados. La calibración se realiza al exponer la fibra con estándares precargados a la muestra por un cierto tiempo y después analizar la fase de extracción. Esta técnica está basada en un modelo matemático que no usa ninguna fórmula empírica y no requiere una velocidad de muestreo lineal. La concentración de los analitos en la muestra se calcula con la siguiente ecuación^{113,115}:

$$C_0 = \frac{q_0 n}{K_{fs} V_e (q_0 - Q)}$$

Donde:

C_0 = concentración de los analitos en la muestra (ng/g)

n = cantidad del analito extraído por la fibra (ng)

q_0 = cantidad de estándar precargado en la fase de extracción (ng)

V_e = volumen de la fase de extracción (mL)

K_{fs} = coeficiente de distribución del analito entre la fase de extracción en la fibra y la muestra (g/mL)

Q = cantidad de estándar remanente en la fase de extracción después de la exposición de la fase de extracción a la matriz por el tiempo de muestreo (ng)

Método de velocidad de muestreo predeterminada

La velocidad de muestreo predeterminada es otro método de calibración cinética desarrollado para evitar el uso de estándares deuterados. Con un modelo lineal, se asume que la velocidad de transferencia de masa permanece constante en toda la extracción. Para un análisis *in vivo* rápido en tejido animal, el tiempo corto de extracción sugiere que el muestreo pasivo seguirá una respuesta lineal. Las diferencias de matriz entre tejidos semisólidos (como el músculo de pescado) son pequeñas para individuos de la misma especie. En consecuencia, se puede predeterminar la velocidad de muestreo de la fibra *in vivo* SPME en condiciones de laboratorio y ser usada en aplicaciones en campo. La ecuación utilizada para la calibración es^{108,114}:

$$C_0 = \frac{n}{R_s t} \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde: C_0 = concentración del analito en la muestra (ng/mg)
 n = cantidad del analito extraída por la fibra (ng)
 R_s = velocidad de muestreo (mg/min)
 t = tiempo de extracción (min)

En esta ecuación R_s representa una constante de proporcionalidad (velocidad de muestreo) y se puede interpretar como la cantidad de tejido del que se extrae el analito por unidad de tiempo de exposición de la fibra. Teóricamente R_s es una función de las propiedades fisicoquímicas y temperatura de la matriz, el recubrimiento y la dimensión de la fibra, así como el coeficiente de difusión y K_{fs} del analito. Los valores de R_s difieren entre especies debido a que la variación en la composición del tejido muscular, sin embargo, son consistentes en individuos intra-especie. Para que esta calibración funcione los valores de R_s deben ser independientes de C_0 y t en el régimen lineal de extracción¹⁰⁹. Existen estudios en donde se reporta que es posible aplicar la constante R_s determinada *in vitro* en músculo de pescado homogeneizado fortificado con los analitos para cuantificar las concentraciones de los analitos en peces vivos^{99,128}. Sin embargo, en otro estudio se encontró que los valores de R_s *in vitro* e *in vivo* fueron significativamente diferentes. Por esto se recomienda confirmar cual valor de R_s es el apropiado para la cuantificación *in vivo*⁵⁶.

Con este método, el uso de SPME como una técnica de preparación de muestra rápida y no letal se simplifica, porque no es necesario determinar el valor de K_{fs} . Esta metodología también elimina por completo el uso de estándares precargados en la fibra antes de la extracción, evitando así la contaminación potencial del sistema biológico con compuestos deuterados (o compuestos que sirvan como calibrante con propiedades fisicoquímicas similares al analito), lo que permite que un organismo pueda ser muestreado varias veces. Sin embargo, este método requiere determinar la velocidad de muestreo (R_s) y no se puede usar en situaciones donde la velocidad de muestreo está cambiando con el tiempo^{99,114}.

La selección del método de calibración más apropiado para aplicaciones de *in vivo* SPME requiere que el usuario esté familiarizado con los métodos disponibles y los principios básicos de cada uno

para asegurar una implementación práctica adecuada y que cumpla con los requerimientos de la aplicación particular. La selección de un método de calibración apropiado puede simplificar la operación y aumentar la eficiencia del procedimiento *in vivo* SPME, asegurando así buenos resultados cuantitativos¹¹⁴.

1.7. Organismos bioindicadores: Peces

Los bioindicadores son organismos o comunidades de organismos, cuyas reacciones al ser observadas representativamente permiten evaluar una situación, proporcionan indicios de la condición de todo un ecosistema. Estos tienen requerimientos particulares con respecto a un conjunto conocido de variables físicas y químicas tales que cambios en presencia/ausencia, número, morfología, fisiología o comportamiento de las especies indican que dichas variables están fuera de los límites preferibles. Principalmente, los bioindicadores se definen como especies que reaccionan a efectos antropogénicos en el ambiente y son útiles en tres situaciones:

- 1) cuando el valor ambiental indicado no puede ser medido
- 2) cuando el factor indicado es difícil de medir
- 3) cuando el factor ambiental es fácil de medir, pero difícil de interpretar.

Los indicadores de bioacumulación son una clase especial de organismos indicadores, son conocidos como centinelas. Estos organismos acumulan y concentran contaminantes de su alrededor y/o alimentos para que el análisis de sus tejidos proporcione un estimado de las concentraciones ambientales disponibles de estos contaminantes. Actualmente los cambios en las condiciones ambientales han alcanzado una nueva dimensión, a través de la actividad humana han llegado al ambiente nuevos compuestos que no existían previamente y son potencialmente dañinos. Los indicadores de acumulación son organismos que no son dañados por factores de estrés (fluctuaciones en el clima, variaciones en la radiación o el suministro de comida, enfermedades, competencia entre especies, etc). Deben estar presentes en gran abundancia para proporcionar tejido suficiente para su análisis y estar ampliamente distribuidos para facilitar comparaciones¹¹⁶.

En el ambiente acuático tenemos organismos centinela como bivalvos, mejillones y los peces. En general se prefiere a los peces por varias razones:

- Se tiene una larga tradición de investigación ecotoxicológica, existe un conocimiento avanzado de los requerimientos ecológicos de una gran cantidad de ellos.
- Como organismos migratorios son indicadores apropiados de conectividad o fragmentación de diferentes hábitats.
- Por su tamaño y el de sus órganos, se pueden realizar con ellos una gran variedad de procedimientos analíticos. Las concentraciones de los compuestos en los tejidos son excelentes indicadores de la carga ambiental de un compuesto.
- Debido a su longevidad ciertos efectos, como los procesos de acumulación, se incrementan.
- Como consumidores primarios y secundarios de diferentes niveles, reflejan las condiciones tróficas en sistemas acuáticos.
- Son una fuente importante de alimento para los humanos y juegan un papel primordial como indicadores de la calidad del agua.
- Son sensibles al impacto de mezclas complejas de compuestos en un ecosistema acuático específico, en la exposición a estos compuestos los peces responden a un nivel sub-celular y usualmente pueden compensar los efectos tóxicos, y su salud no se ve seriamente afectada.
- El número de especies es relativamente pequeño y éstas ya están determinadas en campo¹¹⁷.

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos recomienda como peces bioindicadores por la facilidad para detectar los efectos agudos y subletales, a las siguientes especies: lampreas, esturiones, carpas, catostómidos, bagres, lucios, sculpins, peces luna, percas y truchas. Específicamente las cuatro especies de trucha que se recomiendan son: arcoíris, marrón, de arroyo y de lago¹¹⁸. De estas especies la trucha arcoíris se seleccionó para este trabajo.

Por otro lado, de acuerdo con la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en 2017 la especie más producida en México fue la tilapia con 163,740.14 toneladas lo que se traduce en el 75.7% del total, le sigue la carpa con 49,570.79 toneladas que representa el 13.1%, trucha con 13,651.16 toneladas que es el 7.2% y el resto que es

aproximadamente el 4.0%, está compuesto principalmente por el bagre, catán y lobina¹¹⁹. Debido a que la especie más producida es la tilapia, se decidió incluirla también en esta investigación.

A continuación, se describen las dos especies de peces seleccionadas.

1.7.1. Trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*)

Su cultivo en México inició a finales del siglo XIX, en el primer vivero natural en Chimela Lerma, Estado de México, con el fin de realizar repoblamiento en cuerpos de agua nacionales. En 1937 se formalizó la reproducción de trucha arcoíris, y por decreto se creó, en el Estado de México, el centro piscícola en Salazar, que en 1943 se convirtió en el Centro Acuícola "El Zarco". Sus principales generalidades se describen a continuación.

Distribución Geográfica: Se distribuye naturalmente en la Costa Este del Océano Pacífico desde Alaska hasta la Península de Baja California en México.

Morfología: Dorso verdoso con flancos más claros; banda irisada^c en todo el cuerpo. Presenta numerosas manchas negras en el dorso, flancos y sobre las aletas dorsal, adiposa y caudal. Los machos adultos tienen la cabeza más alargada que las hembras, mandíbula prominente, y coloración más acentuada.

Ciclo de vida: Se reproduce una vez al año durante los meses de octubre a marzo. El desove lo hacen sobre arena o grava en aguas con temperaturas de 8 a 13 °C. Los machos maduran a los 15-18 meses, las hembras después de los 2 años.

Hábitat: Ríos, lagos y lagunas de aguas frías, limpias y cristalinas. Prefieren corrientes moderadas y fondos pedregosos.

Alimentación en medio natural: Se alimenta de pequeños peces, anfibios e insectos.

Parámetros fisicoquímicos: Temperatura: 9 -17 °C; Oxígeno disuelto: 5 mg/L (juveniles y adultos), 6 mg/L (huevos y alevines); pH: 4.5 -10; dureza: 25 ppm; nitrito: < a 0.55 mg/L; nitrato: < a 100 mg/L; amonio: < a 0.012 mg/L (NH₃); alcalinidad: 20 a 200 mg/L de carbonato¹²⁰.

^c Irisada: que tiene reflejos o brillos con los colores del arcoíris



Figura 13. Fotografía de truchas arcoíris.

1.7.2. Tilapia mojarra (*Oreochromis urolepis hornorum*)

La tilapia fue introducida en México desde 1964, tiene gran importancia en la producción de proteína animal en aguas tropicales y subtropicales de todo el mundo, particularmente en los países en desarrollo. El cultivo de tilapia es uno de los más rentables dentro de la acuicultura, ya que es altamente productivo, debido a los atributos de la especie, como son: su rápido crecimiento, resistencia a enfermedades, elevada productividad, tolerancia a condiciones de alta densidad, capacidad para sobrevivir a bajas concentraciones de oxígeno y a diferentes salinidades (organismos eurihalinos), así como la aceptación de una amplia gama de alimentos naturales y artificiales. Sus generalidades se describen a continuación.

Distribución geográfica: América Central, sur del Caribe, sur de Norteamérica, sudeste asiático, Medio Oriente y África.

Morfología: Cuerpo robusto comprimido y discoidal^d, raramente alargado. Boca protráctil con labios gruesos; mandíbulas anchas con dientes cónicos y en ocasiones incisivos. Aleta dorsal en forma decresta con espinas y radios en su parte terminal. Aleta caudal redonda y trunca. El macho tiene dos orificios en la papila genital: el ano y el orificio urogenital, mientras que la hembra posee tres: el ano, el poro genital y el orificio urinario.

Ciclo de vida: La incubación es bucal y dura de 3-6 días. Los machos maduran de los 4-6 meses, y las hembras de los 3-5 meses.

^d Discoidal: que tiene forma de disco

Hábitat: Ambientes acuáticos dulce acuícolas (ríos, embalses^e, arroyos y lagos) y salobres^f (lagunas costeras y estuarios).

Alimentación en medio natural: Omnívoras (fitoplancton, plantas acuáticas, algas, zooplancton, detritus, invertebrados, pequeños insectos y organismos bentónicos^g)

Parámetros fisicoquímicos: La reproducción se inhibe a temperaturas < 20°C, y resulta letal < 11°C. La salinidad dependerá de la especie o línea de tilapia o de un proceso previo de aclimatación de las crías a cierta salinidad. Temperatura: 24-29 °C; oxígeno disuelto: < 5 mg/L; pH: 6.5-8.5; CO₂: < 50; amonio: < 0.1 mg/L; nitritos: < 5 mg/L; salinidad: < 20 g/L¹²¹.



Figura 14. Fotografía de una tilapia mojarra

^e Embalse: depósito de agua producido de manera artificial por una construcción en el lecho de un río o arroyo que cierra parcial o totalmente su cauce

^f Agua salobre: agua que tiene más sales disueltas que el agua dulce pero menos que el agua de mar

^g Organismos bentónicos: comunidad formada por los organismos que habitan el fondo de los ecosistemas acuáticos, por ejemplo: estrellas de mar, ostras, almejas, pepinos de mar, etc.

Para lograr el objetivo de este proyecto la experimentación se dividió en cinco etapas. 1) Optimización y validación del sistema cromatográfico PSSI-GC-MS para identificar y cuantificar los analitos en estudio; 2) se desarrolló y validó una metodología de dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) para calcular la concentración total (C_0) de los analitos en el músculo y así realizar la calibración de la metodología *in vivo*; 3) Utilizar el método de *in vitro* SPME para realizar la optimización y validación de la metodología con peces vivos; 4) realizar la calibración con *in vivo* SPME, y 5) aplicar la metodología *in vivo* para el análisis de peces provenientes de ensayos de acumulación y eliminación.

En el siguiente diagrama se muestra el esquema analítico del trabajo de investigación (Figura 15).

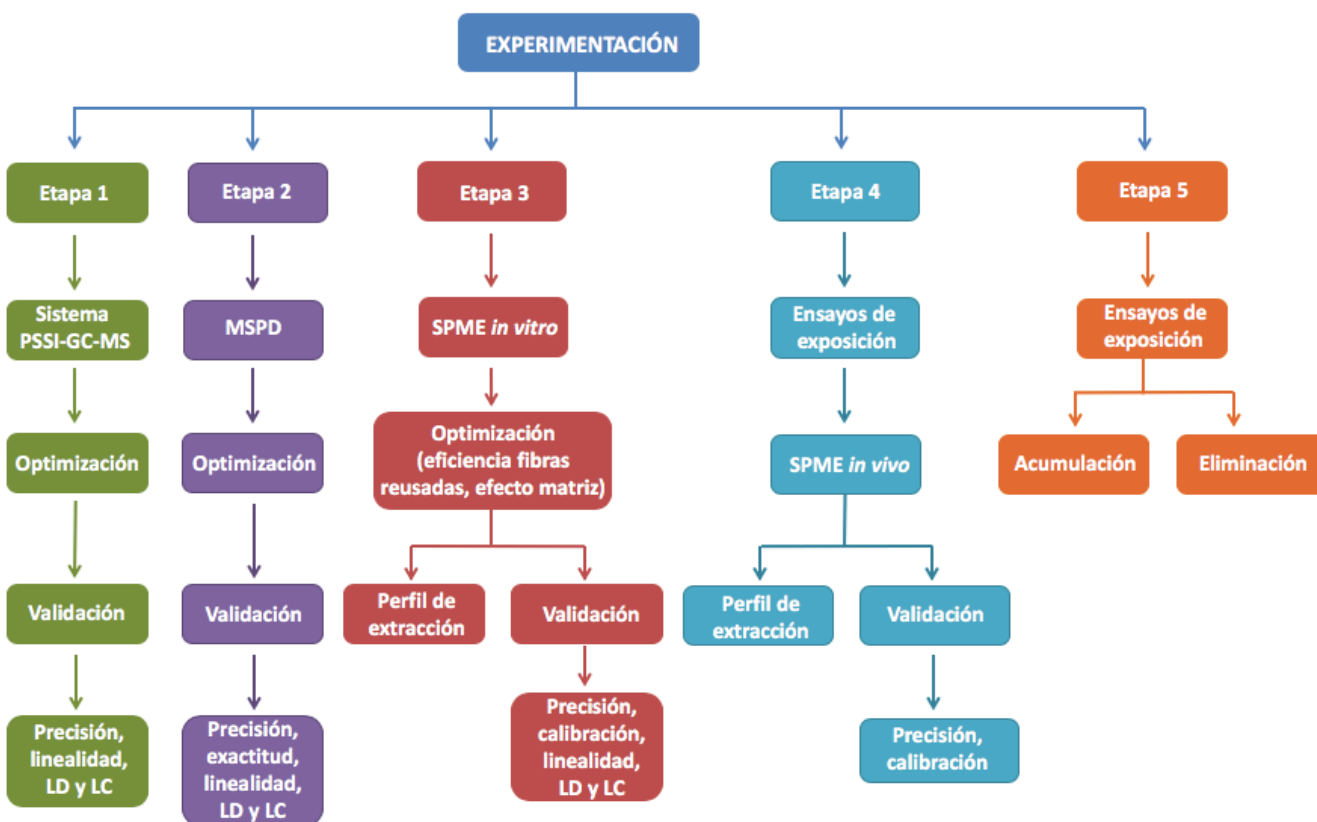


Figura 15. Esquema analítico del proyecto de investigación

2.1. Reactivos, materiales, instrumentos y equipos

- Para el desarrollo y validación de las metodologías se usaron los estándares analíticos: galaxolida (55.8%, Sigma Aldrich, China), tonalida (99.3%, Sigma-Aldrich, EUA), oxibenzona (100.0%, Fluka, China), 4- metilbenciliden canfor (4-MBC, 99.7%, Fluka, Alemania),

octocrileno (99.2%, Fluka, Alemania), padimato-O (99.0%, Fluka, EUA), 2-etilhexil metoxicinamato (2-EHMC, 98.9%, Fluka, Suiza), benzo[a]antraceno (B[a]A, solución a 100 µg mL⁻¹ en diclorometano, Ultra Scientific, EUA).

- Para la fortificación del agua en los bioensayos se usaron los reactivos: galaxolida y tonalida igual que las descritas en el punto anterior, oxibenzona (100.0%, Aldrich, China), 4-metilbenciliden canfor (4-MBC, 100.0%, Sigma, Alemania), octocrileno (99.5%, Aldrich, Alemania), padimato-O (99.5%, Aldrich, EUA), 2-etilhexil metoxicinamato (2-EHMC, 98.9%, Sigma, Suiza).
- Reactivos: acetonitrilo (99.9%, grado HPLC, J.T. Baker, EUA), metanol (99.9%, grado reactivo, J.T. Baker, EUA), hexano (97.0%, grado HPLC, J.T. Baker, EUA), acetato de etilo (99.9%, grado reactivo, J.T. Baker, México), diclorometano (99.0%, grado HPLC, Tecsiquim, México), acetona (99.9%, grado pestanal, fluka, Alemania), N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA, 98.5%, Sigma, Alemania), N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoro acetamida (BSTFA, 99.0%, Supelco, USA), fenantreno (fen, 99.0%, ChemService, EUA), benzo[a]pireno (B[a]P, 98.3%, ChemService, EUA), benzo[a]antraceno (99.5%, ChemService, EUA, solución a 100 µg/mL en diclorometano), agua desionizada ultrapura tipo I (Direct Q-3 UV, Millipore, Alemania).
- Materiales MSPD: cartuchos polipropileno 6 mL y frits de polietileno de 1/2 pulgada con tamaño de poro 20 µm (Agilent, EUA), adsorbente Chromabond C18 PAH (tamaño de partícula 45 µm, Macherey-Nagel, Alemania), florisil (Malla 60-100, J.T. Baker, EUA), amina primaria secundaria (PSA, Agilent, EUA), sulfato de sodio anhidro (J.T. Baker, México), mortero ágata con pistilo (3 pulgadas, 25 mL, Cole-Parmer, India).
- Materiales *in vivo* e *in vitro* SPME: fibras SPME C₁₈ (45 µm, Supelco, EUA) que se acondicionaron antes de utilizarlas de acuerdo con las instrucciones del proveedor, alimento para trucha (pellets de 2.4 mm, Nutripec, Agibrands Purina, México), Alka-Seltzer® (Bayer, México), pecera de vidrio de 2 y 15 L, tina de plástico de 120 L, bombas aireadoras (Elite, modelo: 802, 1500 cm³/min, 3.5 watts/hora), piedras difusoras, manguera de plástico para acuario, cabeza de poder (Sunny, modelo: SPH 1200, 1200 L/h, 12 watts/hora), calentadores sumergibles con termostato (Lomas, 100 watts), procesador de alimentos (Moulinex, modelo: DPA139, potencia: 800 watts, frecuencia 60 Hz)

- Material de vidrio y otros: viales de vidrio de 8, 11 y 15 mL, viales ámbar de 11, 20 y 40 mL, matraces volumétricos de 5 y 10 mL (Kimax), viales de vidrio de 2 mL con inserto de 300 μ L (Agilent, EUA), viales de reacción de 2 mL con fondo cónico (Wheaton, EUA), equipo Soxhlet (capacidad 125 mL), micropipetas de 5-50 y 50-200 μ L (Hirschmann-Laborgeräte, Alemania), micropipeta 200-1000 μ L (Accumax, India), detergente Extran alcalino libre de fosfatos (Merck, México).
- Instrumentos y equipos: vortex (modelo: M37615, Thermolyne, EUA), liofilizadora Freezone Triad (modelo: 7400040, Labconco, EUA), Agitador orbital (modelo: E15, Sol-Bat, México), balanza analítica (modelo: CP124S, Sartorius, Alemania), baño de agua de temperatura controlada (modelo: 2825, Thermo Scientific, EUA), Horno aerograph (modelo: 144020-00, Varian, EUA), mufla (modelo: FB1315M, Thermo Scientific, EUA).

2.2. Limpieza del material

Debido a que los análisis se realizaron a nivel de trazas y la naturaleza ubicua de los filtros UV y almizcles, es necesario tomar precauciones para evitar contaminación cruzada en las muestras y el ambiente de laboratorio. Se evitó el uso de productos que tuvieran los analitos y se usaron guantes durante el manejo de muestras y los análisis. También para minimizar los interferentes, todo el material se enjuagó con metanol dos veces, se lavó con detergente Extran y se enjuagó con agua desionizada dos veces. Adicionalmente el material de vidrio se calentó en la mufla a 550 °C durante una hora^{49,122}.

2.3. Preparación de disoluciones estándar

Las pruebas del sistema PSSI-GC-MS, y las metodologías de MSPD e *in vivo* SPME se realizaron con estándares analíticos. Se preparó una disolución madre de cada compuesto, para esto se pesaron 10 mg de estándar (a excepción de galaxolida para la que se pesaron 18 mg), se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL, se adicionaron 5 mL de metanol, se agitó en vortex hasta completa disolución y finalmente se aforó con metanol (concentración de 1 mg/mL). De estas disoluciones se realizaron las diluciones pertinentes en metanol para realizar cada prueba. Todas las disoluciones estándar se almacenaron en viales ámbar de vidrio a 4 °C.

2.4. Sistema PSSI-GC-MS

2.4.1. Optimización

Para el análisis de los extractos se utilizó la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas por su alta sensibilidad y selectividad, ya que las muestras analizadas estaban a nivel de trazas. Para alcanzar estos niveles de concentración, se usó el inyector PSSI debido a que permite incrementar el volumen de inyección con un venteo del disolvente, con lo que se disminuyó el límite de detección de los analitos. En este tipo de inyección el disolvente se evapora y sale del sistema a través del split, mientras que los analitos se retienen en el liner¹²³.

Existen diferentes parámetros que deben optimizarse para mejorar la forma de los picos cromatográficos y aumentar la respuesta de los analitos. En este trabajo se utilizaron estándares con una concentración de 1 µg/mL de cada analito para evaluar los siguientes parámetros:

- a) volumen de inyección, se probaron 3, 5, 7 y 10 µL
- b) temperatura inicial en el programa de temperatura del inyector para pre-concentrar la muestra, se estudiaron 60 y 80 °C
- c) flujo de la columna, se hizo una prueba manteniendo el flujo constante a 1 mL/min durante todo el tiempo de análisis (33 min) y se hizo otra prueba con un programa de flujo manteniendo 1 mL/min de 0-20 min y aumentando a 2 mL/min de 20-33 min.

2.4.2. Condiciones optimizadas

El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases (Clarus 680 GC, Perkin Elmer, EUA) equipado con un inyector split/splitless programable (PSSI) y acoplado a un espectrómetro de masas (Clarus SQ 8C, Perkin Elmer, EUA). Para la adquisición de los datos se utilizó el software TurboMass versión 6.1.0. La separación se realizó en una columna capilar Elite-5MS (5% difenilo-95% polidimetilsiloxano, 30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 µm de grosor de la fase, Perkin Elmer, EUA). El programa de temperatura utilizado para el horno fue: 80 °C por 1 min, incrementándose a 10 °C/min hasta 300 °C y se mantuvo por 10 min. El tiempo total del análisis cromatográfico fue de 33 min. El gas acarreador fue helio (99.999%, Praxair) con flujo de la columna de 1 mL/min (0-20 min) y 2 mL/min (20-33 min). El volumen de inyección fue de 5 µL. Para la preconcentración de los analitos se realizó un programa de temperatura en el inyector: 80 °C por 1.3 min, incrementándose a 200 °C/min hasta 320 °C y se mantuvo por 28.7 min. También

se programó en inyector en los siguientes modos: splitless (0-0.1 min), split 50:1 (0.1-1.5 min), splitless (1.5-3 min) y split 50:1 (3-33 min). Las temperaturas de la línea de transferencia y fuente de ionización fueron 280 °C y 250 °C, respectivamente. Los espectros de masas se adquirieron con impacto electrónico a 70 eV, la identificación se realizó en modo de barrido total del espectro (SCAN, por sus siglas en inglés) de 50-400 m/z y para la cuantificación el modo de registro selectivo de iones (SIR, por sus siglas en inglés) con los siguientes iones: galaxolida y tonalida 243, 258 m/z; 4-MBC 171, 211, 254 m/z; oxibenzona 77, 151, 228 m/z; oxibenzona-TMS 242, 285, 300 m/z; padimato-O 148, 165, 277 m/z; 2-EHMC 161, 178, 290 m/z; octocrileno 204, 249, 300 y B[a]A 226, 228, 229 (Tabla 1).

2.4.3. Optimización de la derivatización

La presencia de grupos polares en las moléculas puede causar dificultades para su análisis por cromatografía de gases. Los grupos carboxilo, hidroxilo, tiol y amino, debido a su polaridad y tendencia a formar puentes de hidrógeno, son responsables de la baja volatilidad de los compuestos y de su fuerte adsorción a la fase estacionaria, así como asimetría de los picos, inestabilidad química y térmica, entre otros, por esta razón causan pérdidas de los analitos en el sistema cromatográfico. En cromatografía de gases las reacciones de derivatización sirven para modificar los grupos funcionales del analito y así incrementar su volatilidad, estabilidad térmica y hacer la detección más selectiva y sensible¹²⁴.

De los analitos en estudio la oxibenzona es la única que tiene un grupo funcional polar, el hidroxilo (Tabla 1), por esto su respuesta en GC-MS es baja, y fue necesaria la derivatización para detectarla a nivel de trazas. Los parámetros estudiados fueron los siguientes:

- a) tipo de derivatizante, se estudiaron MSTFA y BSTFA
- b) tiempo de derivatización, la reacción se realizó a 80 °C durante 0.5 y 1 h
- c) tiempo de estabilidad del extracto derivatizado (14 y 24 h)

2.4.4. Validación del sistema PSSI-GC-MS

Debido a la gran variación en la respuesta de los analitos por el proceso de preconcentración en el inyector PSSI, fue necesario utilizar un estándar interno, para esto se probaron tres compuestos Fen, B[a]A, B[a]P. Debido a que en el trabajo de investigación se utilizaron las técnicas de MSPD e

in vivo SPME, se obtuvieron extractos de composición diferente, por lo tanto fue necesario confirmar que las condiciones cromatográficas funcionaran para ambos procedimientos. La validación del sistema PSSI-GC-MS se realizó con estándares en acetato de etilo y con la derivatización de oxibenzona con MSTFA. Los parámetros de validación evaluados fueron la precisión (repetibilidad), linealidad, LD y LC.

2.4.4.1. Validación con estándares en acetato de etilo

Para la precisión se realizaron seis inyecciones de estándares a 200 ng/mL y se calculó el valor de desviación estándar relativa (DER). La linealidad se hizo a seis niveles de concentración (50, 200, 400, 600, 800, 1000 ng/mL) cada una se inyectó por triplicado y se calcularon los valores de coeficiente de determinación (r^2), ordenada y pendiente. Por último, se inyectaron estándares a 0.1, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 5, 7, y 10 ng/mL para obtener los valores de LD y LC, estos últimos considerando la relación señal/ruido (S/N) de 3 y 10, respectivamente.

2.4.4.2. Validación con derivados de MSTFA

Para la precisión se realizaron seis inyecciones de derivados a 100 ng/mL y se calculó el valor de DER. La linealidad para los almizcles se evaluó en dos intervalos de concentración usando siete niveles de concentración para el primero (10, 50, 100, 200, 300, 450, 600 ng/mL) y seis para el segundo (500, 600, 700, 800, 900, 1000 ng/mL); para los filtros UV la linealidad se evaluó en un intervalo de concentración de 10-200 ng/mL con siete puntos (10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 ng/mL); en las pruebas de linealidad cada nivel se inyectó por triplicado y se calcularon los valores de coeficiente de determinación (r^2), ordenada y pendiente.

Para determinar el LD y LC, se inyectaron estándares a 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 5, 7 y 10 ng/mL, y se consideró una relación señal/ruido (S/N) de 3 para el LD y 10 para el LC.

2.5. Método MSPD-PSSI-GC-MS

Para optimizar y validar el método de MSPD, se utilizaron muestras de músculo de trucha liofilizadas y fortificadas.

2.5.1. Pretratamiento de muestras

A la trucha arcoíris se le retiró la piel y los órganos internos. Luego se separó el músculo de los huesos y se enjuagó con agua, se cortó en trozos (aproximadamente 0.5 x 0.5 cm) y se liofilizó (-55 °C, 0.024 mBar, 48 h). Para su uso posterior finalmente se almacenó en viales ámbar a temperatura ambiente en un desecador.

2.5.2. Fortificación del músculo

0.2 g de músculo liofilizado fueron fortificados con 100 µL de solución estándar (preparada a partir de las disoluciones madre descritas en la sección 2.3 y diluida en acetona) a diferentes niveles de concentración, la muestra fortificada se homogeneizó y posteriormente se dejó secar y equilibrar a temperatura ambiente durante 3 h.

2.5.3. Optimización

Fue necesario optimizar la metodología de MSPD para obtener un extracto apropiado (con la menor cantidad posible de interferentes) para inyectarlo en el sistema PSSI-GC-MS, ya que un problema importante cuando se realiza el análisis de compuestos orgánicos en muestras de biota es minimizar el contenido lipídico de los extractos, minimizando la pérdida de los analitos en el procedimiento de preparación de muestra. La presencia de lípidos deforma los picos cromatográficos y disminuyen el tiempo de vida útil de las columnas para cromatografía de gases. En las extracciones con MSPD, la cantidad de lípidos co-extraídos se pueden minimizar con una selección apropiada del disolvente de elución, y adsorbentes tanto dispersante como de limpieza¹⁸. En este trabajo se utilizó acetonitrilo como disolvente de elución debido a que se encontró que es eficiente en la extracción de los filtros UV¹²⁵ y tiene una baja afinidad por los lípidos¹²⁶, estos últimos son uno de los principales interferentes cuando se analiza biota.

Para las pruebas de optimización se utilizó muestra de músculo fortificado a 1 µg/g (0.2 g de músculo fortificado con 100 µL de una disolución estándar en acetona a 2 µg/mL). Los parámetros de la MSPD evaluados en el desarrollo de la metodología fueron:

- a) relación muestra/dispersante 1:4 (0.5 y 2.0 g) y 1:5 (0.2 y 1.0 g)
- b) volumen de solvente de elución, se probaron 3, 5 y 7 mL
- c) adsorbente para la co-columna, se utilizaron 0.5 g de sílice C18 PAH y 0.5 g de PSA

2.5.4. Procedimiento optimizado MSPD

0.2 g de músculo liofilizado se maceró en un mortero ágata con 1.0 g de florisil (previamente acondicionado a 130 °C por 24 h) hasta que se obtuvo una mezcla homogénea. El macerado se transfirió a un cartucho de 6 mL empacado con 0.5 g de sílice C18 PAH, este último como co-columna y adsorbente de limpieza. Los analitos se eluyeron por gravedad con 5 mL de acetonitrilo. El extracto se evaporó a sequedad con un flujo suave de nitrógeno en un baño de agua a 40 °C. Finalmente al residuo se le adicionó 1.0 mL de acetato de etilo que contenía 100 ng/mL de estándar interno (B[a]A), se agitó en el vortex durante 1 min y se inyectó en el sistema PSSI-GC-MS (sección 2.4).

2.5.5. Pérdida de los analitos por evaporación

Las posibles pérdidas que se puedan generar en el proceso de evaporación del disolvente fueron evaluadas. Para esto se preparó un estándar fortificando 5 mL de acetonitrilo a 100 ng/mL de cada uno de los analitos. Luego se evaporaron a sequedad con un flujo suave de nitrógeno en un baño de agua a 40 °C. Al residuo se le adicionó 1 mL de acetato de etilo que contenía 100 ng/mL de estándar interno (B[a]A), se agitó en el vortex durante 1 min y se inyectó en el sistema PSSI-GC-MS (estándar evaporado). Además, se preparó un estándar fortificando 1 mL de acetato de etilo a 500 ng/mL de cada analito y a 100 ng/mL de B[a]A (estándar sin evaporación).

El experimento se hizo por triplicado y se calculó el recobro obtenido para cada estándar evaporado usando la siguiente ecuación (Ecuación 9).

$$\% \text{ Recobro} = \frac{\text{Área relativa estándar evaporado}}{\text{Área relativa promedio estándar sin evaporar}} \times 100 \quad \text{Ecuación 9}$$

2.5.6. Efecto matriz

Para evaluar el efecto matriz se realizó una curva de calibración de los estándares en acetato de etilo y otra de extractos fortificados del pescado control. Ambos tipos de curvas se obtuvieron con los mismos niveles de concentración (10, 100, 200, 400, 600, 800 y 1000 ng/mL) y cada nivel se hizo por triplicado. Se obtuvo la ecuación de la recta para cada tipo de curva y el efecto matriz se calculó con la relación de pendientes.

2.5.7. Validación

Los parámetros de validación que se evaluaron fueron precisión (repetibilidad), certeza, linealidad, LD y LC. La certeza y precisión se hicieron con muestras fortificadas a dos niveles 0.1 y 1.0 $\mu\text{g/g}$. Para cada concentración se analizaron tres muestras en dos días diferentes, y se obtuvieron los valores de DER y recobro. La linealidad se evaluó fortificando muestras de músculo liofilizado en dos intervalos diferentes de concentración; para todos los analitos el primer intervalo fue a nivel de trazas con valores entre 0.05-1 $\mu\text{g/g}$ y seis niveles de concentración (0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1.0 $\mu\text{g/g}$); el segundo intervalo se estableció basado en la cantidad absorbida por la trucha de cada uno de los analitos, para tonalida fue de 1-75 $\mu\text{g/g}$ con ocho niveles (1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75 $\mu\text{g/g}$); galaxolida, oxibenzona, 4-MBC y octocrileno de 1-60 $\mu\text{g/g}$ con siete niveles (1, 10, 20, 30, 40, 50, 60 $\mu\text{g/g}$); padimato-O y 2-EHMC de 1-40 $\mu\text{g/g}$ con cinco niveles (1, 10, 20, 30, 40 $\mu\text{g/g}$); de cada concentración se realizaron tres réplicas y se calculó la ecuación de la recta así como el coeficiente de determinación (r^2). Los valores de LD y LC se determinaron con la relación señal/ruido de 3 y 10, respectivamente, mediante el análisis de muestras fortificadas a 4, 6, 8, 10, 12, 13, 20, 25, 30, 40 y 50 ng/g .

2.6. *In vitro* SPME-PSSI-GC-MS

Para el análisis *in vivo* sería muy difícil obtener las muestras de peces vivos necesarias para realizar la optimización y validación del método, debido a que es casi imposible replicar la misma matriz de la muestra de un animal representativo por las variaciones inter-peze, incluso cuando se usa la misma especie en la misma etapa de desarrollo. Por esto la optimización y validación del método se realizó con *in vitro* SPME¹²⁷.

Además, en el presente trabajo de investigación se decidió realizar la calibración para la trucha tanto *in vivo* como *in vitro* debido a que existen discrepancias en la literatura. En un estudio reportado por Bai¹²⁸ se menciona que si la constante R_s se obtiene utilizando músculo homogéneo fortificado con los analitos (*in vitro*) este valor se puede utilizar para la cuantificación *in vivo*, mientras que en otro estudio se encontró una diferencia significativa entre el valor de R_s *in vitro* y el de R_s *in vivo*, en este último se menciona que es necesario usar la R_s *in vivo* para la cuantificación *in vivo*¹²⁹.

Los procedimientos y las pruebas realizadas con este método se describen a continuación.

2.6.1. Fortificación del músculo

Los experimentos *in vitro* se realizaron con músculo fresco de trucha fortificado a diferentes niveles de concentración. El filete de trucha arcoíris se obtuvo del mercado de San Juan (delegación Cuauhtémoc, Ciudad de México). Para la fortificación, a 100 g de filete de pescado se le adicionaron lentamente 2000 μL de una solución estándar en metanol (a la concentración adecuada para el nivel de fortificación). La homogeneización se realizó simultáneamente con un procesador de alimentos y se aseguró que la solución estándar se distribuyera únicamente en el músculo, una vez fortificado se dejó equilibrar 2.5 horas a 4 °C.

2.6.2. Acondicionamiento de fibras SPME C18

La fibra se sumergió en una solución de metanol-agua (90:10 v/v) con agitación a 900 rpm durante 20 min, posteriormente se transfirió a otra solución de metanol-agua (10:90 v/v) con agitación a 900 rpm durante 20 min (Figura 16a). La fibra permaneció en esta solución hasta su uso.

2.6.3. Optimización

En la optimización se utilizó músculo de trucha homogéneo fortificado a 5 $\mu\text{g/g}$ (sección 2.6.1), y se extrajo durante 30 min con las fibras SPME C18 (sección 2.6.3). Para establecer la metodología se evaluaron los siguientes parámetros.

- a) tipo de disolvente para desorción de la fibra; se probaron metanol y acetonitrilo;
- b) volumen de disolvente de desorción; se probaron 300, 600 y 900 μL , para recuperar completamente a los analitos.

2.6.4. Extracción optimizada *in vitro* SPME

Para realizar la extracción *in vitro*, la fibra SPME C18 se insertó a una profundidad de 20 mm en el músculo fortificado, por un tiempo de extracción determinado (Figura 16b). Luego se retiró la fibra del músculo y se enjuagó con agua desionizada. Posteriormente se realizó la primera desorción en un vial con 300 μL de acetonitrilo y agitación (300 rpm, 2 h) y la segunda desorción se realizó en otro vial con 300 μL de acetonitrilo y agitación (300 rpm, 1 h) como se muestra en la Figura 16c. Ambos extractos se mezclaron y se evaporaron a sequedad con un flujo suave de nitrógeno. El residuo se derivatizó con 30 μL de MSTFA a 80 °C durante 30 min, se dejó enfriar a temperatura

ambiente y se le adicionaron 20 μL de estándar interno (B[a]A, 125 ng/mL) para su análisis por PSSI-GC-MS.

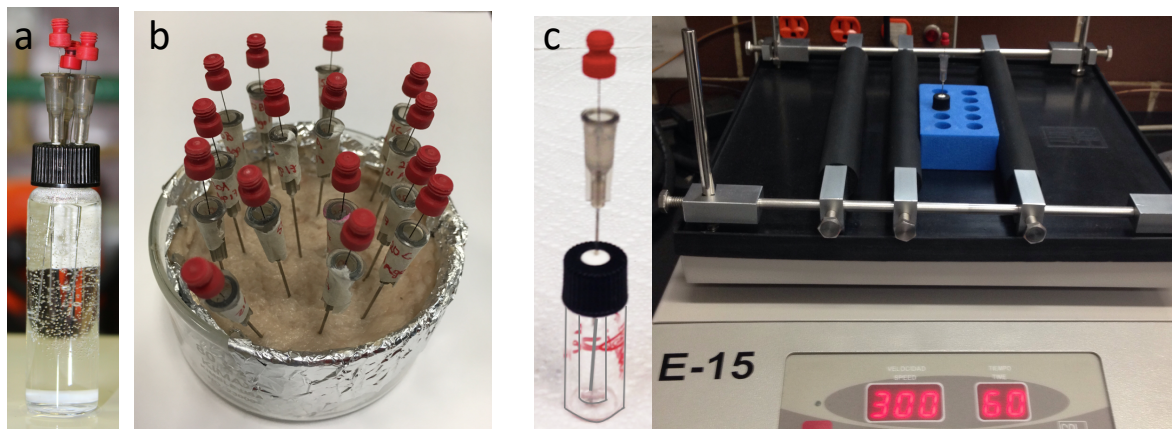


Figura 16. Análisis *in vitro* SPME. (a) Acondicionamiento de las fibras, (b) extracción de músculo de trucha fortificado y (c) desorción de la fibra con acetonitrilo y agitación.

2.6.5. Efecto matriz

Para evaluar el efecto matriz se utilizaron dos disoluciones, 600 μL de acetonitrilo y 600 μL de extracto de trucha control (no expuesta a los analitos). Ambas soluciones se fortificaron para obtener una concentración de 200 ng/mL de cada analito, fueron evaporados, derivatizados con MSTFA y analizados por PSSI-GC-MS. Los experimentos se hicieron por triplicado y se compararon las medias de las áreas relativas obtenidas para cada analito.

2.6.6. Reutilización de las fibras

Para esta prueba se utilizó músculo de trucha fortificado a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (sección 2.6.1). Inicialmente para la extracción *in vitro* se utilizaron seis fibras SPME C18 nuevas, una para cada tiempo de extracción, y los tiempos de extracción fueron 5, 10, 15, 20 30 y 40 min (sección 2.6.3). El experimento se repitió dos veces más lavando esas mismas fibras con hexano, isopropanol y acetonitrilo (900 rpm, 20 min) antes de acondicionarlas. Se comparó la respuesta relativa obtenida con las fibras nuevas, el primer y segundo lavado.

2.6.7. Perfil de extracción y validación

Los parámetros que se evaluaron para *in vitro* SPME fueron: perfil de extracción, linealidad, repetibilidad, LD y LC.

Para el perfil de extracción se usó músculo homogéneo fortificado a 5 $\mu\text{g/g}$. Posteriormente se realizó la extracción con la fibra SPME C18 a diferentes tiempos (10, 20, 30, 45 y 55 min). Cada experimento se realizó por triplicado y se graficó la respuesta promedio obtenida en función del tiempo.

Para la linealidad se usaron seis muestras de músculo homogéneo (sección 2.6.1), cada muestra se fortificó a 1, 2, 3, 4, 5 y 7 $\mu\text{g/g}$ respectivamente. Posteriormente, se realizó la extracción con la fibra durante 20 min. Cada experimento se realizó por triplicado. Se graficó C_0t contra la cantidad extraída con la fibra (n), y la pendiente de la ecuación de la recta obtenida fue el valor de R_s *in vitro* (ecuación 8).

La repetibilidad se realizó fortificando seis muestras de músculo homogéneo a 500 ng/g (sección 2.6.1). Las muestras se analizaron en dos días diferentes (tres muestras cada día) extrayendo con las fibras durante 20 min.

Para las pruebas de LD y LC se usaron 12 muestras de músculo homogéneo, cada una fortificada a 1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 55, 70 y 80 ng/g , respectivamente. Los valores de LD y LC se calcularon con la relación señal/ruido (S/N) considerando 3 y 10, respectivamente.

Para todos los parámetros evaluados, se realizó el procedimiento de extracción descrito en la sección 2.6.3.

2.7. *In vivo* SPME-PSSI-GC-MS

Para la calibración de la metodología *in vivo* se usaron truchas juveniles expuestas en agua fotificada con los analitos.

2.7.1. Truchas juveniles

Para los experimentos *in vivo* se utilizaron truchas arcoíris juveniles (*Oncorhynchus mykiss*) obtenidas del Criadero de Truchas Piedra Colorada, ubicada en el municipio de Santa Rita Tlahuapan, Puebla, México (19°21'29.7"N 98°34'26.4"W). Las truchas se adaptaron a las condiciones de laboratorio durante una semana en un acuario con 100 L de agua potable. El

acuario se equipó con una cabeza de poder de 1200 L/h para que los peces nadaran a contracorriente, y tres bombas aireadoras con seis piedras difusoras para mantener la concentración de oxígeno disuelto. El fotoperiodo de luz/oscuridad fue de 13:11 h, y diariamente se monitorearon pH 7, temperatura 14 ± 2 °C y oxígeno disuelto 8 ± 0.5 mg/L. Los peces se alimentaron dos veces al día con una ración de alimento en pellets (2.4 mm, Nutripec, Agribrands Purina, Mexico).

2.7.2. Exposición de peces

Los procedimientos experimentales para el estudio *in vivo* con peces fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL, Facultad de Química, UNAM). Durante los experimentos se tuvo a los peces en ayuno para minimizar variaciones por su metabolismo. En cada ensayo de exposición se usaron 70 L de agua fortificada a 100 µg/L de cada analito, esta concentración fue cercana al valor de solubilidad de los analitos en agua (Tabla 1). Para fortificar el agua se preparó una disolución madre en metanol a una concentración de 1 mg/mL, y se adicionó 1 mL de esta solución por cada 10 L de agua. Para mantener la concentración constante, se renovaron 50 L con agua recién fortificada dos veces al día.

2.7.3. Procedimiento

Para realizar la cuantificación de los analitos en el músculo del pez, se utilizó la técnica de *in vivo* SPME, que es miniaturizada y requiere tiempos de muestreo cortos (calibración cinética), reduciendo así la manipulación y estrés de los animales, además de evitar sacrificarlos. Para este método se realizó el perfil de extracción y la calibración con el método de velocidad de muestreo predeterminada. El procedimiento de extracción se describe a continuación.

Una vez que terminó el tiempo de exposición (sección 2.7.2), las truchas se anestesiaron en una bolsa ziploc con 0.3 ± 0.1 g de una pastilla de Alka-Seltzer® disuelta en 200-250 mL de agua (estas condiciones se pueden modificar dependiendo del tamaño del pez). Luego se realizó la extracción *in vivo* insertando la fibra SPME C18 en el músculo dorsal-epiaxial del pez (Figura 17).

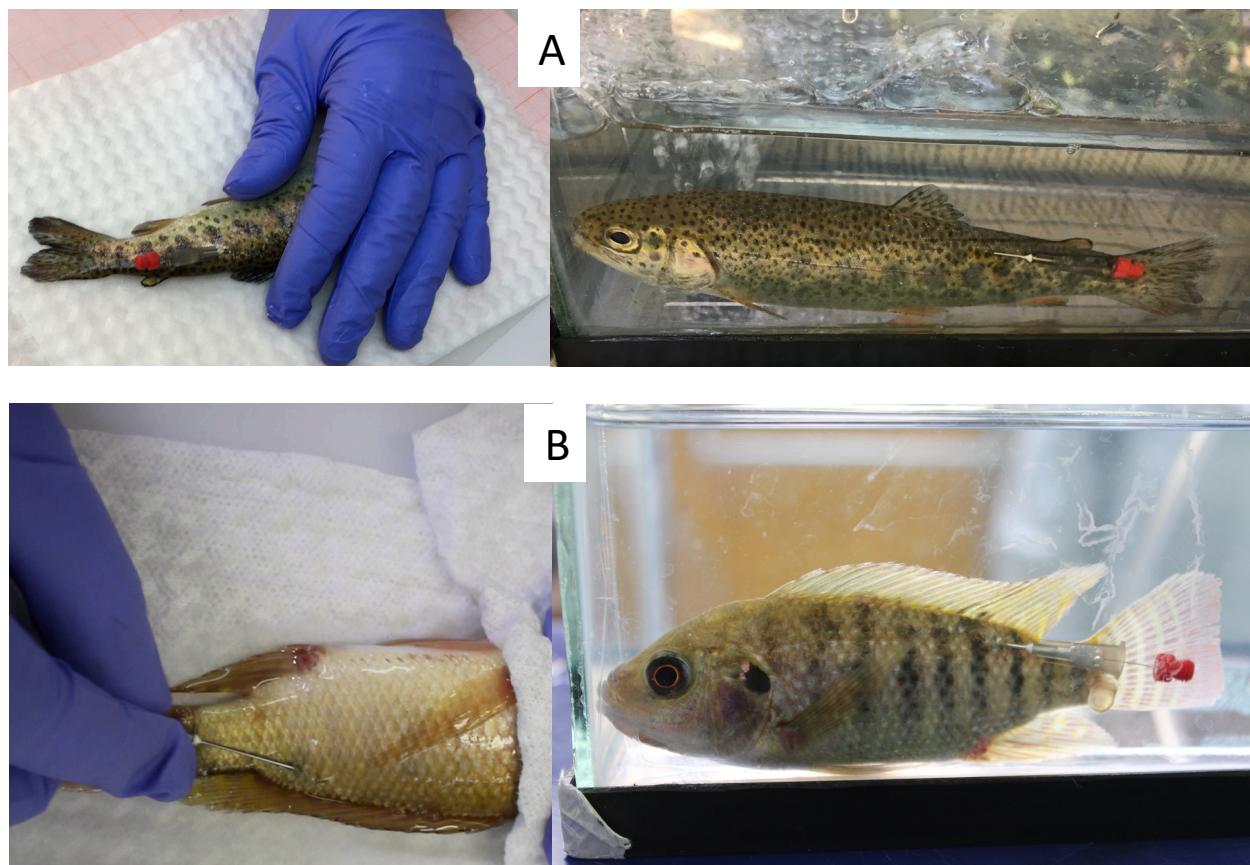


Figura 17. Inserción de la fibra SPME C18 en trucha (A) y tilapia (B)

Después el pez se colocó en agua fortificada (o potable para la trucha control) para que recuperara el equilibrio vertical (después de la anestesia no se observaron signos de estrés por falta de oxígeno). Una vez pasado el tiempo de extracción, la fibra se retiró del músculo del pez y se enjuagó con agua desionizada, posteriormente se desorbió con 300 μL de acetonitrilo (300 rpm, 2 h) y se repitió con otros 300 μL (300 rpm, 1 h) para recuperar completamente a los analitos. Los extractos fueron combinados y se evaporaron a sequedad con un flujo de nitrógeno, el residuo se derivatizó con 30 μL de MSTFA (80 $^{\circ}\text{C}$, 30 min), se enfrió a temperatura ambiente y se le adicionaron 20 μL de estándar interno (B[a]A, 125 ng/mL) para su análisis por PSSI-GC-MS (sección 2.4). En la Figura 18 se muestra un esquema con la experimentación.

Es importante mencionar que el pez se recuperó completamente después de la extracción y se regresó vivo al acuario.

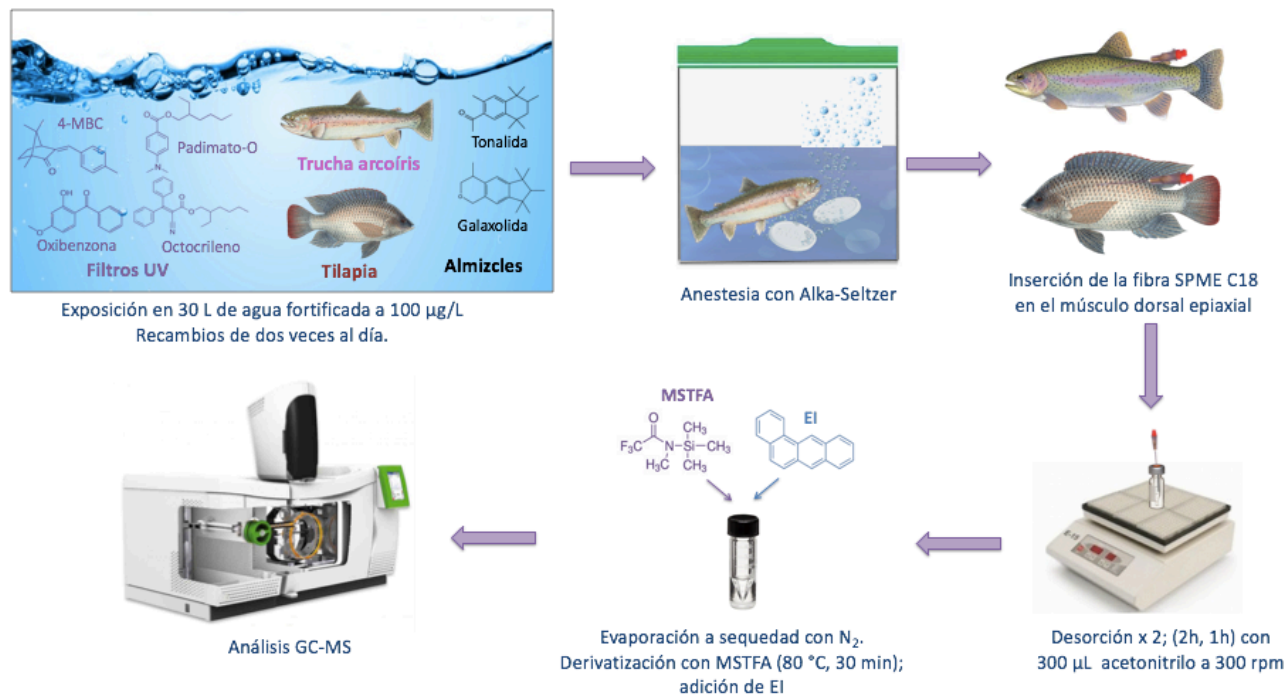


Figura 18. Diagrama (analítico) para la determinación de filtros UV y almizcles en peces utilizando *in vivo* SPME-PSSI-GC-MS

2.7.4. Perfil de extracción, repetibilidad y calibración *in vivo*

En las pruebas *in vivo* se utilizaron truchas juveniles expuestas durante cinco días (sección 2.7.2) y extraídas con el procedimiento *in vivo* SPME (sección 2.7.3).

Perfil de extracción *in vivo*. Para determinar el tiempo de extracción (t) cinco truchas (15.08 ± 0.89 cm; 34.78 ± 4.61 g) fueron expuestas; los analitos se extrajeron durante 10, 20, 30, 45 y 55 min, y se graficó la respuesta obtenida contra el tiempo de extracción. Para cada tiempo de extracción estudiado se utilizó una fibra C18 por cada trucha.

Repetibilidad. Para evaluar la precisión del método se utilizaron tres peces (15.3 ± 1.48 cm; 37.70 ± 5.81 g), se colocó una fibra SPME C18 en cada costado del pez, para extraer los analitos del músculo durante 10 y 20 min, respectivamente. Se evaluó la respuesta promedio y la DER.

Calibración *in vivo*. Para determinar la velocidad de muestreo *in vivo* (R_s), seis truchas (14.93 ± 1.16 cm; 35.50 ± 6.40 g) fueron expuestas, y los analitos se extrajeron durante 20 min (t) con las fibras C18 para obtener la cantidad del analito extraída por la fibra (n), este parámetro se calculó a partir

de la concentración del extracto obtenida con factor de respuesta de un estándar externo a 200 ng/mL y multiplicando por su volumen (0.05 mL). Después de la extracción *in vivo*, las truchas se sacrificaron con una sobredosis de Alka-Seltzer®; y se descartaron piel, huesos y órganos internos. Para obtener la concentración total (C_0) de los analitos, el músculo del pez se liofilizó (sección 2.5.1) y se analizó con el método MSPD-PSSI-GC-MS (sección 2.5.4). La constante R_s *in vivo* se calculó para cada pez con la ecuación 8, descrita en la sección 1.6.2:

$$C_0 = \frac{n}{R_s t}$$

2.8. Ensayos de bioacumulación y eliminación

Para el experimento de acumulación diez truchas (14.97 ± 0.67 cm; 32.75 ± 4.02 g) fueron expuestas durante cinco días en 70 L de agua fortificada a 100 µg/mL (sección 2.7.2). El muestreo con *in vivo* SPME de tres peces seleccionados de manera aleatoria se realizó a las 24, 48, 72 y 96 h (sección 2.7.3) y se analizó con el sistema PSSI-GC-MS (sección 2.4). Después del muestreo, cada pez se regresó al acuario para continuar con el ensayo de acumulación.

Para el ensayo de eliminación, cinco truchas (12.10 ± 1.17 cm; 17.74 ± 7.58 g) se expusieron durante cinco días en 70 L de agua fortificada a 100 µg/mL (sección 2.7.2). Al finalizar de los cinco días de exposición, la concentración inicial de los analitos en el músculo del pez se obtuvo muestreando tres peces de manera aleatoria (sección 2.7.3). Después los peces se transfirieron a un acuario con 70 L de agua potable sin cloro para el ensayo de eliminación; cada día se renovaron 50 L de agua potable. El muestreo aleatorio de tres peces se realizó a las 24, 48 y 96 h, y se realizó el análisis como se describió previamente (sección 2.7.3). Después del muestreo, cada pez se regresó al acuario para continuar con el ensayo de eliminación.

2.9. Ensayos con Tilapia

Para verificar la robustez del método *in vivo* SPME-GC-MS, se aplicó en la cuantificación de los analitos en tilapias provenientes de ensayos de acumulación y eliminación. Debido a que es una especie diferente de pez, se tuvieron que realizar algunas modificaciones en el método de MSPD desarrollado previamente.

2.9.1. Modificación del método MSPD-PSSI-GC-MS para tilapia

El procedimiento de MSPD modificado se describe a continuación. Una muestra de 0.2 g de músculo liofilizado se maceró en un mortero ágata con 0.6 g de sílice C18 PAH hasta que se obtuvo una mezcla homogénea. El macerado se transfirió a un cartucho de 6 mL y los analitos se eluyeron por gravedad con 5.5 mL de acetonitrilo. El extracto se evaporó a sequedad con un flujo suave de nitrógeno en un baño de agua a 40 °C. Finalmente al residuo se le adicionó 1.0 mL de acetato de etilo que contenía 100 ng/mL de estándar interno (B[a]A) y se agitó en el vortex durante 1 min.

2.9.2. Tilapias juveniles

En los experimentos *in vivo* se utilizaron tilapias juveniles (*Oreochromis urolepis homorum*) donadas por el Departamento de Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Las tilapias se adaptaron a las condiciones de laboratorio durante una semana en un acuario con 100 L de agua potable. El acuario fue equipado con dos calentadores y dos bombas aireadoras con cuatro piedras difusoras. El fotoperiodo de luz/oscuridad fue de 10:14 h, pH = 7, temperatura en 27 ± 1 °C y oxígeno disuelto en 4 ± 0.5 mg/L.

2.9.3. *In vivo* SPME-PSSI-GC-MS

Para los ensayos *in vivo*, la exposición de las tilapias se realizó de acuerdo con la sección 2.7.2. Una vez que terminó el tiempo de exposición, los peces se anestesiaron con 1.0 ± 0.2 g de pastilla de Alka-Seltzer® y se realizó el análisis de los peces con el método *in vivo* SPME-PSSI-GC-MS descrito en la sección 2.7.3. Para la tilapia se realizaron las pruebas *in vivo* de perfil de extracción y calibración usando el método de velocidad de muestreo predeterminada.

2.9.3.1. Perfil de extracción y calibración *in vivo*

Perfil de extracción. Para determinar el tiempo de extracción (*t*) cinco tilapias juveniles (14.8 ± 4.7 g, 10.5 ± 2.0 cm) se expusieron; los analitos se extrajeron a 10, 20, 30, 45 y 55 min, y se analizaron como se describió previamente (sección 2.7.3). Para cada tiempo de extracción estudiado se utilizó una fibra C18 por cada tilapia. Se graficó la respuesta obtenida contra el tiempo de extracción.

Calibración *in vivo*. Para determinar la velocidad de muestreo *in vivo* (R_s), seis tilapias (35.0 ± 14.2 g, 12.3 ± 2.0 cm) se expusieron, y los analitos se extrajeron durante 20 min con las fibras C18. Después de la extracción *in vivo*, las tilapias se sacrificaron con una sobredosis de Alka-Seltzer®; y se descartaron piel, huesos y órganos internos. El músculo del pez se liofilizó (sección 2.5.1) y se analizó con el método MSPD-PSSI-GC-MS (sección 2.9.1) para obtener la concentración total (C_0) de los analitos.

2.9.4. Ensayos *in vivo* de bioacumulación y eliminación

Para los experimentos de acumulación y eliminación se usaron quince tilapias juveniles (32.2 ± 6.9 g, 12.8 ± 0.9 cm) y se siguió el mismo procedimiento descrito en la sección 2.8. Los tiempos de muestreo fueron a las 24, 48, 72, 96 y 120 h para el ensayo de acumulación y 24, 48, 72 y 96 h para el ensayo de eliminación.

3.1. Sistema PSSI-GC-MS

3.1.1. Optimización

Los resultados mostraron que la menor variación de áreas ($DER < 12\%$, $n=6$) para todos los analitos se obtuvo con un volumen de inyección de $5 \mu\text{L}$ y $80 \text{ }^\circ\text{C}$ como temperatura inicial en el programa del inyector. Adicionalmente, cuando se hizo un programa de flujo iniciando en 1 mL/min (0 a 20 min) e incrementándolo a 2 mL (20-33 min) un minuto antes del tiempo de retención del octocrileno, se observó que mejoró su forma del pico y disminuyó el ensanchamiento de banda, siendo el más retenido.

3.1.2. Optimización de la derivatización

En el grupo de analitos en estudio de este proyecto, sólo la oxibenzona tiene un grupo polar (hidroxilo), y para aumentar su respuesta se estudió la derivatización utilizando dos reactivos MSTFA y BSTFA; en ambos casos la reacción de derivatización se realizó a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 1 h. Con ambos reactivos derivatizantes la forma de los picos fue simétrica (factor de coleo entre 1-1.1), sin embargo se seleccionó el primero debido a que para todos los analitos se obtuvo una DER de áreas relativas menor al 12 % (Tabla 5), mientras que para el segundo se observó una mayor variación con valores de DER entre 17.7 y 23.3 % (Tabla 6).

Tabla 5. Áreas relativas utilizando MSTFA como derivatizante

Réplica	Compuesto						
	Galaxolida	Tonalida	4-MBC	Oxibenzona	Padimato-O	2-EHMC	Octocrileno
1	0.20	0.18	0.15	0.51	1.32	0.89	0.12
2	0.18	0.16	0.13	0.53	1.45	0.97	0.15
3	0.17	0.14	0.12	0.51	1.46	0.99	0.14
Promedio	0.2	0.2	0.1	0.5	1.4	1.0	0.1
DE	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0
DER	7.9	11.6	11.9	1.9	5.4	6.0	11.5

DE: Desviación estándar, DER: Desviación estándar relativa

Tabla 6. Áreas relativas utilizando BSTFA como derivatizante

Répica	Compuesto						
	Galaxolida	Tonalida	4-MBC	Oxibenzona	Padimato-O	2-EHMC	Octocrileno
1	0.17	0.15	0.14	0.47	0.95	0.87	0.13
2	0.24	0.21	0.20	0.34	1.37	0.91	0.16
3	0.24	0.19	0.15	0.52	1.19	1.30	0.19
Promedio	0.2	0.2	0.2	0.4	1.2	1.0	0.2
DE	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.2	0.0
DER	18.6	18.6	17.7	21.0	17.9	23.3	19.3

DE: Desviación estándar, DER: Desviación estándar relativa

La reacción de derivatización con MSTFA (Figura 19) se realizó a 30 y 60 min, cada experimento se realizó por triplicado y se compararon las dos medias de la respuesta con una prueba t (Tabla 7), debido a que no hubo diferencia significativa entre ellas, se decidió seleccionar 30 min para reducir el tiempo de análisis.

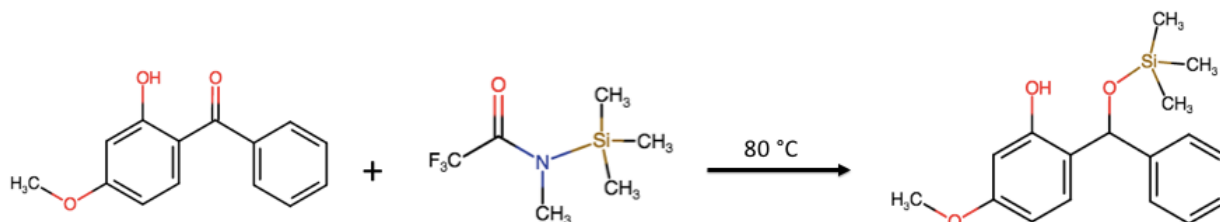


Figura 19. Reacción de derivatización de la oxibenzona

Tabla 7. P-values de la prueba t para la reacción de derivatización con MSTFA a 30 y 60 min

Compuesto	p-value
Galaxolida	0.4045
Tonalida	0.4738
4-MBC	0.3235
Oxibenzona	0.3467
Padimato-O	0.1059
2-EHMC	0.5803
Octocrileno	0.2222

Para disminuir la variación de la respuesta debida a la preconcentración de los analitos en el inyector, se probaron como estándar interno Fen, B[a]P y B[a]A. Cuando se usó Fen como estándar interno el área relativa de los analitos tuvo variaciones muy altas (DER > 40%, n=12), ya que el Fen fue afectado por la preconcentración en el inyector debido a su alta volatilidad. Por otro lado, el B[a]P se retuvo fuertemente en la columna (aproximadamente de 23.2 min) debido a su carácter no polar, y se obtuvo un pico ancho, que no corrigió las variaciones en el área de los almizcles y provocó que se incrementara el tiempo de análisis. Finalmente, se seleccionó como estándar interno B[a]A porque se obtuvo la mejor repetibilidad para todos los analitos (DER < 16%, n=6), incluso para los almizcles que son los analitos con la mayor variación. En la Figura 20 se presentan los cromatogramas de una solución estándar en acetato de etilo y otro derivatizado con MSTFA. Se observó que en este último la respuesta de la oxibenzona se incrementó (aproximadamente cinco veces) así como la de los otros filtros UV ya que la transferencia de masa del inyector hacia la columna se favoreció con el uso del derivatizante.

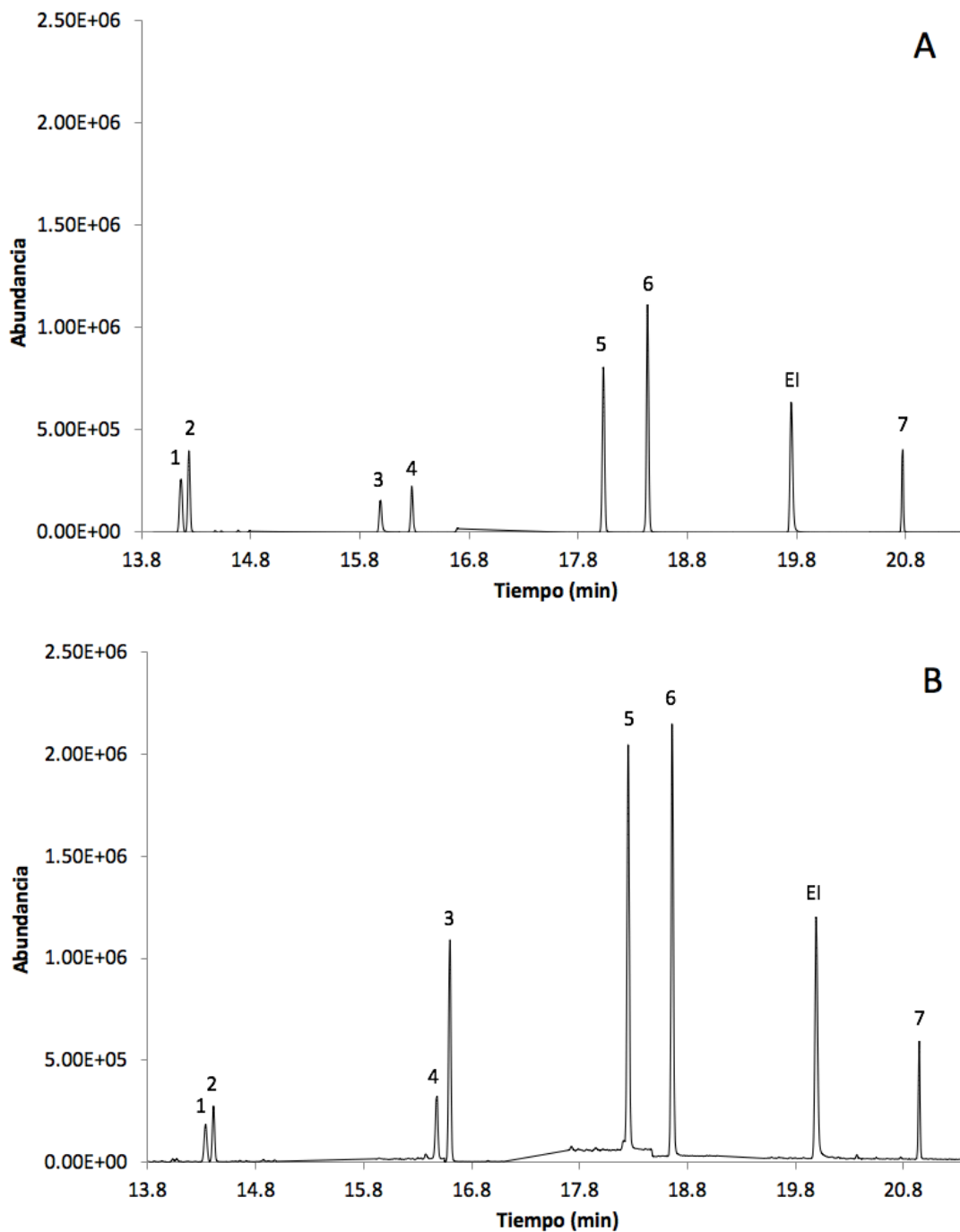


Figura 20. Cromatograma iónico (SIR) del análisis por GC-MS de un estándar en acetato de etilo (A) y un estándar derivatizado con MSTFA (B) ambos a 200 ng/mL. Condiciones cromatográficas en la sección 2.4.

Identificación: 1. Galaxolida, 2. Tonalida, 3. Oxibenzona/Oxibenzona-TMS, 4. 4-MBC, 5. Padimato-O, 6. 2-EHMC, 7. Octocrileno, EI (estándar interno). B[a]A

Para evaluar la estabilidad del extracto derivatizado con MSTFA se realizó un experimento por triplicado, se comparó la relación de áreas promedio inicial con la obtenida a las 14 y 24 h, aunque se observó que a mayor tiempo se incrementó la respuesta de los analitos debido a la evaporación del MSTFA, al comparar con un análisis de varianza (ANOVA) la relación de áreas de los analitos con el B[a]A en los diferentes tiempos evaluados, no se obtuvo una diferencia significativa en la respuesta ($\alpha=0.05$) con lo que se concluye que el derivado es estable hasta las 24 h, por lo que para evitar un incremento en el área de los picos, los derivados se inyectaron en el sistema PSSI-GC-MS justo después de su preparación.

3.1.3. Validación del sistema PSSI-GC-MS

3.1.3.1. Validación con estándares en acetato de etilo

Los resultados de la validación del sistema cromatográfico con estándares disueltos en acetato de etilo se muestran en la Tabla 8. La repetibilidad fue buena con valores de DER para la relación de áreas menores al 11% para todos los analitos, también la linealidad fue aceptable con valores de r^2 mayores a 0.99, y se confirmó con una prueba de ANOVA (Anexo III) y con la evaluación de la aleatoriedad de los residuales. Los valores de LD estuvieron en un intervalo de 0.25 - 3 ng/mL y los de LC entre 1 y 7 ng/mL.

Tabla 8. Datos de validación del sistema cromatográfico con estándares en acetato de etilo

Compuesto	DER ^a (n=6)	Ecuación de la recta ^b	r ²	LD ^c (ng/mL)	LC ^d (ng/mL)
Galaxolida	10.9	$y = 0.0023 (\pm 0.0002) x - 0.0433 (\pm 0.1233)$	0.994	0.5	1.5
Tonalida	7.9	$y = 0.0030 (\pm 0.0003) x - 0.0940 (\pm 0.1887)$	0.991	0.5	1.5
Oxibenzona	10.1	$y = 0.0016 (\pm 0.0002) x - 0.0588 (\pm 0.0918)$	0.992	3	7
4-MBC	6.6	$y = 0.0019 (\pm 0.0002) x - 0.0829 (\pm 0.1254)$	0.991	2	5
Padimato-O	6.1	$y = 0.0074 (\pm 0.0008) x - 0.3429 (\pm 0.4443)$	0.992	1	2
2-EHMC	3.8	$y = 0.0097 (\pm 0.0009) x - 0.4234 (\pm 0.5191)$	0.993	0.25	1
Octocrileno	4.8	$y = 0.0027 (\pm 0.0002) x - 0.1029 (\pm 0.1322)$	0.995	2	5

^a Para un estándar a una concentración de 200 ng/mL de cada analito

^b Se graficó x (ng/mL) contra y (área relativa). Evaluada entre 50 y 1000 ng/mL, intervalo de confianza al 95%.

^c Determinado con S/N de 3

^d Determinado con S/N de 10

3.1.3.2. Validación con derivados de MSTFA

Se obtuvo buena precisión con valores de DER menores al 12% para todos los analitos; linealidad aceptable con $r^2 > 0.97$ (Tabla 9), y se confirmó con una prueba de ANOVA (Anexo III) así como la evaluación de la aleatoriedad de los residuales. En las ecuaciones de la recta para galaxolida y tonalida (Tabla 9) se observó que al incrementar (500-1000 ng/mL) el intervalo de concentración aumentó la ordenada al origen, posiblemente debido a que estos analitos son volátiles y se ven más afectados por la preconcentración en el inyector porque se pierden durante el venteo del disolvente y la respuesta disminuye.

Los valores de LD y LC estuvieron entre 1-2 ng/mL y 2.5-5 ng/mL, respectivamente. Estos valores fueron diferentes a los obtenidos para los estándares en acetato de etilo lo que indica un cambio de sensibilidad. En cromatografía de gases la naturaleza del disolvente en el que se preparan las disoluciones puede afectar la transferencia de masa del analito a la columna y modificar su respuesta.

Tabla 9. Resultados de validación del sistema cromatográfico de estándares derivatizados con MSTFA

Compuesto	DER ^a (n=6)	Ecuación de la recta	r ²	LD ^c (ng/mL)	LC ^d (ng/mL)
Galaxolida	7.9	y = 0.0021 (\pm 0.0003) x -0.0408 (\pm 0.1142) ^b	0.982	1	3
		y = 0.0029 (\pm 0.0006) x -0.8445 (\pm 0.5217) ^c	0.978		
Tonalida	10.7	y = 0.0026 (\pm 0.0004) x -0.0614 (\pm 0.1311) ^b	0.983	1.5	5
		y = 0.0035 (\pm 0.0006) x -0.9417 (\pm 0.5257) ^c	0.983		
Oxibenzona-TMS	11.9	y = 0.0101 (\pm 0.0013) x -0.1502 (\pm 0.1453) ^c	0.988	1	2.5
4-MBC	1.9	y = 0.0031 (\pm 0.0004) x -0.0810 (\pm 0.1155) ^c	0.990	1	2.5
Padimato-O	5.4	y = 0.0217 (\pm 0.0016) x -0.1756 (\pm 0.1940) ^c	0.996	1	2.5
2-EHMC	6.0	y = 0.0178 (\pm 0.0016) x -0.2073 (\pm 0.1919) ^c	0.994	1	2.5
Octocrileno	11.5	y = 0.0034 (\pm 0.0006) x -0.0538 (\pm 0.0674) ^c	0.979	2	5

^a Para un estándar a una concentración de 200 ng/mL de cada analito

^b Se graficó x (ng/mL) contra y (área relativa). Evaluada entre 10 y 600 ng/mL, intervalo de confianza de 95%.

^c Se graficó x (ng/mL) contra y (área relativa). Evaluada entre 500 y 1000 ng/mL, intervalo de confianza de 95%.

^c Determinado con S/N de 3

^d Determinado con S/N de 10

3.2. Método MSPD-PSSI-GC-MS

3.2.1. Optimización

Se seleccionó acetonitrilo como disolvente de elución debido a su baja afinidad por los lípidos, y como adsorbente se utilizó florisil debido a su alta afinidad por lípidos y carbohidratos, lo que ayudó a obtener extractos con pocos compuestos coextraídos¹⁸.

Las mejores condiciones fueron las siguientes: relación muestra dispersante 1:5, con 0.2 g de músculo liofilizado (equivalente a 1 g de músculo fresco) y 1 g de florisil como dispersante; 0.5 g de sílice C18 PAH como co-columna de limpieza y 5 mL de acetonitrilo como disolvente de elución. Con estas condiciones se obtuvo un extracto casi libre de interferentes, especialmente sin lípidos.

En la Figura 21 se muestra el cromatograma iónico de una muestra de músculo control y una muestra fortificada. A pesar de las precauciones tomadas para evitar contaminación, en el cromatograma de la muestra control se observaron algunos interferentes en el tiempo de retención de galaxolida, tonalida y 2-EHMC, este problema se ha reportado en otros estudios debido a que estos compuestos son ubicuos en el ambiente por su uso diario en la vida cotidiana.^{49,38,122} Sin embargo, su contribución a la respuesta de los analitos se encuentra por debajo del LC, con valores de S/N de 4, 2 y 6 para galaxolida, tonalida y 2-EHMC, respectivamente. El cromatograma iónico muestra buena resolución y selectividad para todos los analitos, incluso para el par crítico de galaxolida y tonalida.

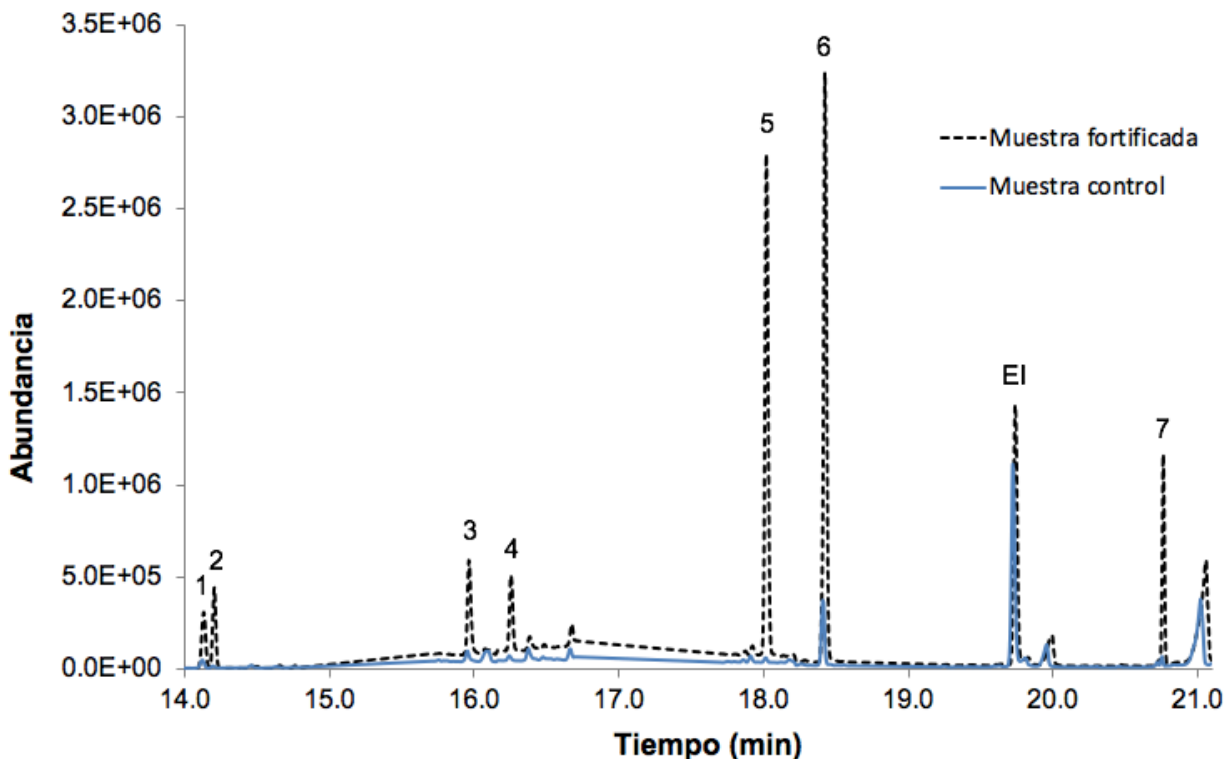


Figura 21. Cromatograma iónico (SIR) del análisis por MSPD-GC-MS de una muestra de músculo control y una muestra de músculo fortificado a 1 $\mu\text{g/g}$ (sección 2.5.2). Condiciones cromatográficas en la sección

2.4. Identificación: 1. Galaxolida, 2. Tonalida, 3. Oxibenzona, 4. 4-MBC, 5. Padimato-O,

6. 2-EHMC, 7. Octocrileno, EI. B[a]A

3.2.2. Pérdida de los analitos por evaporación

En el método de MSPD para eluir a los analitos se utilizaron 5 mL de acetonitrilo, y aunque éste mostró un buen desempeño como eluyente, tiene una compatibilidad limitada con el análisis por cromatografía de gases, obteniéndose valores de DER entre 12 y 23%. Esta baja precisión está relacionada con el alto coeficiente de expansión del acetonitrilo en el inyector del cromatógrafo y su alta polaridad en comparación con la fase estacionaria de la columna capilar¹⁸. Por lo que fue necesario evaporar los extractos y reconstituirlos en un volumen menor y con un disolvente menos polar que tuviera un coeficiente de expansión bajo, como el acetato de etilo. De esta manera se aumentó la concentración del extracto y se disminuyó el LD del método.

Debido a la evaporación del extracto con temperatura y flujo de nitrógeno, fue necesario evaluar si existían pérdidas de los analitos en este paso, especialmente de los almizcles.

Se observó una ligera disminución en la respuesta para galaxolida, tonalida y oxibenzona, con recobros entre 90.7 y 93.6 %, mientras que para los demás analitos no se observaron pérdidas significativas, se recuperó entre 96.9 y 104.2 % (Tabla 10).

Tabla 10. Pérdida por evaporación de los extractos de MSPD

Estándar	% Recobro						
	Galaxolida	Tonalida	Oxibenzona	4-MBC	Padimato-O	2-EHMC	Octocrileno
1	82.52	82.50	97.98	97.10	99.09	101.67	103.44
2	91.29	90.89	89.99	92.37	95.44	100.53	106.04
3	98.92	98.63	92.68	104.64	96.24	100.21	103.23
Promedio	90.9	90.7	93.6	98.0	96.9	100.8	104.2
DE	8.2	8.1	4.1	6.2	1.9	0.8	1.6
DER	9.0	8.9	4.3	6.3	2.0	0.8	1.5

3.2.3. Efecto matriz

El efecto matriz es el efecto combinado sobre la respuesta del analito causado por todos los componentes de la muestra, estos componentes pueden interferir con el proceso de ionización en el espectrómetro de masas causando disminución o aumento de la respuesta analítica; este efecto ha sido reportado en técnicas bioanalíticas debido a la complejidad de la matriz¹³⁰.

Este efecto se determinó con una relación de pendientes de las curvas de calibración, se dividió la obtenida con extractos de pescado fortificados entre la de estándares en disolvente puro, los resultados se muestran en la Tabla 11. A pesar de que en el cartucho de MSPD se adicionó sílice C18 como co-columna para limpiar el extracto y que se usó un estándar interno, el efecto matriz fue significativo. Para galaxolida y tonalida en la curva de calibración de los extractos control fortificados se observó una disminución de la respuesta cercana al 60% por lo que la relación de pendientes fue de 0.4. Por otro lado, en los filtros UV se observó el efecto contrario, la señal se incrementó aproximadamente un 100%, al igual que la señal del estándar interno que pudo compensar este efecto y la relación de pendientes fue cercana a 1 (entre 0.92 y 1.31), mientras que la oxibenzona incrementó la respuesta en un 200% dando una relación de pendientes de 2.5.

Tabla 11. Relación de pendientes de la curva de extractos fortificados y la de disolvente puro

Analito	Ecuación de la recta en disolvente puro ^a	Ecuación de la recta fortificando extractos control ^a	Relación de pendientes
Galaxolida	$y = 0.0023x - 0.0433$	$y = 0.0009x + 0.0406$	0.39
Tonalida	$y = 0.0030x - 0.0940$	$y = 0.0012x + 0.018$	0.40
Oxibenzona	$y = 0.0016x - 0.0588$	$y = 0.004x + 0.0215$	2.50
4-MBC	$y = 0.0018x - 0.0829$	$y = 0.0013x + 0.011$	0.72
Padimato-O	$y = 0.0074x - 0.3429$	$y = 0.0097x - 0.0358$	1.31
2-EHMC	$y = 0.0097x - 0.4234$	$y = 0.0095x + 0.1335$	0.98
Octocrileno	$y = 0.0027x - 0.1029$	$y = 0.002x + 0.0462$	0.74

^a Ecuación de linealidad obtenida graficando x (ng/mL) contra y (área relativa)

La polaridad y la estabilidad de un compuesto son factores importantes que influyen el grado de incremento en la respuesta causado por el efecto matriz. Se ha mostrado que los analitos con grupos polares como la oxibenzona, tienen un gran potencial de adsorción con sitios activos, y una fracción de estos se descomponen en el sistema cromatográfico por lo que son más susceptibles a que su respuesta se incremente debido a los efectos protectores de la matriz. Por otro lado el incremento en la hidrofobicidad y el número de átomos de carbono no polares en los compuestos hace que el efecto matriz disminuya¹³⁰. Posiblemente, la eficiencia de la inyección (transferencia

de masa del inyector a la columna) se incrementó en los extractos de la muestra en comparación con estándares en disolución. Esto se puede relacionar al enmascaramiento de sitios activos en el inyector del cromatógrafo por componentes co-extraídos de la matriz, así como un efecto protector de estos mismos componentes con los analitos. Este comportamiento ya ha sido reportado en la determinación de pesticidas en muestras de biota¹³¹.

Debido a estos resultados la cuantificación se realizó usando las curvas de calibración con extractos de trucha control fortificados, para compensar el efecto matriz.

3.2.4. Validación del método MSPD-PSSI-GC-MS

Para la precisión (repetibilidad inter-día) se obtuvieron valores de DER < 19% (Tabla 12). Estos valores están de acuerdo con la Guía de las Naciones Unidas para pruebas con especímenes biológicos, ésta considera que un método es preciso cuando los valores de DER son menores al 20% para determinaciones a nivel de trazas¹³².

El recobro promedio fortificando a 0.1 µg/g estuvo entre 77 y 111%, mientras que fortificando a 1 µg/g fueron entre 88 y 108 %, esto se obtuvo para casi todos los analitos excepto oxibenzona que fue el recobro más bajo (55%), probablemente debido a que es retenido fuertemente por el florisil. Los valores de LD y LC fueron 4-12 y 13-40 ng/g, respectivamente, mostrando que están a nivel de trazas (Tabla 12). Para la linealidad en los diferentes intervalos de concentración se obtuvieron coeficientes de determinación (r^2) mayores a 0.96 (Tabla 13), lo que se confirmó con una prueba de ANOVA ($\alpha=0.05$) se rechaza H_0 , que supone nula relación entre las variables, y en los residuales no se observó tendencia.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 12. Validación del método MSPD-PSSI-GC-MS (certeza, precisión, LD y LC)

Compuesto	Certeza (n=6)		Precisión (n=6)		LD ^a (ng/g)	LC ^b (ng/g)
	% Recobro 0.1 µg/g	% Recobro 1 µg/g	DER 0.1 µg/g	DER 1 µg/g		
Galaxolida	89	108	18	13	6	20
Tonalida	79	98	18	13	8	25
Oxibenzona	80	55	8	16	12	40
4-MBC	101	102	19	12	6	25
Padimato-O	77	88	6	10	8	25
2-EHMC	111	96	12	11	4	13
Octocrileno	96	105	7	7	12	40

^a Determinado en base seca con S/N de 3

^b Determinado en base seca con S/N de 10

Tabla 13. Linealidad del método MSPD-PSSI-GC-MS

Compuesto	Intervalo de concentración (µg/g)	Ecuación de la recta (n=3)	r ²
Tonalida	0.05-1	$y = 0.00023 (\pm 0.00001) x + 0.01183 (\pm 0.00731)^a$	0.9987
	1-75	$y = 0.187(\pm 0.041) x + 0.498(\pm 1.718)^b$	0.9643
Galaxolida	0.05-1	$y = 0.00035 (\pm 0.00004) x + 0.02049 (\pm 0.02212)^a$	0.9946
	1-60	$y = 0.409(\pm 0.019) x + 0.512(\pm 0.847)$	0.9766
Oxibenzona	0.05-1	$y = 0.00040 (\pm 0.00007) x + 0.07508 (\pm 0.04467)^a$	0.9829
	1-60	$y = 0.298(\pm 0.025) x + 0.693(\pm 0.933)^b$	0.9836
4-MBC	0.05-1	$y = 0.00022 (\pm 0.00003) x + 0.01894 (\pm 0.02199)^a$	0.9872
	1-60	$y = 0.163(\pm 0.018) x + 0.432(\pm 0.656)^b$	0.9743
Padimato-O	0.05-1	$y = 0.00157 (\pm 0.00009) x + 0.00241 (\pm 0.05632)^a$	0.9982
	1-40	$y = 1.413(\pm 0.158) x + 0.720(\pm 4.185)^b$	0.9948
2-EHMC	0.05-1	$y = 0.00162 (\pm 0.00029) x + 0.26992 (\pm 0.17850)^a$	0.9841
	1-40	$y = 1.600(\pm 0.186) x + 1.284(\pm 4.545)^b$	0.9747
Octocrileno	0.05-1	$y = 0.00038 (\pm 0.00004) x + 0.02106 (\pm 0.02760)^a$	0.9929
	1-60	$y = 0.335(\pm 0.024) x + 0.642(\pm 0.859)^b$	0.9946

^a Ecuación de linealidad obtenida graficando x (ng/g) contra y (área relativa). Intervalo de confianza al 95%.

^b Ecuación de linealidad obtenida graficando x (µg/g) contra y (área relativa). Intervalo de confianza al 95%.

3.3. Método *in vitro* SPME-PSSI-GC-MS

3.3.1. Optimización

Para optimizar el disolvente de desorción de la fibra se estudiaron metanol y acetonitrilo, ambos compatibles con la fase C18 de la fibra.

La primera desorción se realizó con 300 μ L de disolvente (300 rpm, 2h), posteriormente se hicieron otras dos desorciones (2 x 300 μ L, 300 rpm, 1h). Para obtener el recobro acumulado se tomó como 100 % el área total de las tres desorciones, y con base en esta se calculó el porcentaje recuperado en cada desorción (Tabla 14). Se observó que con ambos disolventes en la primera desorción se recuperó el 100% de 4-MBC, padimato-O y 2-EHMC. El recobro menor en la primera desorción fue para octocrileno, se obtuvo un 89% con metanol y 92% con acetonitrilo. Para recuperar completamente a galaxolida, oxibenzona y octocrileno con metanol se necesitaron tres desorciones, mientras que con acetonitrilo solo dos. Esto se debió a que la fuerza eluente del metanol es menor que la del acetonitrilo, por ello este último se seleccionó como disolvente de desorción para disminuir el tiempo de análisis.

Tabla 14. Recobro promedio de la desorción de la fibra (n=2)

Compuesto	% Recobro					
	Metanol			Acetonitrilo		
	2h	1h	1h	2h	1h	1h
Galaxolida	92	4	4	94	6	ND
Tonalida	97	3	ND	96	4	ND
4-MBC	100	ND	ND	100	ND	ND
Oxibenzona	93	4	3	96	4	ND
Padimato-O	100	ND	ND	100	ND	ND
2-EHMC	100	ND	ND	100	ND	ND
Octocrileno	89	7	4	92	8	ND

ND = No detectado

3.3.2. Efecto matriz

Para evaluar el efecto matriz se realizó una comparación de los promedios de áreas relativas de los estándares en disolvente puro y extractos fortificados de muestras control (Tabla 15). Al realizar una prueba t para comparar ambas medias no se obtuvo una diferencia significativa con un intervalo de confianza del 95%, es decir que no hay un efecto matriz cuando se usa *in vitro* o *in vivo* SPME. Lo anterior probablemente se debe a la selectividad de la fibra que de acuerdo con la literatura⁸⁰, tiene en el recubrimiento un material biocompatible. Éste permite exponer la fibra directamente en el tejido para extraer los analitos sin co-extraer macromoléculas presentes en la matriz como lípidos y proteínas, por lo tanto, se obtienen extractos con pocos interferentes y se disminuye el efecto matriz.

Tabla 15. Evaluación del efecto matriz

Analito	Relación de áreas promedio de estándares en acetonitrilo a 200 ng/mL (n=3)	Relación de áreas promedio de extracto fortificado a 200 ng/mL (n=3)	Prueba t p-value
Galaxolida	0.35 ± 0.05	0.34 ± 0.08	0.88710
Tonalida	0.42 ± 0.06	0.38 ± 0.05	0.38225
4-MBC	0.46 ± 0.02	0.45 ± 0.03	0.48443
Oxibenzona	1.85 ± 0.04	1.90 ± 0.11	0.50885
Padimato-O	2.51 ± 0.07	2.43 ± 0.15	0.43875
2-EHMC	2.46 ± 0.05	2.43 ± 0.20	0.80989
Octocrileno	0.57 ± 0.04	0.61 ± 0.04	0.34489

3.3.3. Reutilización de las fibras

Se realizó una prueba para ver si las fibras se podían reutilizar. Se observó que para todos los analitos la respuesta va disminuyendo cada vez que se lava la fibra, y cuando se usa por tercera vez la eficiencia de extracción disminuye en más de 90% con respecto a la fibra nueva, este comportamiento se observó con todos los tiempos de extracción estudiados (5, 10, 15, 20, 30 y 40 min). Debido a lo anterior se utilizó una fibra por cada experimento (Figura 22 y Figura 23).

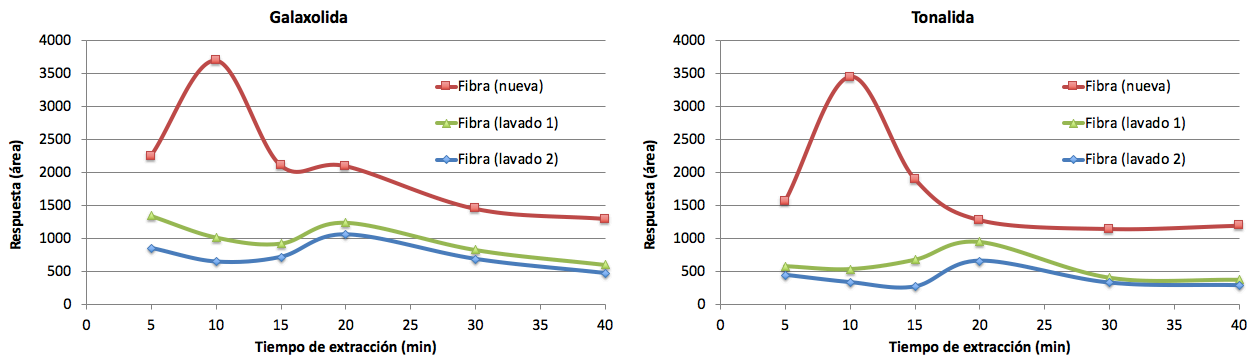


Figura 22. Reutilización de fibras para almizcles

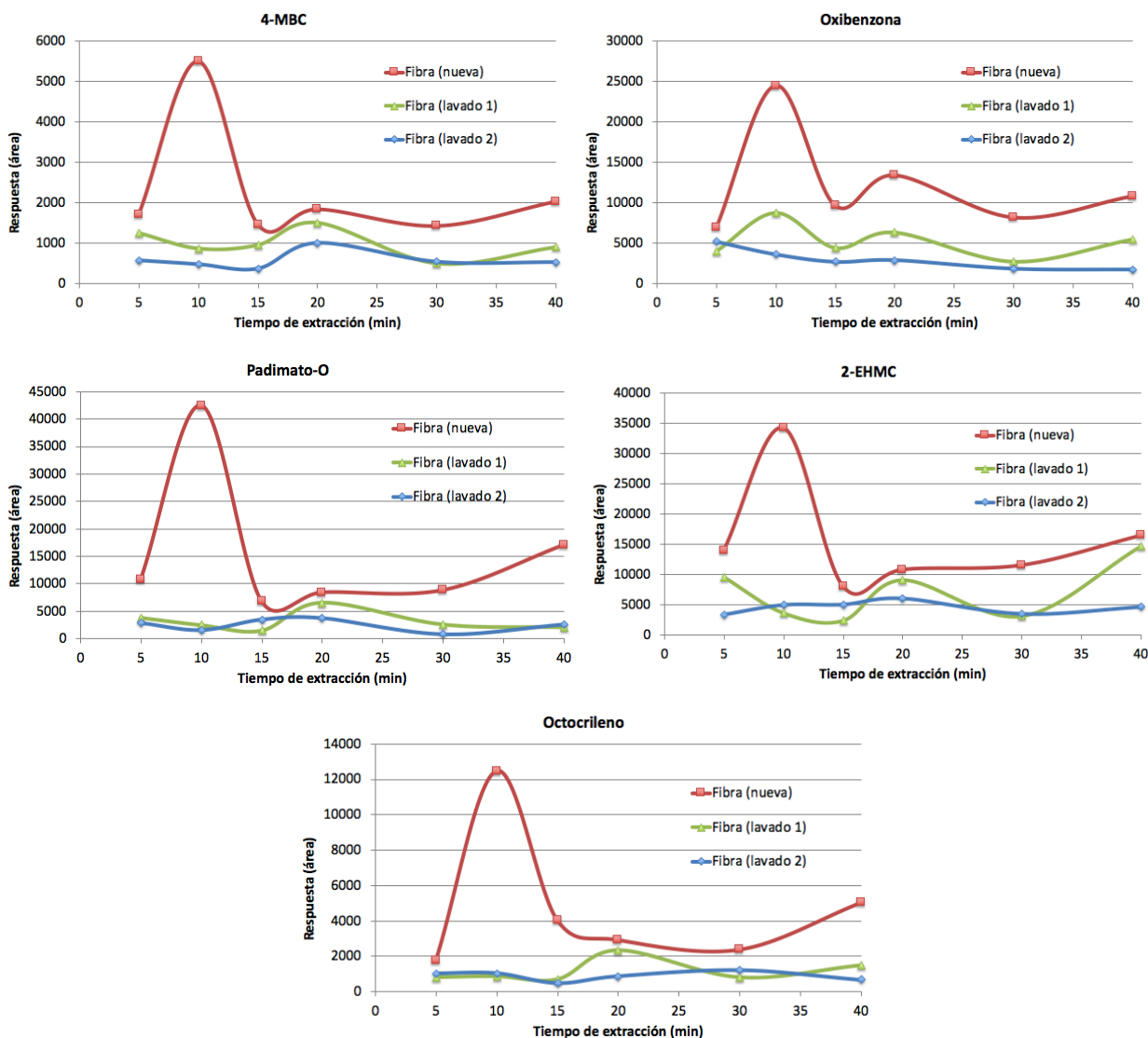


Figura 23. Reutilización de fibras para filtros UV

3.3.4. Perfil de extracción *in vitro*

En la Figura 24 se muestra el perfil de extracción *in vitro*, como se observa se requiere un tiempo mayor a 55 min para llegar al equilibrio, probablemente debido a la naturaleza lipofílica de la mayoría de los analitos ($\text{Log } K_{ow} > 5.5$, Tabla 1), por esto es necesario realizar una calibración en el intervalo cinético. De acuerdo con estos resultados se seleccionó un tiempo de extracción de 20 min, que se recomienda para este tipo de ensayos, porque se encuentra en el intervalo cinético, por otro lado, si el tiempo de extracción es mayor aumenta el estrés y la manipulación del pez.

Para calibrar en el intervalo cinético se utilizó la ecuación 8 (sección 1.6.2) mostrada a continuación:

$$C_0 = \frac{n}{R_s t}$$

En esta ecuación la cantidad del analito extraída por la fibra es proporcional a la concentración inicial en el músculo, si los demás parámetros se mantienen constantes, entonces al graficar n (ng) contra $C_0 t$ (ng min/mg) se obtiene una recta cuya pendiente es la velocidad de muestreo predeterminada R_s *in vitro* (mg/min) y se obtiene una curva de calibración $n = f(C_0)$, si se reordena la ecuación 8 se obtiene:

$$n = R_s C_0 t$$

Donde: n = variable dependiente (y)
 R_s = pendiente de la curva (m)
 $C_0 t$ = variable independiente (x)
 $b = 0$ (considerando que a $t=0$, $n=0$)

Las curvas de calibración *in vitro* obtenidas se muestran en las Figuras 23 a 25.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

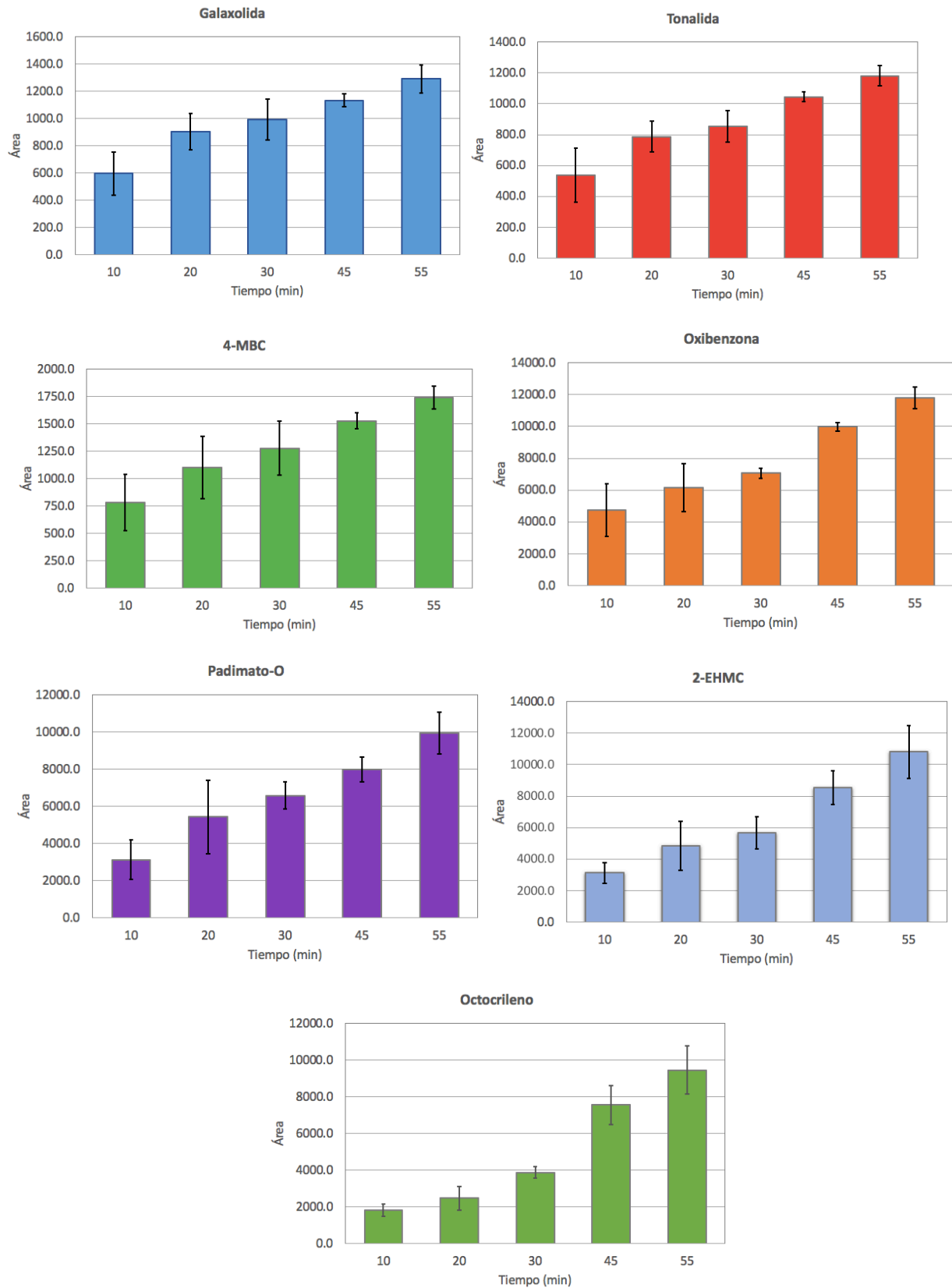


Figura 24. Perfil de extracción *in vitro* obtenido con músculo de pescado fortificado a 5 µg/g (n=3)

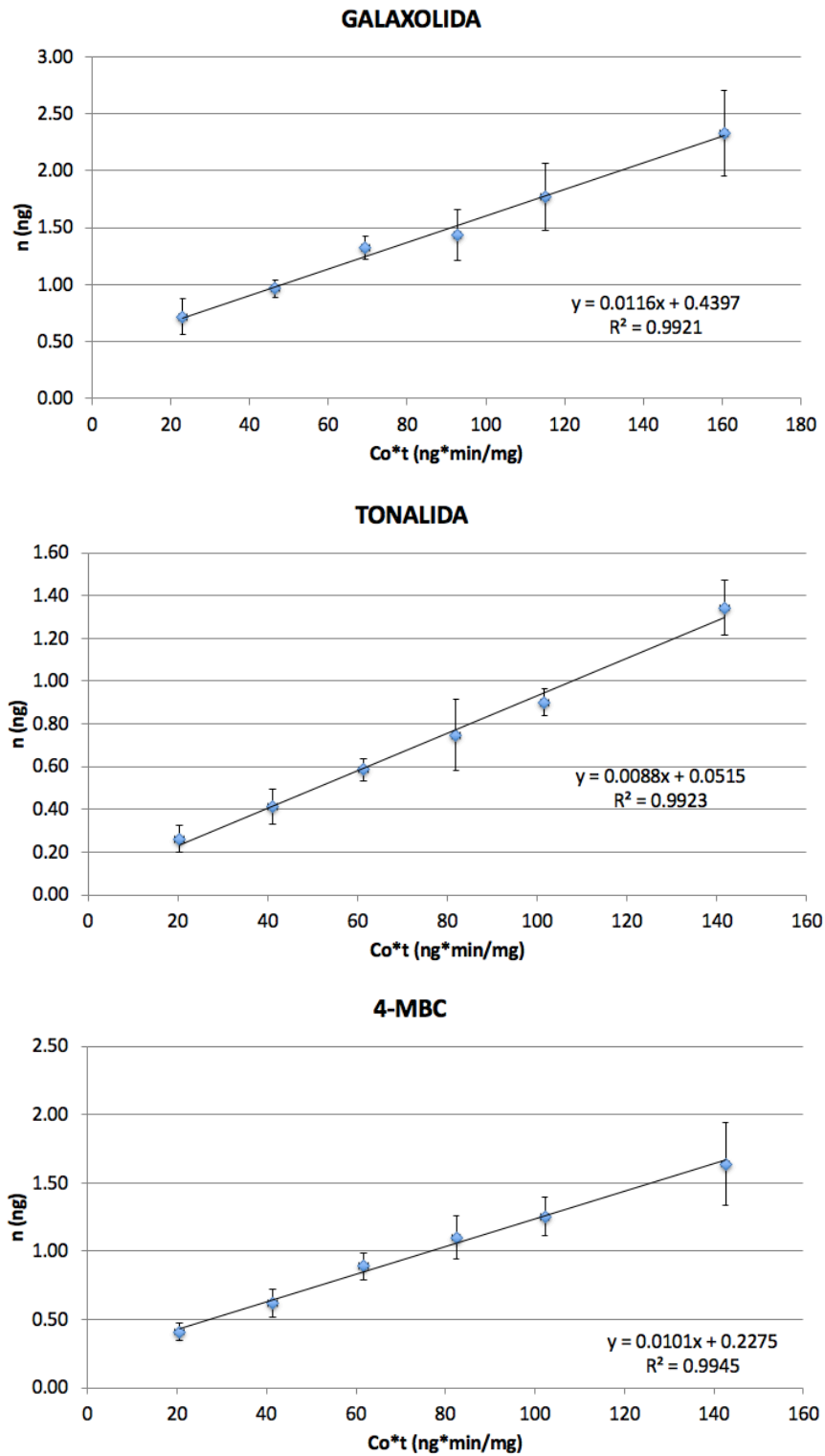


Figura 25. Linealidad de 1-7 $\mu\text{g/g}$ para los almizcles y 4-MBC, la pendiente de la curva es R_s *in vitro*

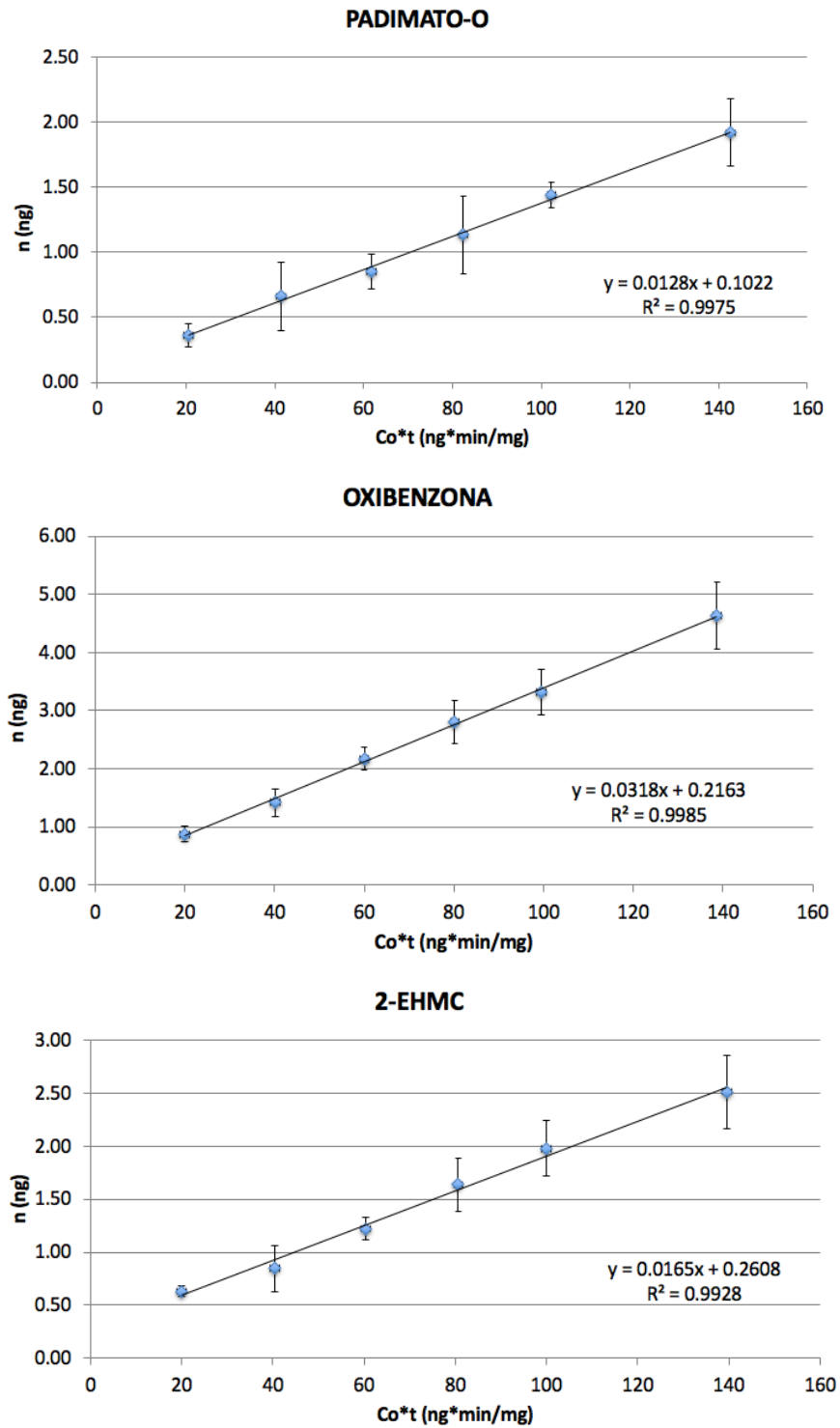


Figura 26. Linealidad de 1-7 $\mu\text{g/g}$ para padimato-O, oxibenzona y 2-EHMC, la pendiente de la curva es R_s *in vitro*

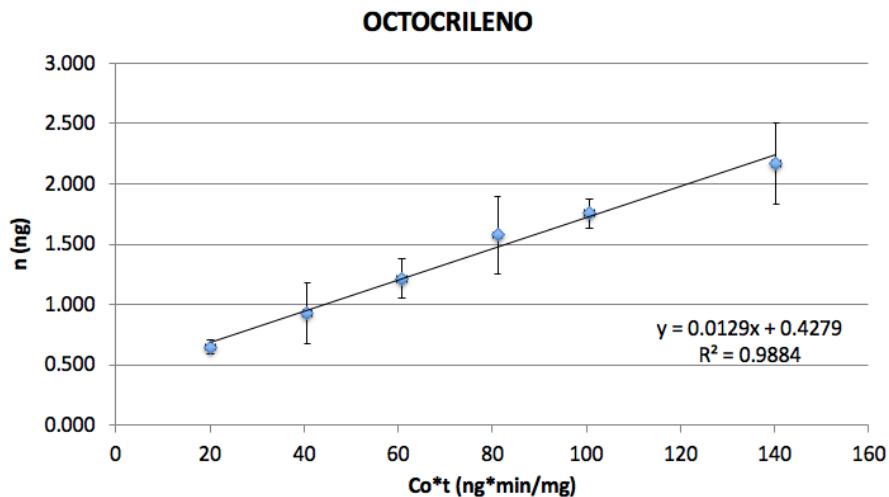


Figura 27. Linealidad de 1-7 $\mu\text{g/g}$ para octocrileno, la pendiente de la curva es R_s *in vitro*

Los valores de R_s estuvieron entre 0.0088 y 0.0318 mg/min (Tabla 16) y varían entre almizcles y filtros UV probablemente debido a las diferencias en los grupos funcionales de los compuestos y sus propiedades fisicoquímicas. Los valores de r^2 para todos los analitos fueron mayores a 0.98, lo que indica que el valor de R_s se mantiene constante independientemente de la concentración de los analitos en el músculo ya que de no ser así se perdería la linealidad. Esto se debe a que está en el intervalo cinético del perfil de extracción, y el tiempo de 20 min se encuentra en el subintervalo lineal (Figura 12), que se requiere para usar el método de calibración de velocidad de muestreo predeterminada.

3.3.5. Validación *in vitro*

La linealidad fue adecuada, se obtuvo un valor de $r^2 > 0.98$ para todos los analitos, se confirmó con la prueba de ANOVA (Anexo III) y no se observó tendencia en los residuales. Por lo anterior se concluye que 20 min fue un tiempo adecuado para la extracción, pues se encuentra en el intervalo cinético lineal (Figura 12). La pendiente de la curva de calibración es el valor de R_s *in vitro*, que permanece constante de 1-7 $\mu\text{g/g}$ y es independiente de la concentración, los valores de R_s *in vitro* estuvieron entre 0.0088-0.0318 mg/min para todos los analitos. Los valores mayores de la ordenada al origen para galaxolida y octocrileno podrían ser resultado de la preconcentración en el inyector e interacciones con los compuestos co-extraídos de la matriz.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para la precisión (repetibilidad inter-día) se obtuvieron valores de DER entre 10.7 y 30.5%, estos fueron aceptables para una metodología que implica la extracción a nivel de trazas de compuestos orgánicos del músculo de animales vivos (Tabla 16). Los almizcles galaxolida y tonalida tuvieron la mayor variabilidad debido probablemente a que son los analitos más volátiles.

Tabla 16. Validación y R_s *in vitro* SPME -GC-MS

Compuesto	Ecuación ^a	r^2	Precisión, DER (n = 6)	LD ^b (ng/g)	LC ^c (ng/g)
Galaxolida	$y = 0.0116 (\pm 0.0022) x + 0.4397 (\pm 0.2183)$	0.9921	30.5	15	40
Tonalida	$y = 0.0088 (\pm 0.0011) x + 0.0515 (\pm 0.0985)$	0.9923	29.2	20	55
Oxibenzona	$y = 0.0318 (\pm 0.0039) x + 0.2163 (\pm 0.3255)$	0.9985	19.3	5	15
4-MBC	$y = 0.0101 (\pm 0.0018) x + 0.2275 (\pm 0.1539)$	0.9945	27.2	2	5
Padimato-O	$y = 0.0128 (\pm 0.0022) x + 0.1022 (\pm 0.1934)$	0.9975	24.0	10	30
2-EHMC	$y = 0.0165 (\pm 0.0026) x + 0.2608 (\pm 0.2185)$	0.9928	27.1	5	15
Octocrileno	$y = 0.0129 (\pm 0.0026) x + 0.4279 (\pm 0.2224)$	0.9884	10.7	25	70

^a Ecuación obtenida al graficar x (Cot) contra y (n). El valor de R_s *in vitro* en mg/min es la pendiente de la ecuación, intervalo de confianza al 95%

^b Calculado considerando S/N de 3

^c Calculado considerando S/N de 10

Los valores de LD estuvieron entre 2 y 25 ng/g y los de LC entre 5 y 70 ng/g, éstos son comparables con los reportados en la literatura mostrados en la Tabla 17. El uso de un sistema acoplado de GC-MS permitió alcanzar valores de LD y LC a nivel de trazas, alcanzar estos límites resulta importante debido a que los contaminantes emergentes en biota presentan concentraciones cercanas a estos niveles. Para almizcles en biota se reportaron concentraciones entre 1-246 ng/g y para filtros UV entre 9 y 2400 ng/g¹³³.

Tabla 17. Valores de LD y LC reportados en la literatura para filtros UV y almizcles

Analito	Organismo	Técnica de extracción	Análisis	LD (ng/g)	LC (ng/g)	Referencia
Filtros UV	Peces	PLE	LC-MS/MS	0.1-6	0.3-20	35
Filtros UV	Peces	MSPD	GC-MS	1-9	4-28	18
Filtros UV	Peces	ESL	GC-MS	3-56	NR	37
Filtros UV	Peces	Soxhlet	LC-MS/MS	2.4	8	38
Filtros UV	Peces	ESL	LC-MS/MS	8-36	NR	39
Filtros UV y almizcles	Peces	ESL	GC-MS/MS	4-17	NR	42
Filtros UV y almizcles	Peces, mejillones, almejas y macroalgas	Almizcles: PLE Filtros UV: QuEChERS	GC-MS/MS	0.5-7	1-20	43
Almizcles	Peces	Soxhlet	GC-MS	NR	1-2	46

PLE: extracción con líquidos presurizados; MSPD: dispersión de matriz en fase sólida; ESL: extracción sólido-líquido; QuEChERS: acrónimo en inglés de rápido, fácil, económico, eficaz, robusto y seguro, técnica de extracción en fase sólida dispersiva; NR: No reportado

3.4. Método *in vivo* SPME-PSSI-GC-MS

Para la metodología de *in vivo* SPME se realizaron las pruebas de perfil de extracción y calibración utilizando truchas juveniles.

3.4.1. Perfil de extracción

Como se observa en la gráfica de perfil de extracción (Figura 28), el tiempo para alcanzar el equilibrio fue mayor a 45 min, éste es un tiempo de extracción muy largo para los ensayos *in vivo*, ya que se recomienda usar como máximo 30 min para causar el mínimo estrés posible al pez. Los valores de área obtenidos para 30 y 45 min fueron muy similares mientras que a los 55 min se observó una disminución, esto se debe posiblemente a que para cada tiempo se muestreó un pez diferente y la respuesta depende de lo que haya acumulado, y por la variabilidad biológica cada organismo absorbe cantidades diferentes de los analitos, para mejorar la estimación es necesario aumentar el número de organismos muestreados por cada tiempo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

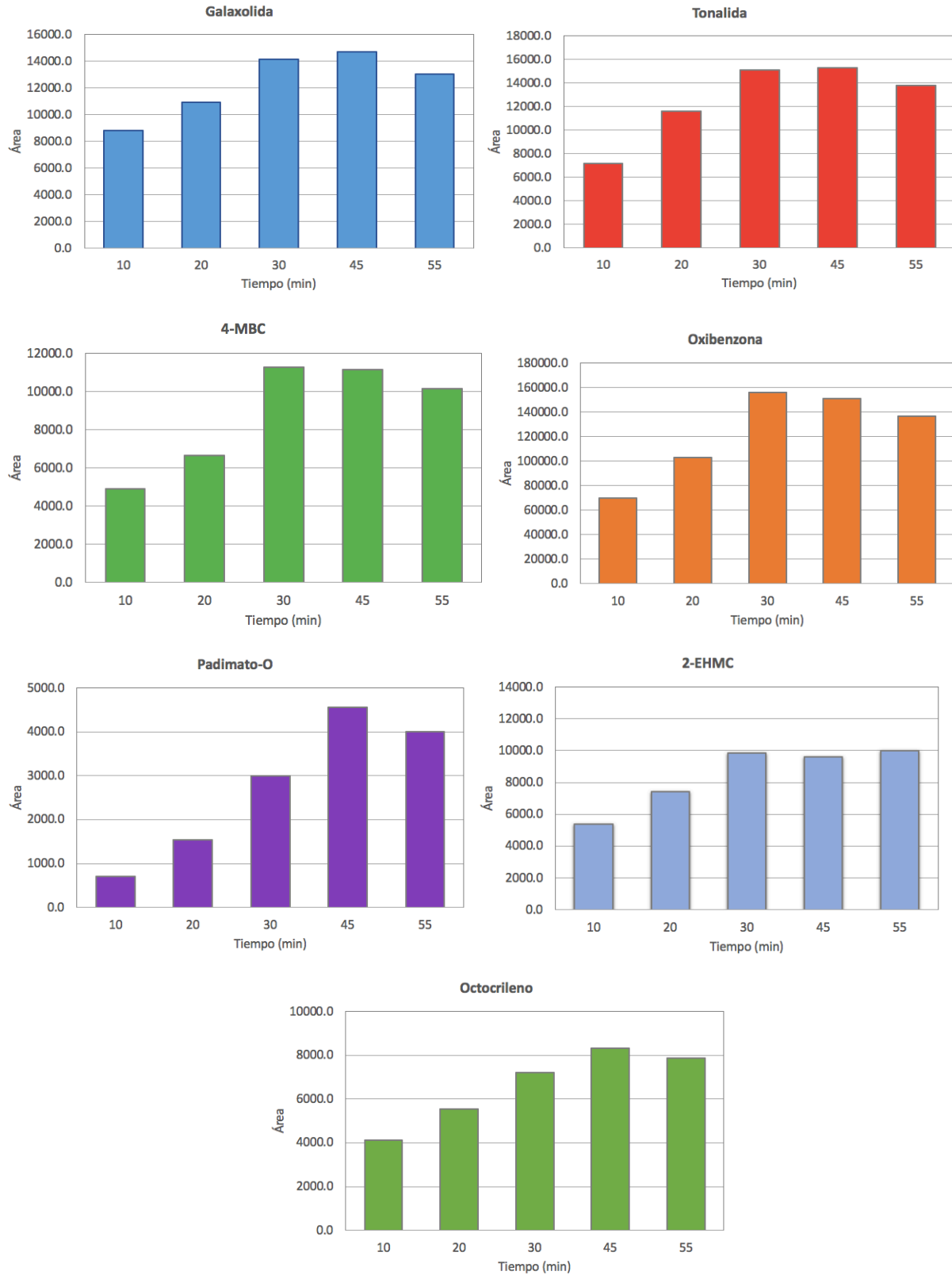


Figura 28. Perfil de extracción *in vivo* SPME de truchas expuestas en agua fortificada (100 µg/L) durante 5 días. (n=1)

El perfil de extracción *in vivo* fue similar al de *in vitro* (Figura 24), aunque éste último no presentó una disminución en la respuesta a los 55 min porque se utilizó una misma muestra para todos los tiempos y así se eliminó la variabilidad inter-pep. Por lo anterior, al igual que con el método *in vitro* se seleccionaron 20 min, este tiempo se encuentra en el intervalo cinético, por lo que es válida la calibración por velocidad de muestreo predeterminada.

En la Figura 29 se muestran los cromatogramas obtenidos con el método de *in vivo* SPME para una trucha control y una trucha expuesta. En el cromatograma del control, se observaron algunos interferentes en los tiempos de retención de galaxolida, tonalida y 2-EHMC, sin embargo, tuvieron una señal mínima, menor al LC ($S/N < 6$) y solo se detectaron en el modo SIR. Estos mismos interferentes se presentaron con el método MSPD-PSSI-GC-MS, lo que probablemente indica que son ubicuos y pseudopersistentes en el ambiente.^{49,38} El análisis de almizcles y filtros UV representó un reto, pues aunque se tomaron precauciones en el laboratorio para evitar contaminación cruzada, como el uso de guantes, disolventes de alta pureza, y un proceso intensivo de limpieza de material (sección 2.2), no fue posible eliminar completamente los interferentes. Esto se debe a que cosméticos, perfumes, cremas, champús, jabones, suavizantes de telas, entre otros, pueden contener los analitos en estudio por lo tanto el personal en el laboratorio puede ser una fuente de contaminación. También se debe considerar la contaminación en el ambiente del laboratorio proveniente de los pulidores y limpiadores de pisos y ventanas. En el cromatograma de la trucha expuesta se observa que son muy pocos los compuestos co-extraídos con los analitos, debido a la selectividad de la fibra SPME C18, que evita la extracción de macromoléculas y la limpieza posterior del extracto. Además, se observa que con las condiciones seleccionadas para el sistema cromatográfico todos los picos de los analitos están bien resueltos, tienen una forma gaussiana y no coeluyen con compuestos co-extraídos de la matriz.

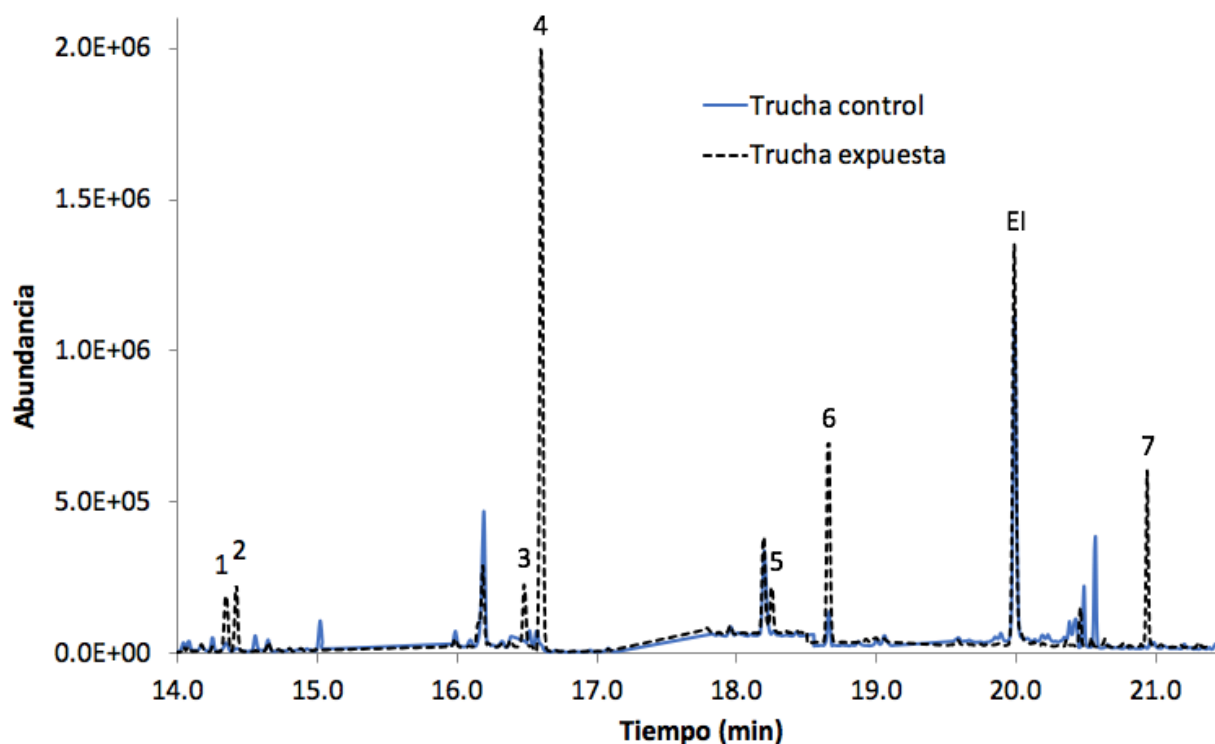


Figura 29. Cromatograma iónico (SIR) para el análisis *in vivo* SPME -PSSI-GC-MS de trucha control y trucha expuesta (5 días a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada analito). Condiciones cromatográficas en la sección 2.4.

Identificación: 1. Galaxolida, 2. Tonalida, 3. 4-MBC, 4. Oxibenzona-TMS, 5. Padimato-O, 6. 2-EHMC, 7. Octocrileno, EI. B[a]A.

3.4.2. Calibración *in vivo* SPME

Para la calibración (sección 2.7.4) se obtuvieron valores de R_s entre 0.031 - 0.306 mg/min y valores de DER entre 20.8 y 36.5 % (Tabla 18). Para los filtros UV el valor mayor de R_s fue para la oxibenzona y el menor para tonalida. En cuanto a los almizcles, aunque se esperaba que galaxolida y tonalida tuvieran valores similares de R_s por ser isómeros, estos tienen valores diferentes, siendo aproximadamente tres veces mayor para galaxolida, probablemente debido a las diferencias en los grupos funcionales de sus estructuras, pues la galaxolida tiene un éter cíclico y la tonalida un grupo cetona (Tabla 1) lo que explica la complejidad de la calibración, puesto que depende de la estructura y propiedades de cada analito.

Tabla 18. Valores de R_s (n=6) *in vivo* SPME-GC-MS

Compuesto	R_s (mg/min)	DER
Galaxolida	0.094 ± 0.024	25.7
Tonalida	0.031 ± 0.007	22.0
Oxibenzona	0.306 ± 0.116	37.8
4-MBC	0.039 ± 0.008	20.8
Padimato-O	0.040 ± 0.011	28.1
2-EHMC	0.070 ± 0.022	32.1
Octocrileno	0.045 ± 0.016	36.5

Al comparar los valores de R_s *in vitro* (Tabla 16) e *in vivo*, se realizó una prueba t y se observó que hay una diferencia significativa entre ambos (Tabla 19), los valores R_s *in vivo* fueron mayores debido a las funciones fisiológicas de los organismos vivos¹²⁹, por lo que ésta constante fue utilizada para la cuantificación en los experimentos de acumulación y eliminación. Lo anterior concuerda con un estudio reportado para almizcles⁵⁶ y contradice lo reportado en la literatura para los fármacos, donde se menciona que es posible obtener la contante R_s *in vitro* y aplicarla para la cuantificación *in vivo*¹⁰⁸.

Tabla 19. Resultados de prueba t de comparación de R_s *in vivo* e *in vitro*

Compuesto	p-value
Galaxolida	0.00024
Tonalida	0.00032
Oxibenzona	0.00239
4-MBC	0.00070
Padimato-O	0.00310
2-EHMC	0.00274
Octocrileno	0.01253

3.5. Ensayos *in vivo* de bioacumulación y eliminación

Los peces y los bivalvos son los grupos usados principalmente cuando se realizan ensayos de bioacumulación o como bioindicadores. Los bivalvos, por su naturaleza sedentaria, son representativos del grado de contaminación de su medio de origen. Sin embargo, muchas veces se prefieren los peces, debido a que son productos alimenticios importantes y al ser organismos vertebrados comparten características con los mamíferos. Para éstos últimos los mecanismos de acción de los contaminantes son poco conocidos, por lo que los peces pueden servir como modelo biológico. Para realizar los bioensayos se eligió trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*) que es recomendada por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés) por ser muy sensible a la contaminación¹³⁴. Adicionalmente la trucha tiene un bajo contenido de grasa (menor a 3%), por tanto, se facilita la extracción de los analitos¹³⁵.

Los resultados de los ensayos de bioacumulación y eliminación con trucha se presentan en la Figura 30 y la Tabla 20. En el experimento de acumulación se observó que la concentración de los analitos se incrementó considerablemente del primer al cuarto día, es decir la velocidad de acumulación fue rápida, y aunque no se logró alcanzar el equilibrio, el experimento se finalizó debido a que la salud de los peces se afectó por las propiedades irritantes de los compuestos; se observó irritación en aletas y ojos, así como abundante moco en piel y branquias. Estos síntomas se presentan en peces estresados por su manipulación y por la presencia de condiciones ambientales adversas¹³⁶. Una vez que se alcanza el equilibrio es posible calcular un factor de bioconcentración.

En este ensayo la tonalida se determinó en mayor concentración y el padimato-O en menor, este resultado se puede atribuir a que la acumulación depende de las propiedades fisicoquímicas de los compuestos y la fisiología del pez. Generalmente, los compuestos que tienen en su estructura aminas primarias, como el padimato-O, presentan poca biodisponibilidad. Por otro lado, la biodisponibilidad de los compuestos es proporcional a su solubilidad en agua, por eso los almizcles fueron los compuestos más absorbidos por el pez.

En la curva de acumulación de la oxibenzona, se observa un máximo a las 72 h (Figura 30), esto posiblemente se debe a varios factores como las características fisicoquímicas del analito, las enzimas inducibles de depuración y la variabilidad biológica¹³⁷.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

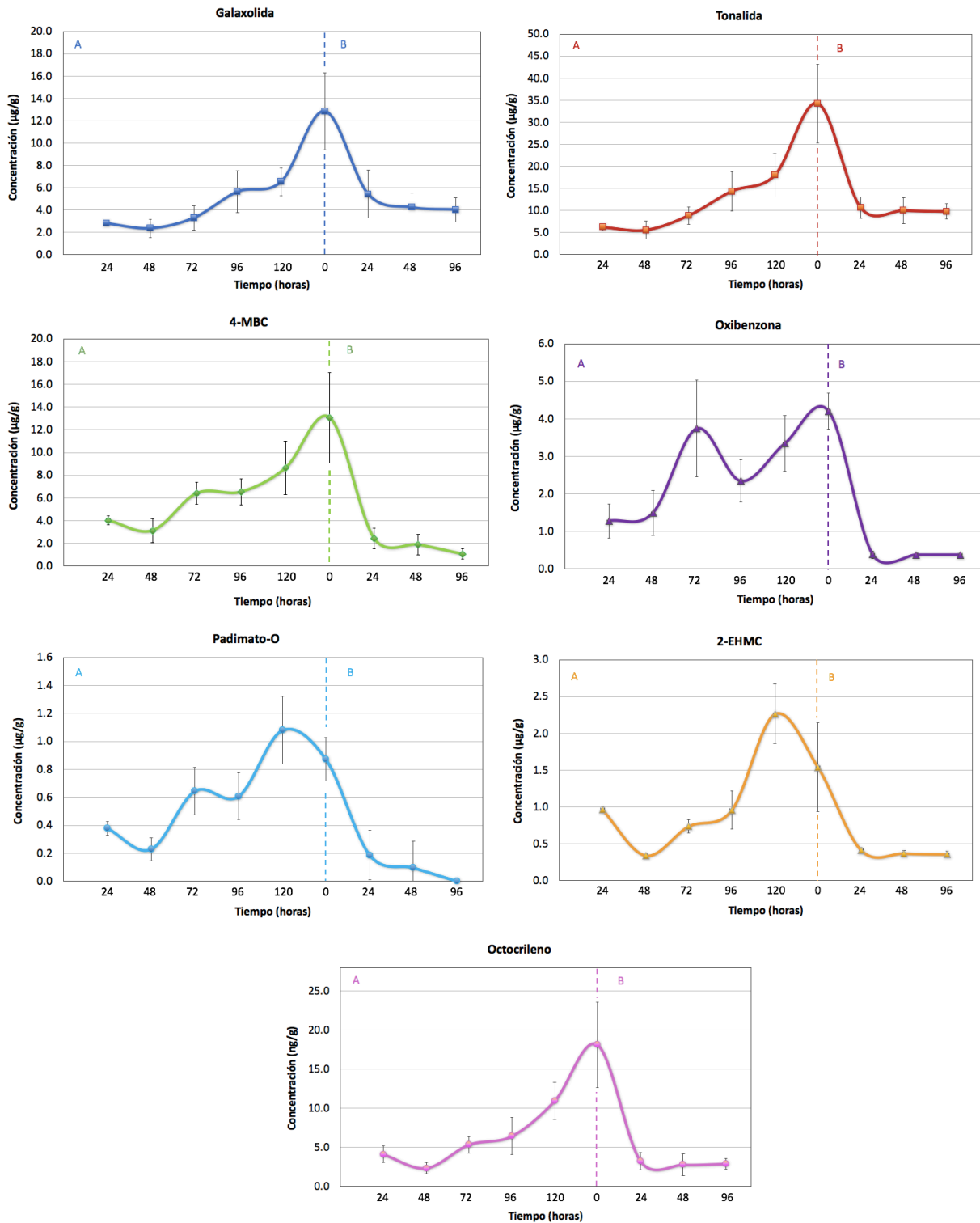


Figura 30. Resultados de la concentración de los analitos en los ensayos de (A) bioacumulación y (B) eliminación (n=3)

Cada día se analizaron tres peces diferentes seleccionados de manera aleatoria y en ese punto la desviación es más grande que en los demás tiempos muestreados. También influye el comportamiento propio de los peces, las truchas son territoriales por lo que las de mayor tamaño son dominantes, nadan por todo el acuario y permanecen tranquilas, mientras que las más pequeñas están en un estado constante de estrés porque son perseguidas y mordidas por las dominantes, lo que acelera su metabolismo y hace que absorban una mayor cantidad de los analitos.

Para la trucha la eliminación fue un proceso de dos pasos, en el primero de 0-24 h se observó una disminución significativa en la concentración de los analitos, probablemente debido a la permeabilidad a través de las branquias y la excreción, seguido de un segundo paso de estabilización de 24-96 h, en donde la disminución de la concentración fue menor. Se observó que los filtros UV y almizcles son difíciles de eliminar, ya que incluso a las 96 h todavía se detectaron residuos de la mayoría de los analitos, a excepción de padimato-O: 4-MBC $0.81 \pm 0.39 \mu\text{g/g}$, oxibenzona $0.27 \pm 0.09 \mu\text{g/g}$, 2-EHMC $0.39 \pm 0.06 \mu\text{g/g}$ y octocrileno $3.22 \pm 1.38 \mu\text{g/g}$, galaxolida $3.72 \pm 1.45 \mu\text{g/g}$ y tonalida $8.21 \pm 2.88 \mu\text{g/g}$ (Tabla 20).

Tabla 20. Concentración de los PCPs en los ensayos de acumulación y eliminación (n=3)

	Tiempo (h)	Concentración promedio (\pm DE ^a) $\mu\text{g/g}$						
		Galaxolida	Tonalida	4-MBC	Oxibenzona	Padimato-O	2-EHMC	Octocrileno
Acumulación	24	2.95 ± 0.19	6.02 ± 0.86	3.53 ± 0.34	1.06 ± 0.37	0.46 ± 0.06	1.11 ± 0.05	3.65 ± 0.96
	48	2.33 ± 1.11	5.00 ± 2.59	2.74 ± 0.90	1.35 ± 0.66	0.30 ± 0.13	0.39 ± 0.04	2.08 ± 0.64
	72	3.35 ± 1.10	8.25 ± 1.83	5.42 ± 1.14	3.10 ± 1.06	0.76 ± 0.25	0.82 ± 0.16	4.57 ± 1.23
	96	5.03 ± 2.17	11.72 ± 4.83	4.78 ± 1.28	1.94 ± 0.46	0.61 ± 0.17	0.90 ± 0.18	4.76 ± 1.92
	120	6.74 ± 1.51	16.41 ± 4.45	8.15 ± 3.15	3.14 ± 1.23	1.49 ± 0.62	2.78 ± 0.80	10.10 ± 4.63
Eliminación	0	12.24 ± 4.05	29.63 ± 10.15	10.62 ± 3.29	3.07 ± 0.89	1.12 ± 0.33	1.70 ± 0.77	14.41 ± 5.68
	24	7.69 ± 4.33	15.17 ± 9.95	3.22 ± 2.26	0.39 ± 0.15	0.91^b	0.71 ± 0.48	4.58 ± 3.48
	48	6.72 ± 4.62	14.13 ± 9.18	2.09 ± 1.09	0.30 ± 0.04	0.47^b	0.53 ± 0.22	3.51 ± 2.32
	96	3.72 ± 1.45	8.21 ± 2.88	0.81 ± 0.39	0.27 ± 0.09	ND ^c	0.39 ± 0.06	3.22 ± 1.38

^a DE: Desviación estándar

^b El padimato-O a 24 y 48 h solo fue detectado en un pez

^c ND = No detectado

3.6. Ensayos *in vivo* con tilapia

Debido a que el método de *in vivo* SPME-PPSI-GC-MS fue aplicado con éxito para trucha, se decidió aplicarlo en tilapia, un pez con características diferentes, y así estudiar la robustez del método en otra matriz. Se volvió a utilizar como técnica de calibración la velocidad de muestreo predeterminada, y para obtener la concentración total de los analitos en el músculo se tuvieron que hacer modificaciones al método de MSPD. Una vez realizada la calibración *in vivo*, la metodología se aplicó en peces provenientes de ensayos de acumulación y eliminación.

3.6.1. Modificación del método MSPD-PSSI-GC-MS para tilapia

Debido a que el contenido de grasa del músculo de trucha es mayor al de tilapia (Anexo I), fue necesario realizar algunas modificaciones a la metodología original, pues con esta el recobro de los analitos fue alrededor de 40%, a excepción de la oxibenzona para la que fueron del 10%, debido a que se retiene fuertemente probablemente por la formación de puentes de hidrógeno con el florisil. Las tres modificaciones realizadas fueron: cambio de adsorbente de dispersión por sílice C18 PAH, se omitió el uso de pre-columna y se aumentó el volumen de disolvente de elución a 5.5 mL. Con estos cambios el recobro aumentó a 80-95% para todos los analitos y aunque no se usó la precolumna se obtuvo un extracto claro con una mínima cantidad de lípidos.

3.6.2. Perfil de extracción

En el perfil de extracción se observó que el tiempo para llegar al equilibrio fue mayor a 55 min, lo que hace evidente la necesidad de un método de calibración cinético (Figura 31). Al igual que en el caso de la trucha, se seleccionó 20 min como tiempo de extracción que se encuentra en el intervalo cinético y subintervalo lineal, en donde es válida la calibración con velocidad de muestreo predeterminada.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

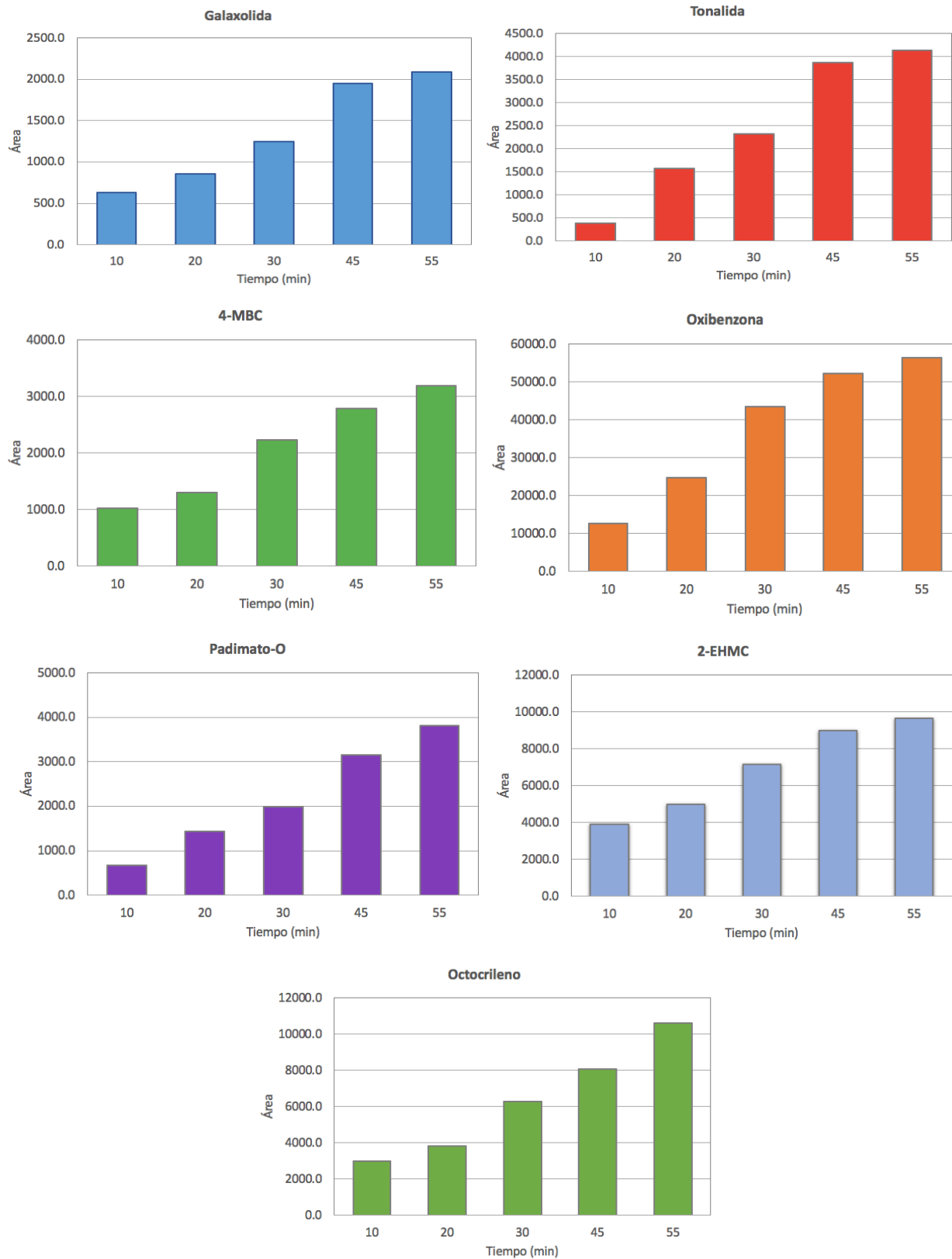


Figura 31. Perfil de extracción *in vivo* de tilapias expuestas en agua fortificada a 100 µg/L durante 5 días (n=1)

En la Figura 32 se muestran los cromatogramas obtenidos con el método de *in vivo* SPME para una tilapia control y una expuesta.

En el cromatograma de la muestra control, se tienen los mismos interferentes que con los extractos de trucha en los tiempos de retención de galaxolida, tonalida y 2-EHMC, del mismo modo tienen una señal mínima ($S/N < 6$). Lo anterior confirma que son ubicuos en el ambiente y son constantes, como se demostró con los controles usados para monitorear la contaminación en el ambiente de laboratorio en cada uno de los análisis. En el cromatograma de la tilapia expuesta también se observan muy pocos compuestos co-extraídos, lo que confirma la gran selectividad y robustez de la fibra C18, lo que facilita la preparación de muestra e indica que la metodología puede ser extrapolada a diferentes especies de peces.

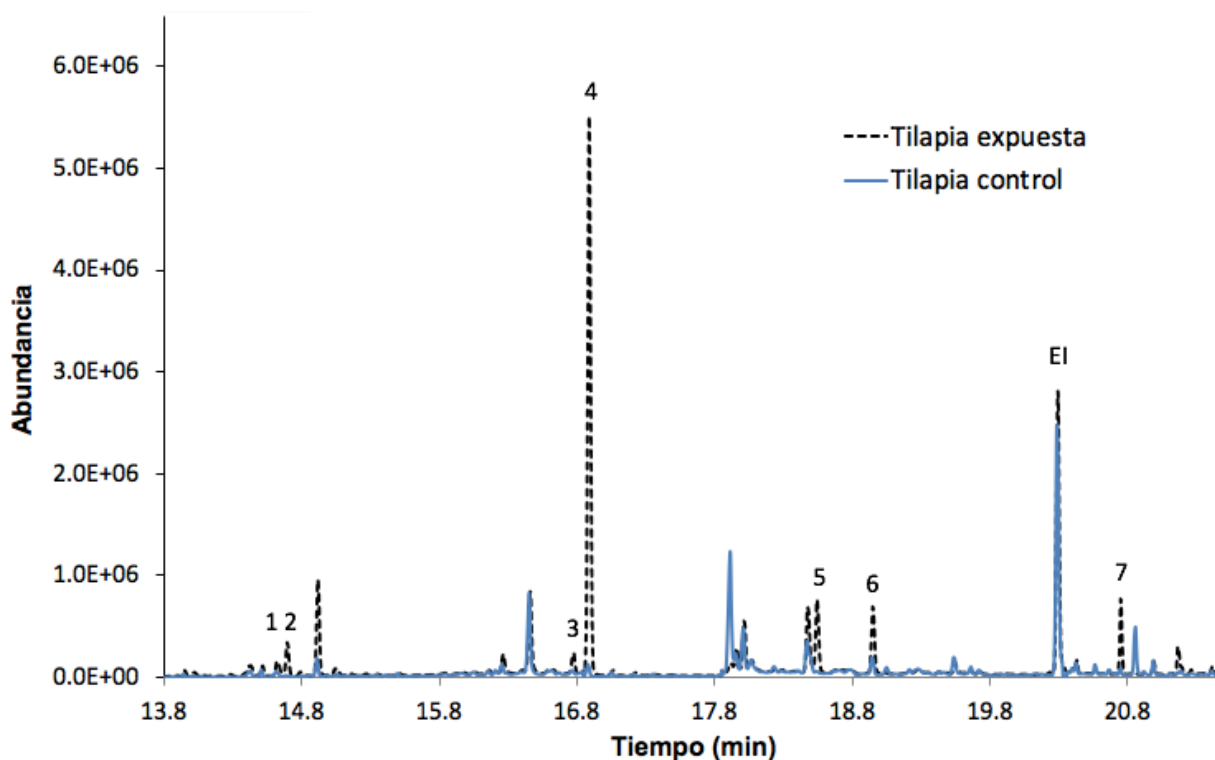


Figura 32. Cromatograma iónico (SIR) para el análisis *in vivo* SPME-PSSI-GC-MS de tilapia control y tilapia expuesta (3 días a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada analito). Condiciones cromatográficas en la sección 2.4.

Identificación: 1. Galaxolida, 2. Tonalida, 3. 4-MBC, 4. Oxibenzona-TMS, 5. Padimato-O, 6. 2-EHMC, 7. Octocrileno, EI. B[a]A.

3.6.3. Calibración *in vivo*

La calibración con el método de velocidad de muestreo predeterminada es específica para cada especie de pez, de manera que fue necesario obtener el valor de R_s *in vivo* para tilapia.

La R_s estuvo entre 0.231 y 1.570 mg/min (Tabla 21), éstos valores fueron mayores a los obtenidos con la trucha. Esto indica que para la tilapia el valor de K_{fs} es mayor que en la trucha, debido a que hay siete veces más grasa en el músculo de trucha que en el de tilapia (Anexo I). En la trucha el valor mayor de R_s *in vivo* fue para oxibenzona mientras que en la tilapia fue para el 2-EHMC, esto confirma que el valor de R_s *in vivo* es dependiente de la especie del pez. Por otro lado, al igual que en el caso de la trucha los valores de R_s para galaxolida y tonalida son diferentes, siendo aproximadamente tres veces mayor el valor para galaxolida, por lo tanto se confirma la complejidad de la calibración, que además de ser dependiente de la especie del pez, también depende de las propiedades de cada analito.

Tabla 21. Valores de R_s *in vivo* SPME-GC-MS

Compuesto	R_s (mg/min)	DER (n = 6)
Galaxolida	0.785 ± 0.295	37.6
Tonalida	0.231 ± 0.086	37.1
Oxibenzona	1.032 ± 0.338	32.8
4-MBC	0.863 ± 0.303	35.1
Padimato-O	1.057 ± 0.415	39.2
2-EHMC	1.570 ± 0.556	35.4
Octocrileno	0.670 ± 0.262	39.1

Se observó que los valores de DER para la trucha estuvieron entre 20.8 y 36.5% (Tabla 18) mientras que para la tilapia fueron de 32.8-39.2% (Tabla 21), esto se debió probablemente a que la trucha absorbió en promedio una cantidad de los analitos diez veces mayor que la tilapia, por esta razón con la tilapia la cuantificación fue a nivel de trazas y se tuvo una mayor variación.

3.6.4. Ensayos *in vivo* de bioacumulación y eliminación

Para tilapia el analito encontrado en mayor concentración fue la tonalida, de manera que concuerda con los resultados obtenidos para trucha, y se confirma la mayor biodisponibilidad de los almizcles. Sin embargo, se observó un comportamiento de acumulación diferente al de la trucha, ya que para los analitos se obtuvo un máximo de absorción entre 72 y 96 h de exposición, y después el pez empieza a eliminar los analitos del músculo, a pesar de que la concentración en el agua se mantiene constante. Lo anterior se debe a las diferencias fisiológicas entre los peces. Por un lado, la trucha es un pez oxifílico que vive en ecosistemas lóticos, en aguas con mucho movimiento, a bajas temperaturas (12-20 °C) y nada a contracorriente, esto hace que su metabolismo sea acelerado, además el tamaño de sus escamas es pequeño, por consiguiente, tiene una gran superficie de contacto con el agua y es más susceptible a los contaminantes. Por otro lado, la tilapia vive en ecosistemas lenticos, en aguas con poco movimiento, a temperaturas cálidas (25-34 °C) y nada poco, así que su metabolismo es lento, además el tamaño de sus escamas es más grande, por tanto, disminuye su área de contacto con el agua y presenta menos irritación y moco que la trucha, por esta razón es un pez más resistente. Además de esto, la bioacumulación tiene una relación directa con el contenido de grasa, y como la trucha tuvo un contenido de grasa mayor se encontraron concentraciones en $\mu\text{g/g}$ mientras que para tilapia fue a nivel de ng/g .

El proceso de eliminación de la tilapia fue similar al de la trucha, se observó una disminución significativa en la concentración de los analitos de 0-24 h, seguido de una estabilización en la concentración en el intervalo de 24-96 h. El 4-MBC y el padimato-O no se detectaron a partir de las 48 h de eliminación, mientras que después de 96 h todavía se detectaron residuos de los demás analitos: oxibenzona $48.44 \pm 16.07 \text{ ng/g}$, 2-EHMC $9.92 \pm 2.15 \text{ ng/g}$, octocrileno $23.20 \pm 0.91 \text{ ng/g}$, galaxolida $43.64 \pm 7.79 \text{ ng/g}$ y tonalida $35.45 \pm 3.37 \text{ ng/g}$, así que se confirma la dificultad para eliminar los analitos. Los resultados de los ensayos de acumulación y eliminación con tilapia se muestran en la Figura 33 y la Tabla 22.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

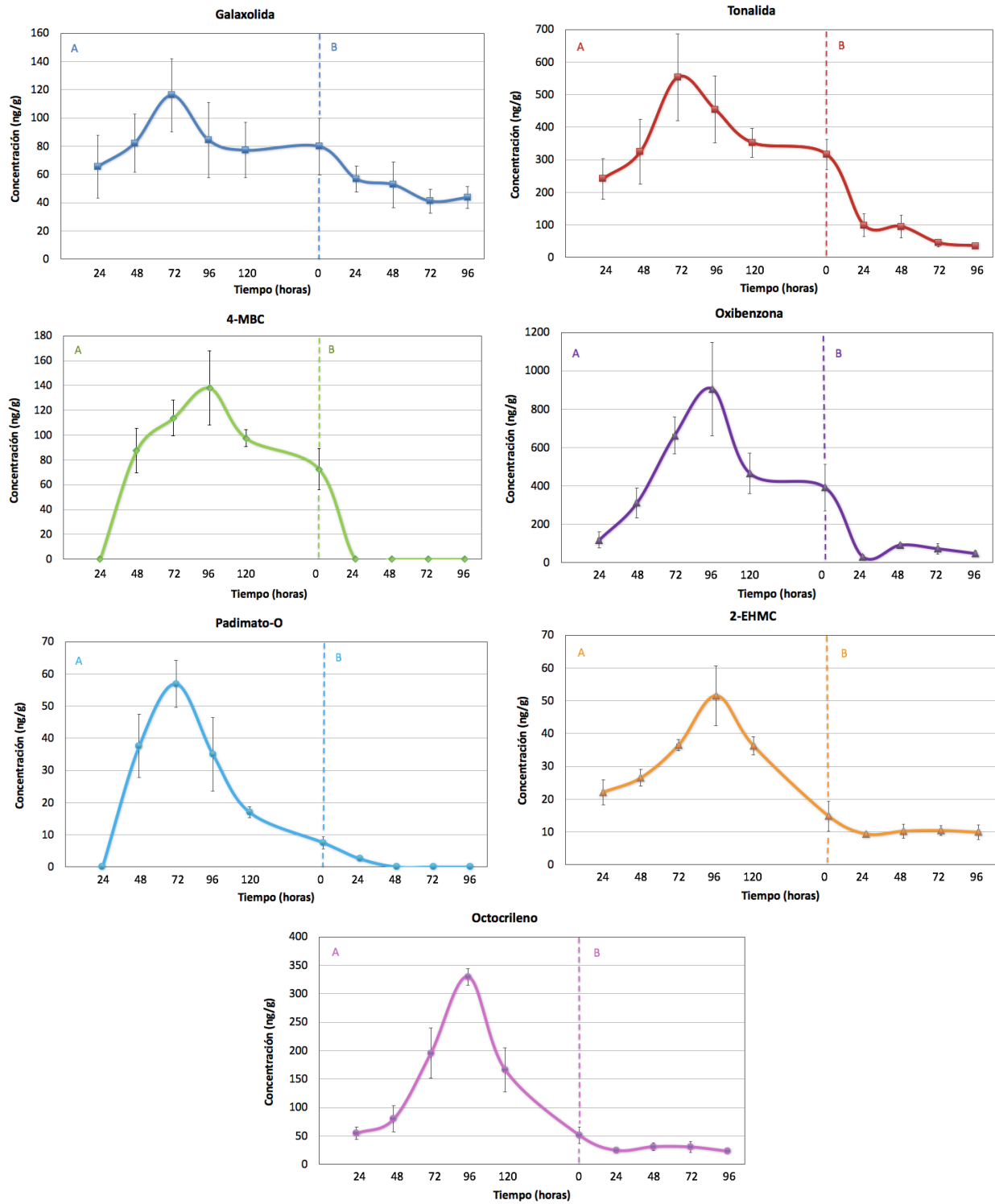


Figura 33. Resultados de la concentración de los analitos en el músculo de tilapia juvenil en los ensayos de (A) bioacumulación y (B) eliminación (n=3)

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 22. Concentración de los analitos en el ensayo de acumulación y eliminación de tilapia (n=3)

	Tiempo (h)	Concentration (ng/g)						
		Galaxolida	Tonalida	4-MBC	Oxibenzona	Padimato-O	2-EHMC	Octocrileno
Acumulación	24	65.48 ± 22.33	241.37 ± 61.85	ND	119.09 ± 40.45	ND	22.15 ± 3.79	< LC
	48	82.17 ± 20.71	324.42 ± 99.26	87.51 ± 17.88	311.63 ± 76.54	37.60 ± 9.88	26.54 ± 2.57	79.87 ± 22.90
	72	116.08 ± 25.83	552.97 ± 132.80	113.70 ± 14.34	662.85 ± 95.35	56.82 ± 7.30	36.45 ± 1.76	195.63 ± 44.36
	96	84.46 ± 26.56	454.71 ± 101.83	138.01 ± 30.01	905.37 ± 243.91	34.92 ± 11.43	51.51 ± 9.08	329.50 ± 14.57
	120	77.16 ± 19.58	352.10 ± 44.86	97.60 ± 6.92	465.56 ± 105.22	< LC	36.24 ± 2.74	166.14 ± 38.68
	168	79.78 ± 19.98	315.77 ± 46.83	72.58 ± 16.72	391.48 ± 123.07	< LC	< LC	< LC
Eliminación	0	79.78 ± 19.98	315.77 ± 46.83	72.58 ± 16.72	391.48 ± 123.07	< LC	< LC	< LC
	24	56.80 ± 9.14	98.66 ± 34.82	ND	31.84 ± 5.86	< LC	< LC	< LC
	48	52.77 ± 16.31	94.91 ± 33.94	ND	92.31 ± 10.99	ND	< LC	< LC
	72	41.11 ± 8.48	< LC	ND	73.14 ± 27.58	ND	< LC	< LC
	96	43.64 ± 7.79	< LC	ND	48.44 ± 16.07	ND	< LC	< LC

Se desarrolló y validó una metodología *in vivo* SPME-GC-MS para la identificación y cuantificación simultánea de almizcles y filtros UV en peces. Las ventajas de esta metodología sobre los métodos convencionales son su simplicidad, robustez, miniaturización y principalmente que no es necesario sacrificar a los animales. Adicionalmente se reduce el consumo de disolventes, la generación de residuos y el tiempo de preparación de muestra.

La metodología *in vivo* SPME-GC-MS se aplicó en ensayos de bioacumulación y eliminación con peces. De estos ensayos se observó que la bioacumulación depende principalmente de dos factores, el primero es la fisiología y contenido de grasa de los peces, y el segundo las propiedades fisicoquímicas de los analitos, particularmente de la solubilidad que tiene una relación directa con la bioacumulación; por esto los almizcles se acumularon en mayor concentración que los filtros UV. Los productos de cuidado personal son difíciles de eliminar para los peces, como se demostró en los ensayos de eliminación, por consiguiente, son buenos bioindicadores de contaminación cuando se realiza monitoreo ambiental.

La trucha fue un mejor organismo bioindicador que la tilapia, ya que acumula una concentración aproximadamente diez veces mayor y no libera los analitos mientras se encuentra en un medio acuático contaminado, por esto dicha especie de peces es recomendada para realizar estudios de bioacumulación.

Los resultados obtenidos demuestran la importancia del monitoreo ambiental de contaminantes emergentes en peces mediante una técnica analítica *in vivo* que es precisa, sencilla y específica, que puede ayudar a determinar su movilidad en el medio ambiente. Además, la metodología *in vivo* SPME-GC-MS podría aplicarse para la identificación de sus metabolitos. La técnica de *in vivo* SPME podría facilitar el análisis de campo, especialmente si se combina con instrumentos portátiles como el GC-MS, para ayudar a obtener una gran cantidad de información sin alterar el ecosistema muestreado.

-
- ¹ C. G. Daughton, T. A. Ternes (1999) Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change?. *Environmental Health Perspectives*. 107 (6), 907-938.
 - ² L.B. Barber (2014) Emerging Contaminants. *Comprehensive Water Quality and Purification*. Elsevier. 1, 245-266.
 - ³ M.H Dévier, P. Mazellier, S. Aït-Aïssa, H. Budzinski (2011) New challenges in environmental analytical chemistry: Identification of toxic compounds in complex mixtures. *Comptes Rendus Chimie*. 14, 766–779.
 - ⁴ D.A. Birkholz, S.M. Stilson, H.S. Elliott (2014) Analysis of Emerging Contaminants in Drinking Water – A Review. Reference module in Earth Systems and Environmental Sciences. *Comprehensive Water Quality and Purification*. 2: Assuring Purity of Drinking Water, 212–229.
 - ⁵ L.A. Barber (2014) Emerging contaminants. Reference module in Earth Systems and Environmental Sciences. *Comprehensive Water Quality and Purification*.1 (Status and Trends of Water Quality Worldwide), 245-266.
 - ⁶ A. J. Ebele, M. A. E Abdallah, S. Harrad (2017) Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants*. 3, 1-16.
 - ⁷ M. Gros, M. Petrovic, D. Barceló (2008) *The Handbook of Environmental Chemistry*. 5 (1), 37–104.
 - ⁸ P.D. Hansen (2007) Risk assessment of emerging contaminants in aquatic systems. *Trends in Analytical Chemistry* 26 (11), 1095-1099.
 - ⁹ K. Y. Bell, M. J.M. Wells, K. A. Traexler, M. L. Pellegrin, A. Morse, J. Bandy (2011) Emerging Pollutants. *Water Environment Research*. 83 (10), 1906-1984.
 - ¹⁰ D. Barceló (2003) Emerging pollutants in water analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 22 (10), 14-16.
 - ¹¹ S.D. Richardson (2009) Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry*. 81, 4645–4677.
 - ¹² D. Montes-Grajales, M. Fennix-Agudelo, W. Miranda-Castro (2017) Occurrence of personal care products as emerging chemicals of concern in water resources: A review. *Science of the Total Environment*. 595, 601–614.
 - ¹³ R. J. Witorsch, J. A. Thomas (2010) Personal care products and endocrine disruption: A critical review of the literature. *Critical Reviews in Toxicology*. 40 (3), 1–30.
 - ¹⁴ K. Kümmerer (2011) Emerging contaminants. *Treatise on Water Science*. 3: Aquatic Chemistry and Biology, 69-83.
 - ¹⁵ N.T. Litz, J. Müller, W. Böhmer (2007) Occurrence of Polycyclic Musks in Sewage Sludge and their Behaviour in Soils and Plants. *Journal of Soils and Sediments*. 7, 36-44.

-
- ¹⁶ H.G. Geyer, G.G. Rimkus, I. Scheunert, A. Kaune, K. Schramm, A. Kettrup, M. Zeeman, D.C.G. Muir, L.G. Hansen, D. Mackay (2000) Bioaccumulation and occurrence of endocrine disrupting chemicals (EDCs), persistent organic pollutants (POPs), and other organic compounds in fish and other organisms including humans. In: *The Handbook of Environmental Chemistry, Volume 2, Part J*, 1-166.
- ¹⁷ European commission. Opinion on 4-Methylbenzylidene Camphor COLIPA N° S60. 2006. https://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_075.pdf. Accessed 08 Feb 2019.
- ¹⁸ N. Negreira, I. Rodríguez, R. Rodil, E. Rubí, R. Cela (2013) Optimization of matrix solid-phase dispersion conditions for UV filters determination in biota samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 93, 1174–1188.
- ¹⁹ American Chemical Society. Oxybenzone. 2018. <https://www.acs.org/content/acs/en/molecule-of-the-week/archive/o/oxybenzone.html>. Accessed 08 Feb 2019.
- ²⁰ A. Gackowska, W. Studziński, E. Kudlek, M. Dudziak, J. Gaca (2018) Estimation of physicochemical properties of 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate (EHMC) degradation products and their toxicological evaluation. *Environmental Science and Pollution Research*. 25, 16037-16049.
- ²¹ Brooke DN, Burns JS, Crookes MJ. UV-filters in cosmetics – prioritisation for environmental assessment. Environment Agency. 2008. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/291007/scho1008bpay-e-e.pdf. Accessed 08 Feb 2019.
- ²² G. G. Rimkus. (2004) Synthetic musk fragrances in the environment. *The Handbook of Environmental Chemistry. Volume 3X*, 1–16.
- ²³ M. Eh (2004) New alicyclic musks: the fourth generation of musks odorants. *Chemistry and biodiversity*. 1, 1975-1984.
- ²⁴ D.R. Dietrich, B.C. Hitzfeld (2004) Bioaccumulation and ecotoxicity of synthetic musks in the aquatic environment. *The Handbook of Environmental Chemistry, Volume 3X*, 233-244.
- ²⁵ B. Van der Burg, R. Schreurs, S. Van der Linden, W. Seinen, A. Brouwer, E. Sonneveld, (2008) Endocrine effects of polycyclic musks: do we smell a rat?. *International Journal of Andrology* 31, 188-193.
- ²⁶ H. Vera, J. A. Silva, N. Ratola, L. Santos, A. Alves (2015) Long lasting perfume - A review of synthetic musks in WWTPs. *Journal of Environmental Management*. 149, 168-192.
- ²⁷ M. S. Díaz-Cruz, D. Barceló (2009) Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV-absorbing compounds in aquatic ecosystems. *Trends in Analytical Chemistry*. 28 (6) , 708-717.
- ²⁸ P. Gago-Ferrero, M. S. Díaz-Cruz, D. Barceló (2012) An overview of UV-absorbing compounds (organic UV filters) in aquatic biota. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 404, 2597–2610.

-
- ²⁹ N. J. Lowe, N. A. Shaath, M. A. Pathak (1997) *Sunscreens: Development: Evaluation, and Regulatory Aspects: Second Edition*, Marcel Dekker Inc, New York, USA.
- ³⁰ J. M. Brausch, G. M. Rand (2011) A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere*. 82, 1518–1532.
- ³¹ K. Borgå (2008) *Ecotoxicology: Bioaccumulation*. Encyclopedia of Ecology. Elsevier. 346-348.
- ³² X. Zhang, Q. Xu, S. Man, X. Zeng, Y. Yu, Y. Pang, G. Sheng, J. Fu (2013) Tissue concentrations, bioaccumulation, and biomagnification of synthetic musks in freshwater fish from Taihu Lake, China. *Environmental Science and Pollution Research. Int.* 20, 311–322.
- ³³ M. Núñez, F. Borrull, E. Pocurull, N. Fontanals (2017) Sample treatment for the determination of emerging organic contaminants in aquatic organisms. *Trends in Analytical Chemistry*. 97, 136-145.
- ³⁴ S. Mitra (2003) *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. Volume 162, John Wiley & Sons, New Jersey, USA.
- ³⁵ P. Gago-Ferrero, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló (2013) Multi-residue method for trace level determination of UV filters in fish based on pressurized liquid extraction and liquid chromatography quadrupole- linear ion trap-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1286, 93–101.
- ³⁶ P. Gago-Ferrero, M. Silvia Díaz-Cruz, D. Barceló (2015) UV filters bioaccumulation in fish from Iberian river basins. *Science of the Total Environment*. 518–519, 518–525.
- ³⁷ M. E. Balmer, B. Hans-Rudolf, M. D. Müller, T. Poiger (2005) Occurrence of Some Organic UV Filters in Wastewater, in Surface Waters, and in Fish from Swiss Lakes. *Environmental Science and Technology*. 39, 953-962.
- ³⁸ M. Meinerling, M. Daniels (2006) A validated method for the determination of traces of UV filters in fish using LC–MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 386, 1465–1473.
- ³⁹ B. Hans-Rudolf, M. E. Balmer, P. Schmid, M. Kohler (2006) Occurrence of UV filters 4-methylbenzylidene camphor and octocrylene in fish from various swiss rivers with inputs from wastewater treatment plants. *Environmental Science and Technology*. 40, 1427-1431.
- ⁴⁰ A. Zenker, H. Schmutz, K. Fent (2008) Simultaneous trace determination of nine organic UV-absorbing compounds (UV filters) in environmental samples. *Journal of Chromatography A*. 1202, 64–74.
- ⁴¹ M. Bachelot, Z. Li, D. Munaron, P. Le Gall, C. Casellas, H. Fenet, E. Gomez (2012) Organic UV filter concentrations in marine mussels from French coastal regions. *Science of the Total Environment*. 420, 273–279.
- ⁴² M. A. Mottaleb, S. Usenko, J. G. O'Donnell, A. J. Ramirez, B. W. Brooks, C. K. Chambliss. 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, 815–823.
- ⁴³ S.C Cunha, J.O. Fernandes, L. Vallecillos, G. Cano-Sancho, J.L. Domingo, E. Pocurull, F. Borrull, A.L. Maulvault, F. Ferrari, M. Fernandez-Tejedor, F. Van den Heuvel, M. Kotterman (2015) Co-occurrence of musk fragrances and UV-filters in seafood and macroalgae collected in European hotspots. *Environ. Res.* 143, 65–71.
- ⁴⁴ P. Gago-Ferrero, M.B. Alonso, C.P. Bertozzi, J. Marigo, L. Barbosa, M. Cremer, E.R. Secchi, A. Azevedo, J. Lailson-Brito Jr., J.P.M. Torres, O. Malm, E. Eljarrat, M.S. Díaz-Cruz, D. Barceló (2013) First determination of UV filters in marine mammals. Octocrylene levels in franciscana dolphins. *Environmental Science and Technology*. 47, 5619–5625.
- ⁴⁵ L. Duedahl-Olesen, T. Cederberg, K. H. Pedersen, A. Højgård (2005) Synthetic musk fragrances in trout from Danish fish farms and human milk. *Chemosphere*. 61, 422–431.
- ⁴⁶ M. Hyo-Bang, A. Yong-Rock, J. P Kyum, C. Seok-Gwan, M. Dae-Yeon, C. Minkyu, C. Hee-Gu (2011) Occurrence and accumulation features of polycyclic aromatic hydrocarbons and synthetic musk compounds in finless porpoises (*Neophocaena phocaenoides*) from Korean coastal waters. *Marine Pollution Bulletin*. 62, 1963–1968.
- ⁴⁷ K. Kannan, J. L. Reiner, S. H. Yun, E. E. Perrotta, L. Tao, B. Johnson-Restrepo, B. D. Rodan (2005) Polycyclic musk compounds in higher trophic level aquatic organisms and humans from the United States. *Chemosphere*. 61, 693–700.
- ⁴⁸ H. Nakata (2005) Occurrence of Synthetic Musk Fragrances in Marine Mammals and Sharks from Japanese Coastal Waters. *Environmental Science and Technology*. 39, 3430-3434.
- ⁴⁹ K. Bester (2009) Analysis of musk fragrances in environmental samples. *Journal of Chromatography A*. 1216, 470–480.
- ⁵⁰ J. Pawliszyn, F. M. Musteata, M. L. Musteata (2015) Biocompatible solid-phase microextraction coatings and methods for their preparation. United States patent application publication, , Pub. No. US 2015/0011376 A.
- ⁵¹ K. Ridgway, S.P. Lalljie, R.M. Smith (2007) Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A*. 1153, 36–53.
- ⁵² A. Listrat, B. Lebret, I. Louveau, T. Astruc, M. Bonnet, L. Lefaucheur, B. Picard, J. Bugeon (2016) How Muscle Structure and Composition Influence Meat and Flesh Quality. *The Scientific World Journal*. ID 3182746, 14.
- ⁵³ C.L. Arthur, J. Pawliszyn (1990) Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*. 62, 2145-2148.

- ⁵⁴ A. L. Venquiaruti-Escarrone, S. Souza-Caldas, B. Meira-Soares, S. Eslava-Martins, E. G. Primel, L. E. Maia-Nery (2014) A vortex-assisted MSPD method for triclosan extraction from fish tissues with determination by LC-MS/MS. *Analytical Methods*. 6, 8306-8313.
- ⁵⁵ T. Dung-Ying, C. Chien-Liang, D. Wang-Hsien (2014) Optimization of matrix solid-phase dispersion for the rapid determination of salicylate and benzophenone-type UV absorbing substances in marketed fish. *Food chemistry*. 154, 211-216.
- ⁵⁶ G. Chen, R. Jiang, J. Qiu, S. Cai, F. Zhu, G. Ouyang (2015) Environmental fates of synthetic musks in animal and plant: an in vivo study. *Chemosphere* 138, 584–591.
- ⁵⁷ S.A. Barker (2000) Matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A*. 885, 115-127.
- ⁵⁸ S.A. Barker (2007) Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 70, 151–162.
- ⁵⁹ M. García López, P. Canosa, I. Rodríguez (2008). Trends and recent applications of matrix solid phase dispersion. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 391, 963-974.
- ⁶⁰ X. Tu, W. Chen (2018) A Review on the Recent Progress in Matrix Solid Phase Dispersion. *Molecules*. 23 (2767), 1-13.
- ⁶¹ J. J. M. Rosenfeld. *Sample Preparation for Hyphenated Analytical Techniques*. 2004, CRC press, Oxford, Reino Unido, primera edición.
- ⁶² A. Alves-Vieira, S. Souza-Caldas, L. Kupski, R. A. Tavella, E. G. Primel (2018) Extraction of chlorothalonil, dichlofluanid, DCOIT, and TCMTB from fish tissues employing the vortex assisted matrix solid-phase dispersion. *Microchemical Journal*. 143, 92–98.
- ⁶³ A. A. Vieira, S. S. Caldas, A. L. Venquiaruti Escarrone, J. L. de Oliveira-Arias, E. G. Primel (2018) Environmentally friendly procedure based on VA-MSPD for the determination of booster biocides in fish tissue. *Food Chemistry*. 242, 475–480.
- ⁶⁴ T. Wang, Y. Chen, J. Ma, Z. Jin, M. Chai, X. Xiao, L. Zhang, Y. Zhang (2018) A polyethyleneimine-modified attapulgite as a novel solid support in matrix solid-phase dispersion for the extraction of cadmium traces in seafood products. *Talanta*. 180, 254–259.
- ⁶⁵ T. Rejczak, T. Tuzimski (2017) Application of High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector for Simultaneous Determination of 11 Synthetic Dyes in Selected Beverages and Foodstuffs. *Food Analytical Methods*. 10, 3572–3588.
- ⁶⁶ W. Li, D. Liu, J. Li, J. Gao, C. Zhang, P. Wang, Z. Zhou (2017) Matrix Solid-Phase Dispersion Combined with GC-MS/MS for the Determination of Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in Marketed Seafood. *Chromatographia*. 80, 813–824.

-
- ⁶⁷ Q. Chen, Y. Lin, Y. Tian, L. Wu, L. Yang, X. Hou, C. Zheng (2017) Single-Drop Solution Electrode Discharge-Induced Cold Vapor Generation Coupling to Matrix Solid-Phase Dispersion: A Robust Approach for Sensitive Quantification of Total Mercury Distribution in Fish. *Analytical Chemistry*. 89, 2093–2100.
- ⁶⁸ Q. Shen, R. Jin, J. Xue, Y. Lu, Z. Dai (2016) Analysis of trace levels of sulfonamides in fish tissue using micro-scale pipette tip-matrix solid-phase dispersion and fast liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*. 194, 508–515.
- ⁶⁹ Y. Wang, L. Chen (2015) Analysis of malachite green in aquatic products by carbon nanotube-based molecularly imprinted – matrix solid phase dispersión. *Journal of Chromatography B*. 1002, 98–106.
- ⁷⁰ G. I. Hertzog, K. L. Soares, S. S. Caldas, E. G. Primel (2015) Study of vortex-assisted MSPD and LC-MS/MS using alternative solid supports for pharmaceutical extraction from marketed fish. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 407, 4793–4803.
- ⁷¹ P. Xiao-Dong, W. Ping-Gu, J. Wei, M. Bin-jie (2015) Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol in fish muscle by matrix solid-phase dispersion extraction (MSPD) and ultra-high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Control*. 52, 34-38.
- ⁷² M.C. Cela-Pérez, L. Barbosa-Pereira, X. Vecino, M. Pérez-Ameneiro, A. Lasagabaster-Latorre, J.M. López-Vilariño, M.V. González-Rodríguez, A.B. Moldes, J.M. Cruz (2015) Selective removal of ATP degradation products from food matrices II: Rapid screening of hypoxanthine and inosine by molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion for evaluation of fish freshness. *Talanta*. 135, 58–66.
- ⁷³ H. Ziarrusta, M. Olivares, A. Delgado, O. Posada-Ureta, O. Zuloaga, N. Etxebarria (2015) Multiscreening determination of organic pollutants in molluscs using matrix solid phase dispersion. *Journal of chromatography A*. 139,1 18-30.
- ⁷⁴ C.L. Chen, T. D.Y. Tsai, W.H. Ding (2014) Optimisation of matrix solid-phase dispersion for the determination of Dechlorane compounds in marketed fish. *Food Chemistry*. 164, 286–292.
- ⁷⁵ X. Sun, J. Wang, Y. Li, J. Yang, J. Jin, S. M. Shah, J. Chen (2014) Novel dummy molecularly imprinted polymers for matrix solid-phase dispersion extraction of eight fluoroquinolones from fish samples. *Journal of Chromatography A*. 1359, 1–7.
- ⁷⁶ Y. Tao, F. Zhu, D. Chen, H. Wei, Y. Pan, X. Wang, Z. Liu, L. Huang, Y. Wang, Z (2014) Yuan. Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction for multi-fenicol's determination in shrimp and fish by liquid chromatography–electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Food chemistry*. 150, 500-506.

-
- ⁷⁷ G. M. Olson, B. M. Meyer, R. J. Portier (2014) Adaptation of Sonication-Assisted Matrix Solid Phase Dispersion of Tissues for the Subsequent Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Gulf Menhaden (*Brevoortia patronus*). *Biochemistry Research International*. ID 925684, 1-7.
- ⁷⁸ D. G. Hela, V. D. Papadopoulos (2013) Estimating uncertainty in matrix solid phase extraction methodology for the determination of chlorinated compounds in fish, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 93 (15), 1676-1697.
- ⁷⁹ M. P. García De Llasera, L. Cruz-Reyes, L. E. Vera-Avila (2009) A method for the analysis of organophosphorus pesticide residues in Mexican axolotl, *Journal of Environmental Science and Health Part B*. 45 (1), 25-32.
- ⁸⁰ J. Pawliszyn (2012) *Handbook of solid phase microextraction*. First edition. Elsevier, Massachusetts, USA.
- ⁸¹ G. Ashwini-Kumar, M. Ashok- Kumar, M. Frank-Michael (2009) Analysis of biological samples using solid-phase microextraction. *Bioanalytical Reviews*. 1, 35–55.
- ⁸² F.M. Musteata, J. Pawliszyn (2007) Review In vivo sampling with solid phase microextraction *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 70, 181–193.
- ⁸³ T. Górecki, J. Pawliszyn (1997) Effect of sample volume on quantitative analysis by solid-phase microextraction. Part 1. Theoretical considerations. *Analyst*. 122, 1079-1086.
- ⁸⁴ H.L. Lord, R.P. Grant, M. Walles, B. Incedon, B. Fahie, J. Pawliszyn (2003) Development and evaluation of a solid-phase microextraction probe for in vivo pharmacokinetic studies. *Analytical Chemistry*. 75, 5103-5115.
- ⁸⁵ A. Es-haghi, X. Zhang, F.M. Musteata, H. Bagheri, J. Pawliszyn (2007) Evaluation of bio-compatible poly(ethylene glycol)-based solid-phase microextraction fiber for in vivo pharmacokinetic studies of diazepam in dogs. *Analyst*. 132, 672–678.
- ⁸⁶ J. Revuelto-Rey, J.J. Egea-Guerrero, M.A. Muñoz-Sánchez, F. Murillo-Cabezas (2012) La microdiálisis cerebral en el ámbito clínico actual. *Medicina Intensiva*. 36 (3), 213-219.
- ⁸⁷ F. M. Musteata, M. L. Musteata, J. Pawliszyn (2006) Fast In Vivo Microextraction: A New Tool for Clinical Analysis. *Clinical Chemistry*. 52 (4), 708–715.
- ⁸⁸ G. Ouyang, D. Vuckovic, J. Pawliszyn (2011) Nondestructive sampling of living systems using in vivo solid-phase microextraction. *Chemical Reviews*. 111, 2784–2814.
- ⁸⁹ <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/reporter-us/bioanalysis-with-spme.html>. Consultada en abril 2018.
- ⁹⁰ M. L. Musteata, F. M. Musteata, J. Pawliszyn (2007) Biocompatible Solid-Phase Microextraction Coatings Based on Polyacrylonitrile and Solid-Phase Extraction Phases. *Analytical Chemistry*. 79, 6903-6911.

-
- ⁹¹ H. L. Lord, R. P. Grant, M. Walles, B. Incedon, B. Fahie, J. Pawliszyn (2003) Development and Evaluation of a Solid-Phase Microextraction Probe for in Vivo Pharmacokinetic Studies. *Analytical Chemistry*. 75, 5103-5115.
- ⁹² X. Zhang, A. Es-haghi, F. M. Musteata, G. Ouyang, J. Pawliszyn (2007) Quantitative in Vivo Microsampling for Pharmacokinetic Studies Based on an Integrated Solid-Phase Microextraction System. *Analytical Chemistry*. 79, 4507-4513.
- ⁹³ F. M. Musteata, I. de Lannoy, B. Gien, J. Pawliszyn (2008) Blood sampling without blood draws for in vivo pharmacokinetic studies in rats. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 47, 907–912.
- ⁹⁴ D. Vuckovic, I. de Lannoy, B. Gien, Y. Yang, F. M. Musteata, R. Shirey, L. Sidisky, J. Pawliszyn (2011) In vivo solid-phase microextraction for single rodent pharmacokinetics studies of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in mice. *Journal of Chromatography A*. 1218, 3367–3375.
- ⁹⁵ S.N. Zhou, K.D. Oakes, M.R. Servos, J. Pawliszyn (2008) Application of solid-phase microextraction for in vivo laboratory and field sampling of pharmaceuticals in fish. *Environmental Science and Technology*. 42, 6073–6079.
- ⁹⁶ X. Zhang, K.D. Oakes, M.E. Hoque, D. Luong, S. Taheri-Nia, C. Lee, B.M. Smith, C.D. Metcalfe, S. de Solla, M.E. Servos (2012) Depth-profiling of environmental pharmaceuticals in biological tissue by solid-phase microextraction, *Analytical Chemistry*. 84, 6956–6962.
- ⁹⁷ O.P. Togunde, H. Lord, K.D. Oakes, M.R. Servos, J. Pawliszyn (2013) Development and evaluation of a new in vivo solid-phase microextraction sampler, *Journal of Separation Science*. 36, 219–223.
- ⁹⁸ X. Zhang, K.D. Oakes, M.E. Hoque, D. Luong, C.D. Metcalfe, J. Pawliszyn, M.R. Servos (2011) Pre-equilibrium solid-phase microextraction of free analyte in complex samples: correction for mass transfer variation from protein binding and matrix tortuosity, *Analytical Chemistry* 83, 3365–3370.
- ⁹⁹ G. Ouyang, K.D. Oakes, L. Bragg, S. Wang, H. Liu, S. Cui, M.R. Servos, D.G. Dixon, J. Pawliszyn (2011) Sampling-rate calibration for rapid and nonlethal monitoring of organic contaminants in fish muscle by solid-phase microextraction, *Environmental Science and Technology*. 45, 7792–7798.
- ¹⁰⁰ S. Wang, K.D. Oakes, L.M. Bragg, J. Pawliszyn, G. Dixon, M.R. Servos (2011) Validation and use of in vivo solid phase micro-extraction (SPME) for the detection of emerging contaminants in fish. *Chemosphere*. 85, 1472–1480.
- ¹⁰¹ X. Zhang, K.D. Oakes, S. Cui, L. Bragg, M.R. Servos, J. Pawliszyn (2010) Tissue-specific in vivo bioconcentration of pharmaceuticals in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using space-resolved solid-phase microextraction. *Environmental Science and Technology*, 44, 3417–3422.
- ¹⁰² J. Xu, S. Huang, R.Wu, R. Jiang, F. Zhu, J.Wang, G. Ouyang (2015) Bioinspired polydopamine sheathed

-
- nanofibers for high-efficient in vivo solid-phase microextraction of pharmaceuticals in fish muscle. *Analytical Chemistry*. 87, 3453–3459.
- ¹⁰³ J. Xu, R. Wu, S. Huang, M. Yang, Y. Liu, Y. Liu, R. Jiang, F. Zhu, G. Ouyang (2015) Polyelectrolyte microcapsules dispersed in silicone rubber for in vivo sampling in fish brains. *Analytical Chemistry*. 87, 10593–10599.
- ¹⁰⁴ J. Qiu, G. Chen, S. Liu, T. Zhang, J. Wu, F. Wang, J. Xu, Y. Liu, F. Zhu, G. Ouyang (2016) Bioinspired polyelectrolyte-assembled graphene-oxide-coated C18 composite solid-phase microextraction fibers for in vivo monitoring of acidic pharmaceuticals in fish. *Analytical Chemistry*. 88, 5841–5848.
- ¹⁰⁵ J. Qiu, G. Chen, F. Zhu, G. Ouyang (2016) Sulfonated nanoparticles doped electrospun fibers with bioinspired polynorepinephrine sheath for in vivo solid-phase microextraction of pharmaceuticals in fish and vegetable. *Journal of Chromatography A*, 1455, 20–27.
- ¹⁰⁶ J. Qiu, F. Wang, T. Zhang, L. Chen, Y. Liu, F. Zhu, G. Ouyang (2018) Novel Electrosorption-enhanced solid-phase microextraction device for ultrafast in vivo sampling of ionized pharmaceuticals in fish. *Environmental Science and Technology*. 52, 145–151.
- ¹⁰⁷ S. Huang, J. Xu, J. Wu, H. Hong, G. Chen, R. Jiang, F. Zhu, Y. Liu, G. Ouyang (2017) Rapid detection of five anesthetics in tilapias by in vivo solid phase microextraction coupling with gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*. 168, 263–268.
- ¹⁰⁸ Z. Bai, A. Pilote, P.K. Sarker, G. Vandenberg, J. Pawliszyn (2013) In vivo solid-phase microextraction with in vitro calibration: determination of off-flavor components in live fish. *Analytical Chemistry*, 85, 2328–2332.
- ¹⁰⁹ J. Xu, J. Luo, J. Ruan, F. Zhu, T. Luan, H. Liu, R. Jiang, G. Ouyang (2014) In vivo tracing uptake and elimination of organic pesticides in fish muscle. *Environmental Science and Technology*. 48, 8012–8020.
- ¹¹⁰ M. Adolfsson-Erici, G. .kerman, M.S. McLachlan (2012) In-vivo passive sampling to measure elimination kinetics in bioaccumulation tests. *Chemosphere*. 88, 62–68.
- ¹¹¹ I.J. Allan, K. B.k, T.O. Haugen, K.L. Hawley, A.S. H.gfeldt, A.D. Lillicrap (2013) In vivo passive sampling of nonpolar contaminants in brown trout (*Salmo trutta*). *Environmental Science and Technology*. 47, 11660–11667.
- ¹¹² L. Chen, J. Qiu, Y. Tang, J. Xu, S. Huang, Y. Liu, G. Ouyang (2017) Rapid in vivo determination of tetrodotoxin in pufferfish (*Fugu*) muscle by solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Talanta*. 171, 179–184.
- ¹¹³ G. Ouyang, J. Pawliszyn (2006) Recent developments in SPME for on-site analysis and monitoring. *Trends in Analytical Chemistry*. 25 (7), 692-703.

- ¹¹⁴ G. Ouyang, D. Vuckovic, J. Pawliszyn (2011) Nondestructive sampling of living systems using *in vivo* solid-phase microextraction. *Chemical Reviews*. 111, 2784–2814.
- ¹¹⁵ X. Zhang, K.D. Oakes, S. Wang, S. Cui, J. Pawliszyn, C.D. Metcalfe, M.R. Servos (2012) *In vivo* sampling of environmental organic contaminants in fish by solid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*. 32, 31-39.
- ¹¹⁶ A. Gerhardt (2002) Bioindicator species and their use in biomonitoring. In: environmental monitoring. *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*, Eolss Publishers, Oxford, pp 77–123.
- ¹¹⁷ A. Chovanec, R. Hofer, F. Schiemer (2003) Fish as bioindicators. Trace metals and other contaminants in the environment. 6, 639-676.
- ¹¹⁸ J. D. Grabarkiewicz, W. S. Davis (2008) *An Introduction to Freshwater Fishes as Biological Indicators*. United States Environmental Protection Agency (EPA).
- ¹¹⁹ http://pesca.siap.gob.mx/produccion/rep_mensual_esp_opc_gobmx.php?tipo=0&anioRep=2017&entidadF_ed=90.pdf. Consultado en marzo 2019.
- ¹²⁰ https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/308084/02trucha_arcoiris.pdf. Consultado en marzo 2019.
- ¹²¹ <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/308111/02tilapia.pdf>. Consultado en marzo 2019.
- ¹²² A. M. Peck (2006) Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices. *Anal Bioanalytical Chemistry*. 386, 907–939.
- ¹²³ H.G.J. Mol, H. Janssen, C.A. Cramers, U.A.T. Brinkman (1996) Large-volume injection in gas chromatographic trace analysis using temperature-programmable (PTV) injectors. *Trends in Analytical Chemistry*. 15, 206-214.
- ¹²⁴ J. Drozd. (1981) Chemical derivatization in gas chromatography. *Journal of chromatography library*. 19, 1-7.
- ¹²⁵ N. Negreira, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela (2009) Determination of selected UV filters in indoor dust by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216 5895–5902.
- ¹²⁶ E. Villaverde-de-Sáa, J. B. Quintana, R. Rodil, R. Ferrero-Refojos, E. Rubí, R. Cela. (2012) Determination of perfluorinated compounds in mollusks by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 402, 509–518.
- ¹²⁷ X. Zhang, K. D.Oakes, S. Wang, S. Cui, J. Pawliszyn, C. D. Metcalfe, M. R. Servos. (2012) *In vivo* sampling of environmental organic contaminants in fish by solid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*. 32, 31-39.

-
- ¹²⁸ Z. Bai, A. Pilote, P.K. Sarker, G. Vandenberg, J. Pawliszyn (2013) *In vivo* solid-phase microextraction with *in vitro* calibration: determination of off-flavor components in live fish. *Analytical Chemistry*. 85, 2328–2332.
- ¹²⁹ G. Chen, R. Jiang, J. Qiu, S. Cai, F. Zhu, G. Ouyang (2015) Environmental fates of synthetic musks in animal and plant: an *in vivo* study. *Chemosphere* 138, 584–591.
- ¹³⁰ K. Akutsu, M. Yoshimitsu, Y. Kitagawa, S. Takatori, N. Fukui, M. Osakada, S. Yamaguchi, K. Kajimura, H. Obana, T. Watanabe. (2017) Evaluation of the matrix-like effect in multiresidue pesticide analysis by gas chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. 40, 1293–1300.
- ¹³¹ C. F. Poole (2007) Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1158, 241–250.
- ¹³² United Nations Office on Drugs and Crime (2009) Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens. United Nations, New York.
- ¹³³ M. S. Díaz-Cruz, D. Barcelo (2015) Personal Care Products in the Aquatic Environment, *Handbook of Environmental Chemistry*, 36, 107-108, 275-276.
- ¹³⁴ http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/wet/disk2_index.cfm. Consultada en abril de 2018.
- ¹³⁵ V. Danijela, D. Jasna, S. Aurelija (2011) Rainbow trout (*Oncorhynchus Mykiss*) from aquaculture – meat quality and importance in the diet. *Tehnologija mesa*. 52 (1), 122–133.
- ¹³⁶ K.L. Shepard (1994) Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 4, 401-429.
- ¹³⁷ O. P. Togunde, K. D. Oakes, M. R. Servos, J. Pawliszyn (2012) Optimization of solid phase microextraction for non-lethal *in vivo* determination of selected pharmaceuticals in fish muscle using liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1261, 99-106.

ANEXO I

DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRASA EN MUESTRAS DE MÚSCULO DE PESCADO

El contenido de grasa y el de humedad de las muestras de músculo de pescado se obtuvo gravimétricamente. El contenido de humedad se calculó con el peso inicial y el peso perdido después de la liofilización del músculo. Para el contenido de grasa se realizó una extracción Soxhlet con 1 g de muestra de músculo liofilizado, como disolvente se usaron 55 mL de una disolución diclorometano-hexano (1:1) y el tiempo de extracción fue de 16 horas. El análisis se realizó por triplicado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Contenido de grasa y porcentaje de humedad en muestras de músculo de trucha y tilapia (referidos a músculo fresco)

No.	Trucha		Tilapia	
	% Grasa	% Humedad	% Grasa	% Humedad
1	2.31	73.47	0.31	83.28
2	2.43	73.71	0.31	83.11
3	2.02	73.66	0.29	83.29
Promedio	2.25	73.61	0.30	83.23
DE	0.21	0.13	0.01	0.10
DER	9.35	0.17	3.81	0.12

DE: Desviación estándar, DER: desviación estándar relativa

ANEXO II

CUANTIFICACIÓN DE ALMIZCLES Y FILTROS UV EN AGUA

Para verificar que la concentración de los analitos se mantuviera estable en al agua fortificada, se propuso un método de extracción líquido-líquido (ELL) seguido de PSSI-GC-MS. El procedimiento de esta metodología se describe a continuación.

Se mezcló 1 mL de muestra de agua de los ensayos de exposición con 1 mL de hexano. Se agitó en vortex durante 3 min y se dejó en reposo para que se separaran las fases. La fase orgánica se pasó a través de 100 mg de sulfato de sodio anhidro y se inyectó en el sistema PSSI-GC-MS con las condiciones reportadas en la sección 2.4.2. La cuantificación se realizó con estándar externo. El análisis de aguas se realizó para cinco diferentes ensayos de exposición, tres de trucha arcoíris y dos de tilapia, los resultados obtenidos se muestran en la Figura 1.

Para el análisis de agua se tomó una muestra inicial, seguida de muestras antes y después de refortificar el agua a diferentes tiempos. La concentración de los analitos en el agua disminuyó considerablemente (aproximadamente un 90%) después de 8h del inicio del experimento, por lo que fue necesario sustituir 50 L de los 70 L iniciales con agua recién fortificada, para recuperar entre el 60 y 80 % de la concentración inicial, este procedimiento se realizó dos veces al día, para mantener estable la concentración de los analitos en el agua.

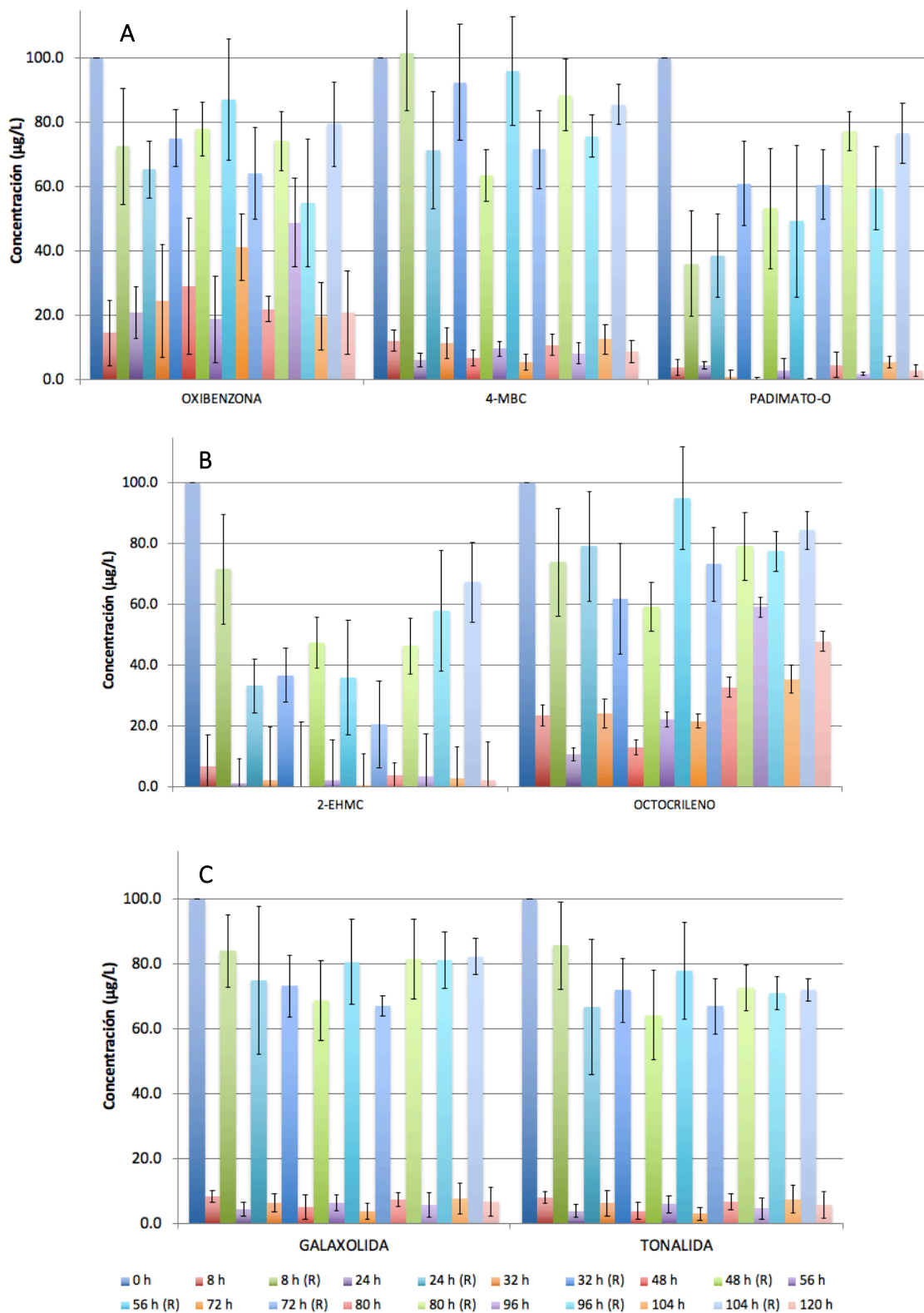


Figura 1. Resultados obtenidos para el análisis de muestras de agua en los ensayos de exposición para filtros UV (A y B) y almizcles (C), (R)=refortificación (n=5)

ANEXO III

TABLA DE ANOVA PARA LINEALIDAD (PRUEBA F)

Los análisis estadísticos se obtuvieron con Microsoft Excel (versión 16.23, 2019).

a) Linealidad del sistema PSSI-GC-MS con estándares en acetato de etilo

Compuesto	F ₀	F _{crítica}	Hipótesis	Resultado
Galaxolida	768.47	1.14 x 10 ⁻⁰⁶	H ₀ : m = 0 H ₁ : m ≠ 0	Se rechaza H ₀ (α=0.05), ambas variables están relacionadas linealmente
Tonalida	568.60	2.42 x 10 ⁻⁰⁶		
Oxibenzona	634.30	1.84 x 10 ⁻⁰⁶		
4-MBC	604.83	2.07 x 10 ⁻⁰⁶		
Padimato-O	604.83	2.07 x 10 ⁻⁰⁶		
2-EHMC	762.31	1.17 x 10 ⁻⁰⁶		
Octocrileno	929.34	7.13 x 10 ⁻⁰⁷		

m = pendiente de la curva de calibración

b) Linealidad del sistema PSSI-GC-MS con estándares derivatizados con MSTFA

Compuesto	F ₀	F _{crítica}	Hipótesis	Resultado
Galaxolida	280.05 ^a	1.39 x 10 ⁻⁰⁵	H ₀ : m = 0 H ₁ : m ≠ 0	Se rechaza H ₀ (α=0.05), ambas variables están relacionadas linealmente
	178.65 ^b	1.81 x 10 ⁻⁰⁴		
Tonalida	282.86 ^a	1.36 x 10 ⁻⁰⁵		
	229.79 ^b	1.10 x 10 ⁻⁰⁴		
Oxibenzona-TMS	414.48 ^a	5.29 x 10 ⁻⁰⁶		
4-MBC	494.42 ^a	3.42 x 10 ⁻⁰⁶		
Padimato-O	1281.42 ^a	3.20 x 10 ⁻⁰⁷		
2-EHMC	858.55 ^a	8.67 x 10 ⁻⁰⁷		
Octocrileno	196.43 ^a	3.32 x 10 ⁻⁰⁵		

m = pendiente de la curva de calibración

^a Evaluado en el intervalo de 10-600 ng/mL

^b Evaluado en el intervalo de 500-1000 ng/mL

c) Linealidad del método MSPD-PSSI-GC-MS

Compuesto	F ₀	F _{crítica}	Hipótesis	Resultado
Galaxolida	740.17 ^a	1.08 x 10 ⁻⁰⁵	H ₀ : m = 0 H ₁ : m ≠ 0	Se rechaza H ₀ (α=0.05), ambas variables están relacionadas linealmente
	428.82 ^b	1.69 x 10 ⁻¹⁴		
Tonalida	3039.49 ^a	6.48 x 10 ⁻⁰⁷		
	418.35 ^c	8.33 x 10 ⁻¹⁶		
Oxibenzona	229.85 ^a	1.10 x 10 ⁻⁰⁴		
	603.03 ^c	7.41 x 10 ⁻¹⁶		
4-MBC	308.21 ^a	6.18 x 10 ⁻⁰⁵		
	359.10 ^c	8.59 x 10 ⁻¹⁴		
Padimato-O	2267.41 ^a	1.16 x 10 ⁻⁰⁶		
	372.80 ^d	5.92 x 10 ⁻¹¹		
2-EHMC	247.53 ^a	9.53 x 10 ⁻⁰⁵		
	345.15 ^d	9.61 x 10 ⁻¹¹		
Octocrileno	558.45 ^a	1.90 x 10 ⁻⁰⁵		
	860.59 ^c	2.74 x 10 ⁻¹⁷		

^a Evaluado en el intervalo de 0.05-1 µg/mL

^b Evaluado en el intervalo de 1-75 µg/mL

^c Evaluado en el intervalo de 1-60 µg/mL

^d Evaluado en el intervalo de 1-40 µg/mL

m = pendiente de la curva de calibración

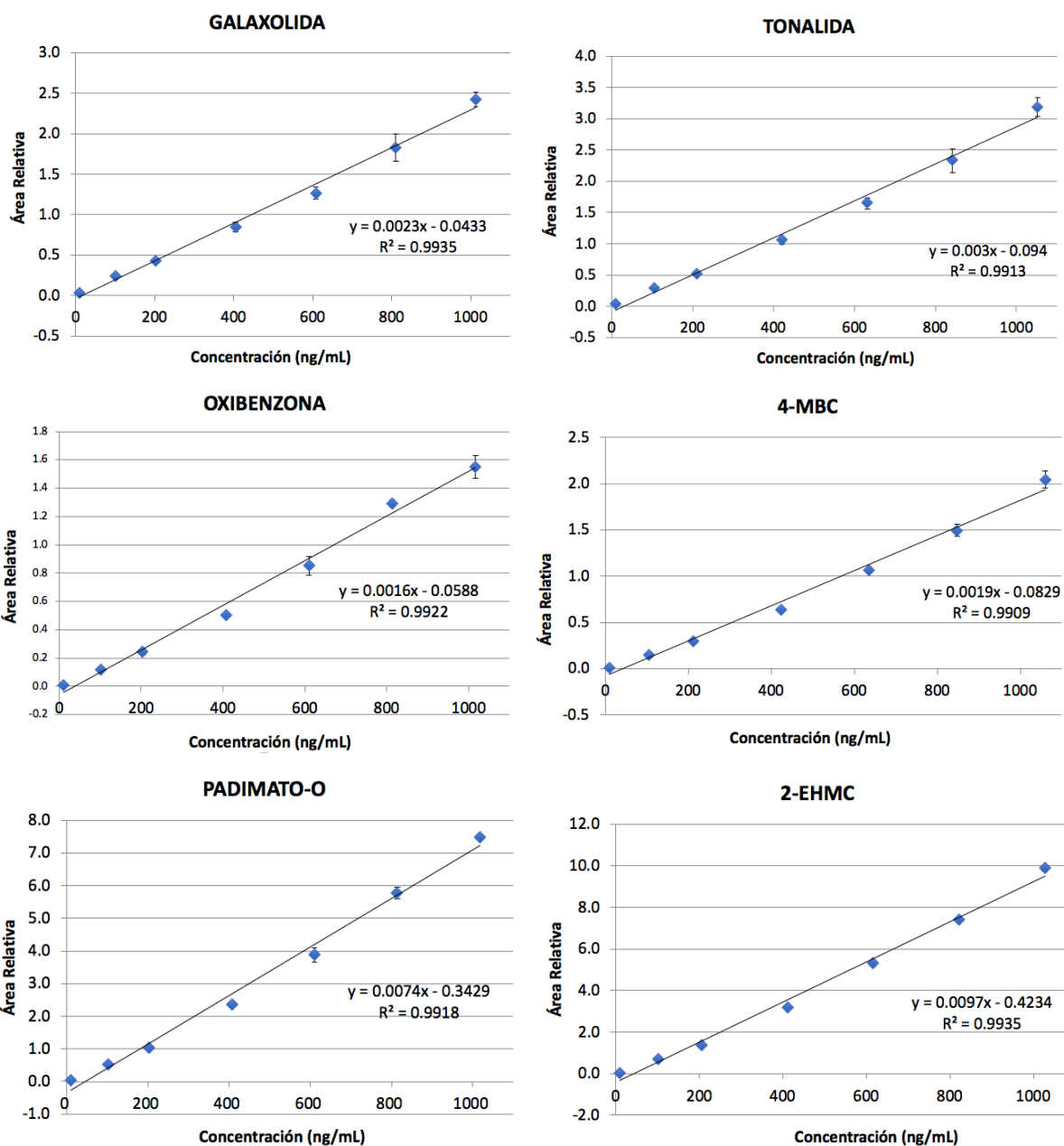
d) Linealidad *in vitro* SPME-GC-MS

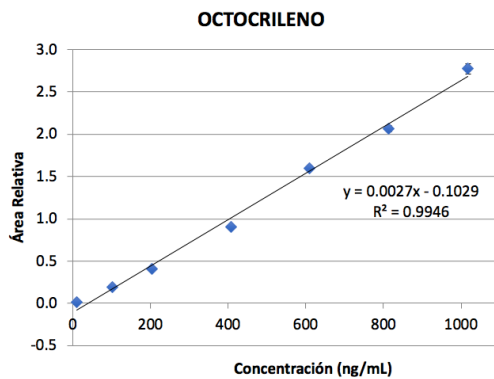
Compuesto	F ₀	F _{crítica}	Hipótesis	Resultado
Galaxolida	117.06	9.08 x 10 ⁻⁰⁹	H ₀ : m = 0 H ₁ : m ≠ 0	Se rechaza H ₀ (α=0.05), ambas variables están relacionadas linealmente
Tonalida	256.28	2.86 x 10 ⁻¹¹		
Oxibenzona-TMS	293.39	1.03 x 10 ⁻¹¹		
4-MBC	139.79	2.55 x 10 ⁻⁰⁹		
Padimato-O	142.05	2.27 x 10 ⁻⁰⁹		
2-EHMC	177.32	4.49 x 10 ⁻¹⁰		
Octocrileno	105.99	1.83 x 10 ⁻⁰⁸		

m = pendiente de la curva de calibración

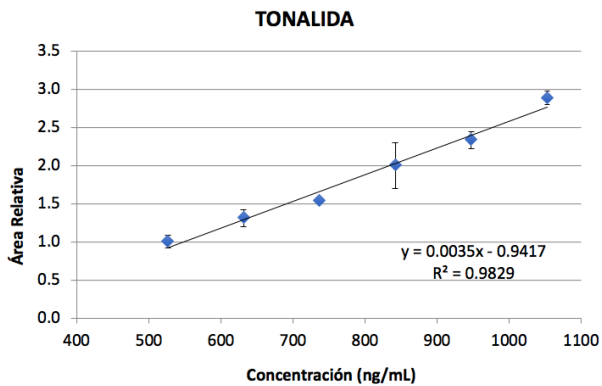
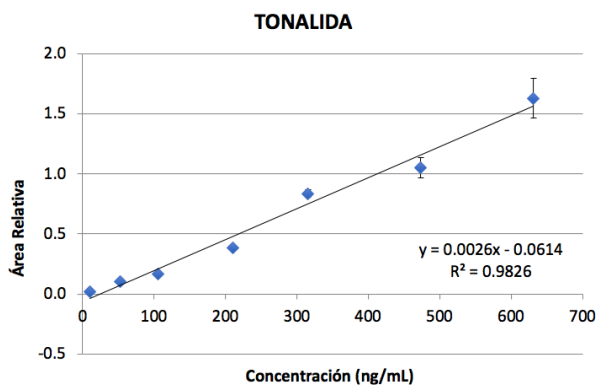
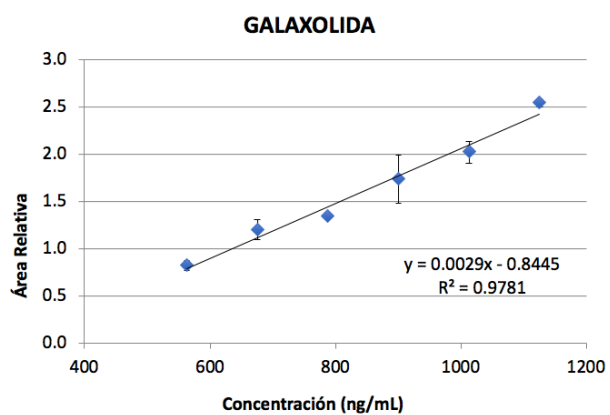
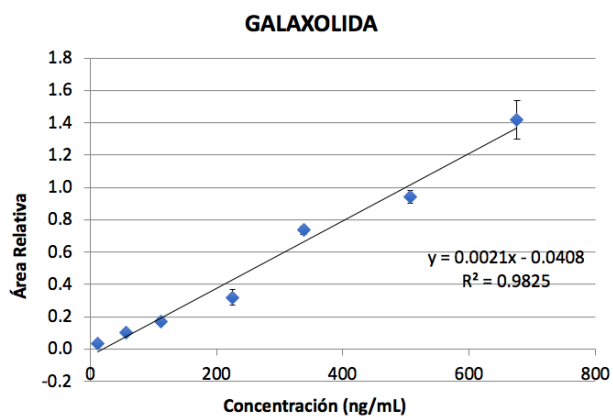
ANEXO IV
LINEALIDAD

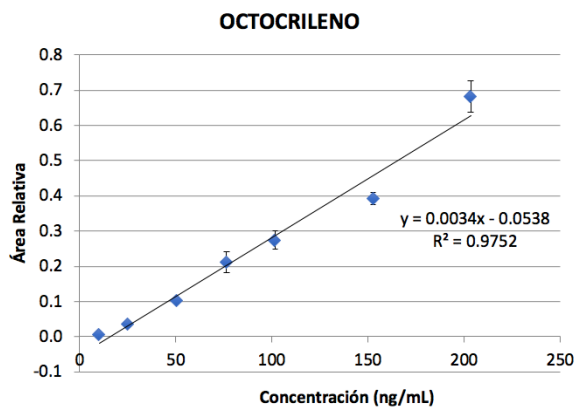
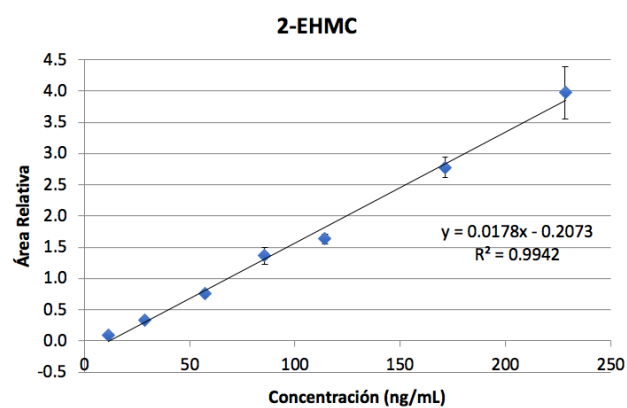
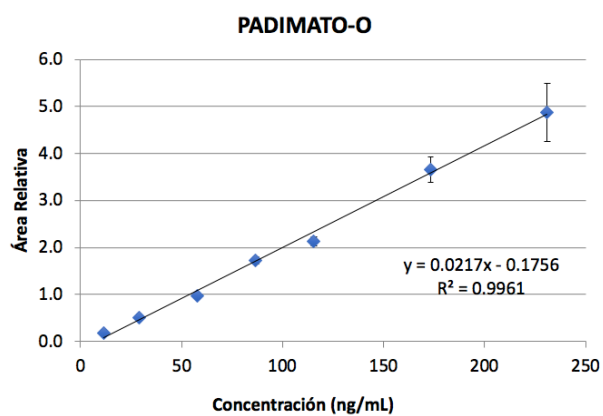
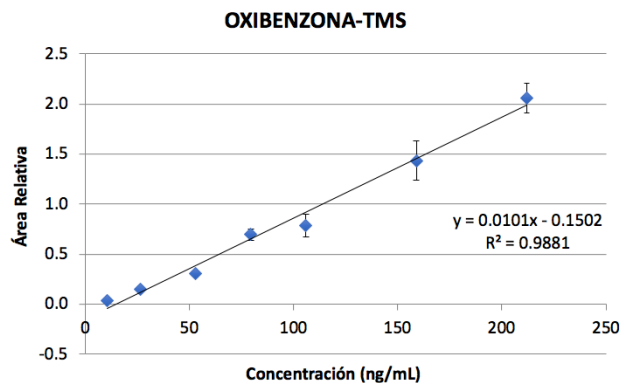
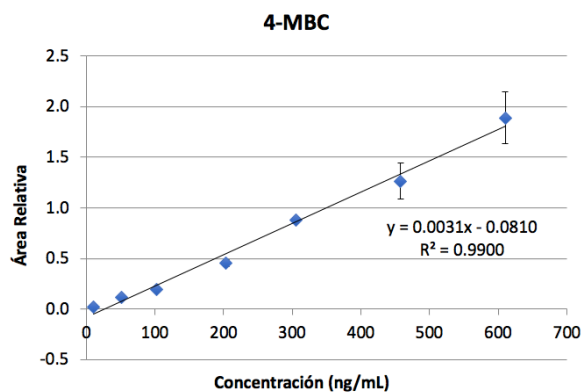
a) Linealidad del sistema PSSI-GC-MS con estándares en acetato de etilo



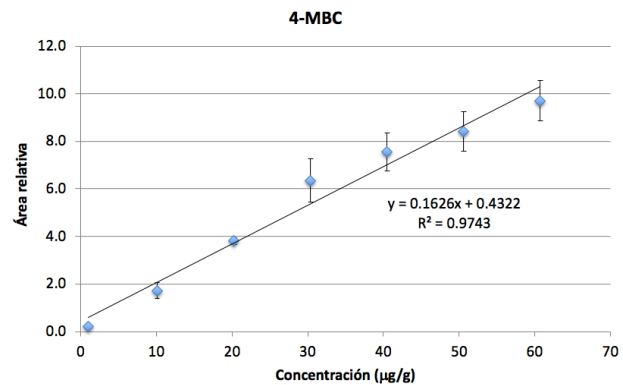
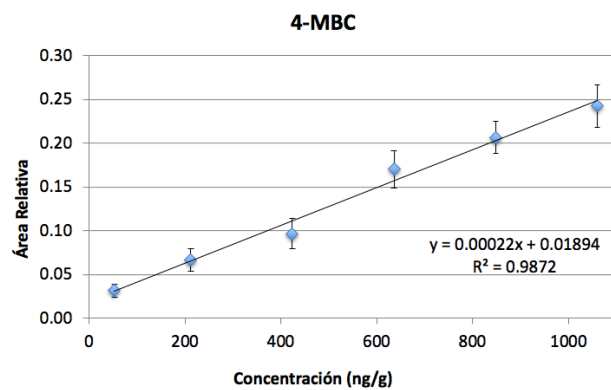
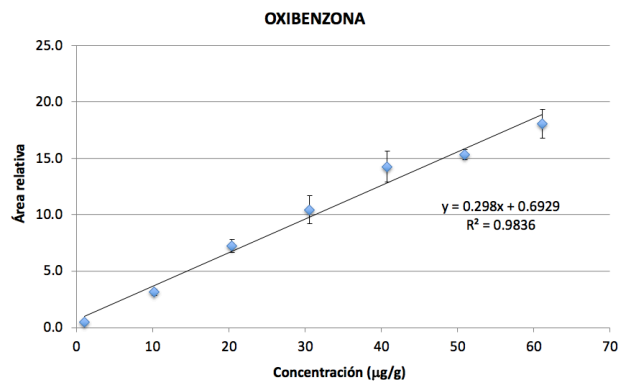
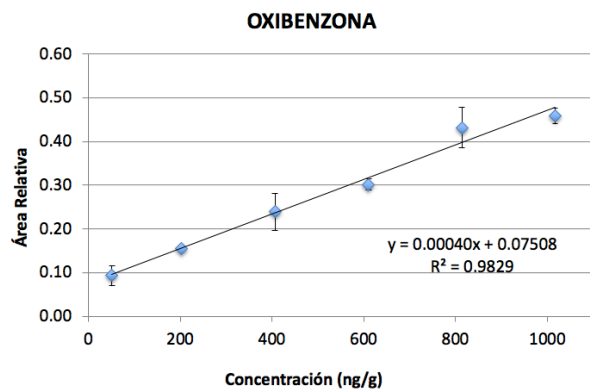
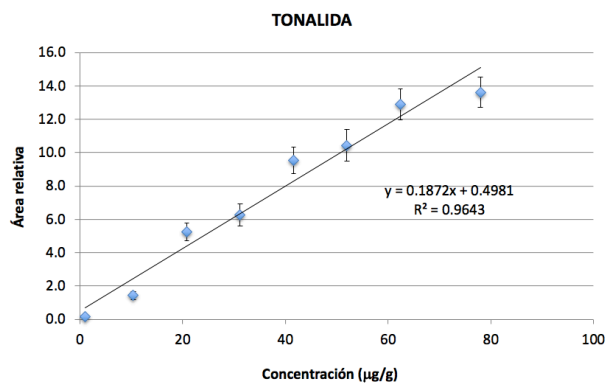
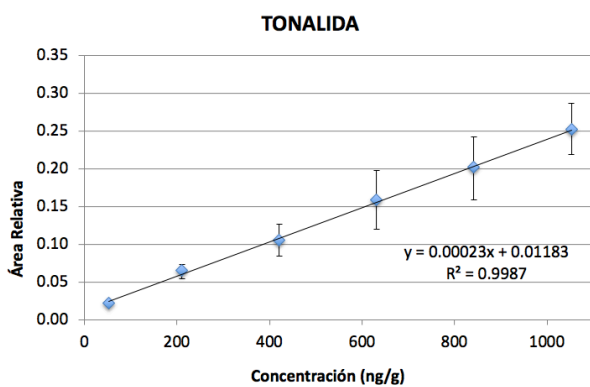
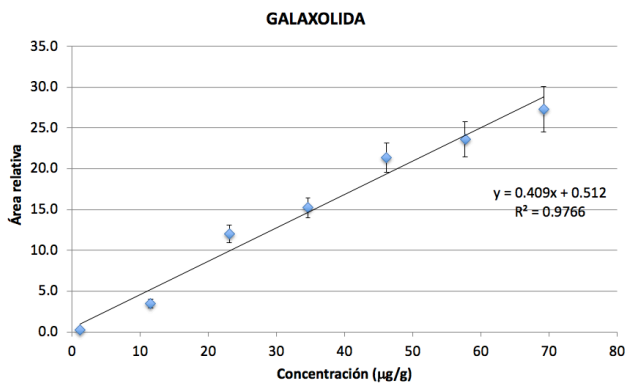
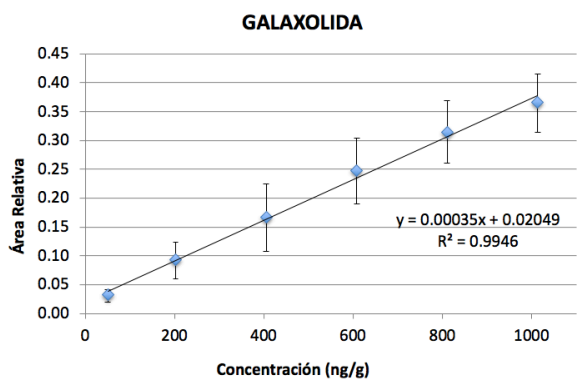


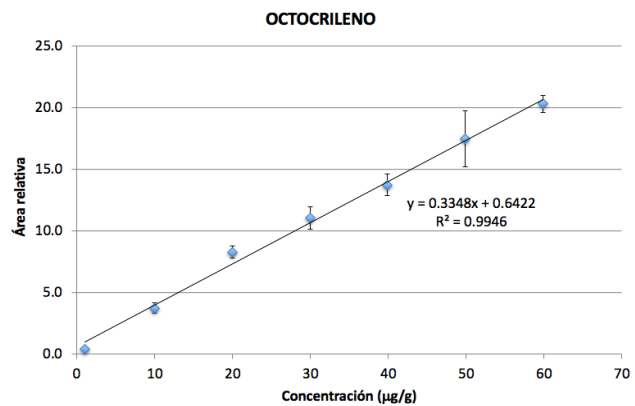
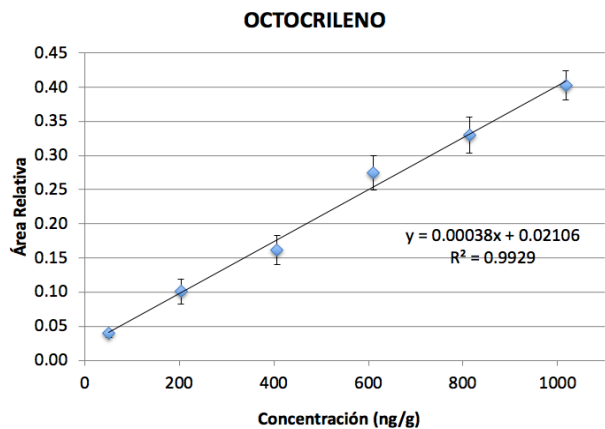
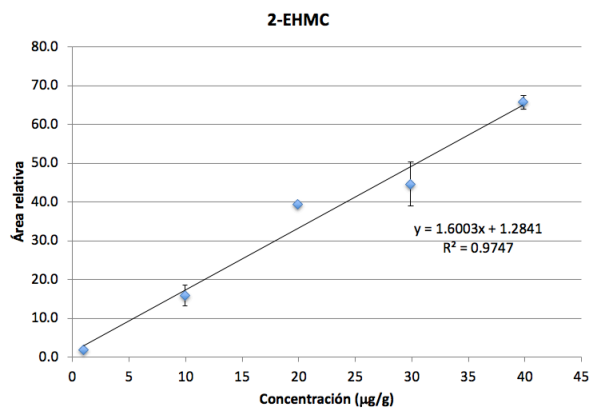
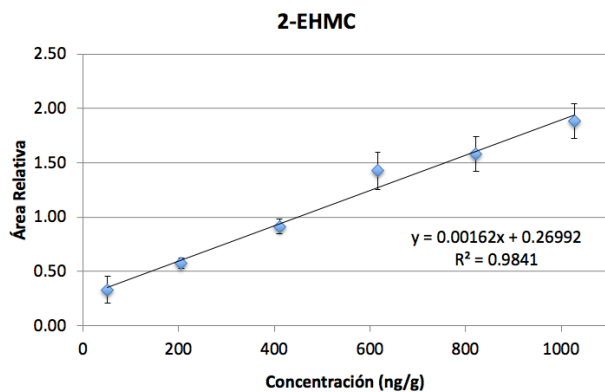
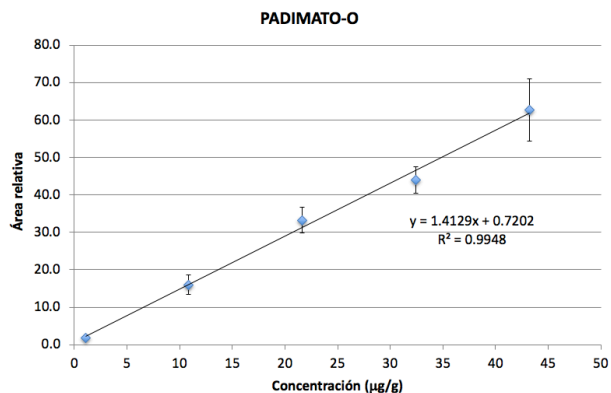
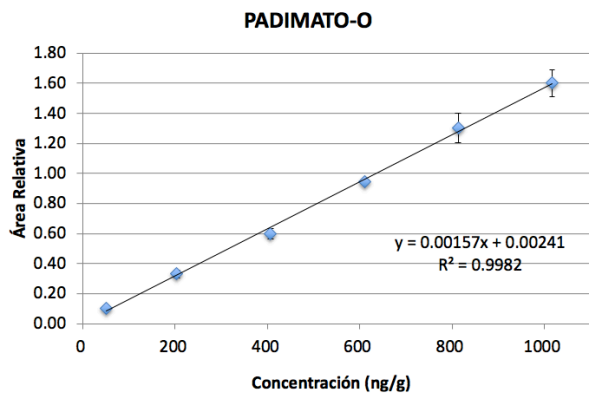
b) Linealidad del sistema PSSI-GC-MS con estándares derivatizados con MSTFA





c) Linealidad del método MSPD-PSSI-GC-MS





ANEXO V

ARTÍCULOS PUBLICADOS

Food Analytical Methods (2018) 11:2272–2279
<https://doi.org/10.1007/s12161-018-1206-1>



Determination of Personal Care Products in Fish Tissue Based on Matrix Solid-Phase Dispersion Combined with Programmable Split/Splitless Injector Gas Chromatography-Mass Spectrometry

Iran Ocaña-Rios¹ · Araceli Peña-Alvarez¹ · Elena Loeza-Fuentes² · Ignacio Zuñiga-Perez³

Received: 26 September 2017 / Accepted: 20 February 2018 / Published online: 6 March 2018
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

An analytical method was developed and validated for the simultaneous determination in fish muscle of two kinds of emerging pollutants: polycyclic aromatic musks (galaxolide and tonalide) and UV filters [oxybenzone, 3-(4-methylbenzylidene) camphor, padimate-O, 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate, octocrylene], which are very common ingredients of personal care products, by programmable split/splitless injector gas chromatography-mass spectrometry (PSSI-GC-MS) using a matrix solid-phase dispersion (MSPD) for extraction and clean-up procedure in a single step. The method was evaluated for precision (relative standard deviation < 19%), linearity ($r^2 > 0.9829$); accuracy, reported as % of recovery; limit of quantification (0.013 to 0.040 $\mu\text{g g}^{-1}$, referred to dry mass); and limit of detection (0.004 to 0.012 $\mu\text{g g}^{-1}$, referred to dry mass) for each of the analytes. The average recoveries in muscle samples spiked at two levels: 0.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ and 1.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ ranged between 77–111% and 55–108%, respectively. The method was applied for the determination of the mentioned pollutants in an exposure *in vivo* study with rainbow trout, and the results showed a larger absorption of musks (tonalide 43.0 $\mu\text{g g}^{-1}$) than UV filters (padimate-O, 1.0 $\mu\text{g g}^{-1}$). The proposed procedure has demonstrated to be able for simultaneous monitoring of these two different kinds of common emerging pollutants coming from personal care products, which would make it a useful tool for quality control and safety studies.

Keywords Musks · UV filters · PCPs · Fish muscle · MSPD · PSSI-GC-MS

Introduction

In the last few decades, contamination impact in food has been focused on regulated contaminants such as metals, pesticides, and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). However, many other chemical compounds have been continuously released into the environment due to human activity; they come from several branches of industry and scientific research, and are closely related to lifestyle, such as household chemicals, pharmaceutical products, and personal

care products. All these non-regulated pollutants have been called emerging contaminants and could cause toxicity to human being as the regulated contaminants (Gros et al. 2008; Hansen 2007). Among the emerging contaminants, there are two kinds of compounds that are common ingredients of personal care products (PCPs) such as polycyclic aromatic musks and UV filters (Kümmerer 2011).

Polycyclic aromatic musks are frequently used for manufacture of perfumes, lotions, soaps, creams, and detergents because of their ability to improve fragrance fixation. Its use has increased in the last few years as substitutes for nitro musks, which are more toxic compounds than polycyclic aromatic musks (Dietrich and Hitzfeld 2004; Van Der Burg et al. 2008). In a cellular model, musks enhance the genotoxic effect of PAHs and increase susceptibility of humans to the health hazards of PAHs (Mersch-Sundermann et al. 2001). Polycyclic musks also inhibit multixenobiotic defense in aquatic organisms (Smítal et al. 2004). UV filters are organic compounds commonly used in personal care products for protection against sun exposure to prevent skin

✉ Araceli Peña-Alvarez
 arpeal@unam.mx

¹ Facultad de Química, Departamento de Química Analítica, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

² Facultad de Medicina, Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

³ Perkin Elmer de México S. A, Ciudad de México, Mexico

cancer, and its use has increased in a great variety of products: shampoos, creams, cosmetics, lotions, etc. (Barber 2014; Birkholz et al. 2014). Musks and UV filters are both endocrine disruptors that enter into the aquatic environment because of human activity and can affect the safety of the food consumed by the humans with a potential impact on their health, this make necessary monitoring its incidence in biological and environmental samples (Fent et al. 2010; Rimkus 1999).

In recent years, there is a growing concern for evaluating the exposure to emerging contaminants and determine the potential adverse effects for humans that may result from food consumption containing contaminants. The contaminants can bioaccumulate, being stored faster than they are metabolized or excreted, leading to trophic magnification in aquatic organisms like fish due to its lipophilic character and, consequently, these contaminants enter into contact with humans by the consumption of contaminated fish. UV filters and musks have been already detected at ng g^{-1} levels in different kind of fishes by HPLC-MS, HPLC-MS-MS, and GC-MS; however, many of them used solvent extraction and an additional clean-up step (Gago-Ferrero et al. 2012; Marchal and Beltran 2016). The first step for evaluating the risk associated with food contaminated with these kinds of compounds is to develop and validate a method to quantitate them. The main problems for developing methods to evaluate emerging contaminants in biota are the low concentration at what they could be present and the complexity of the matrix of the samples (Farré and Barceló 2013).

In order to eliminate at maximum the matrix interferences, it is necessary to use sample preparation techniques that allow more selective extractions from fish prior to their introduction to the chromatographic system. Currently, sample preparation is mainly based on solvent extraction, which requires a clean-up process by gel permeation chromatography (GPC) or normal phase sorbents (alumina, silica, or florisil) to remove the interfering lipids that are co-extracted with the analytes to be determined. After performing solvent extraction and clean-up process, the analytes are determined with liquid or gas chromatography coupled with mass spectrometry (Balmer et al. 2005; Mottaleb et al. 2009). Among sample preparation techniques, matrix solid-phase dispersion used for extraction of organic compounds of solid or semi-solid samples, where the sample and a dispersant sorbent are blended in a mortar with a pestle for simultaneous disruption and extraction (Barker 2000), is a simpler and faster technique that can also be used for eliminating interferences of biota samples. In some case, co-columns with different sorbents (alumina, silica, florisil, C18, etc.) are used. These are placed at the

bottom of a polypropylene cartridge prior to addition of the MSPD blend to remove co-eluting interferences in the final eluate, which allows to perform extraction and clean-up simultaneously saving time and simplifying the sample treatment (Barker 2007). This technique has already been applied to the extraction of UV filters in fish (Negreira et al. 2013; Tsai et al. 2014).

The current trend in analytical chemistry is to reduce the sample size and solvent consumption to obtain the highest possible sensitivity, selectivity, accuracy, and precision; the combination of miniaturized sample preparation with modern chromatographic equipment has allowed monitoring target analytes at trace levels in a vast variety of food samples. Particularly, GC equipment with programmable split/splitless injector (PSSI) allows to pre-concentrate large volumes in the injector module of the chromatograph by solvent purging, removing the solvent from the sample prior to entering the column (Mol et al. 1996). This enables the analysis of thermally labile compounds while eliminating the discrimination of high boiling compounds (e.g., UV filters), achieving greater detection limits and cleaner chromatography.

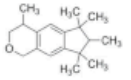
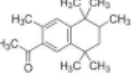
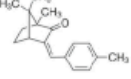
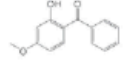
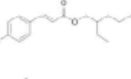
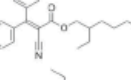
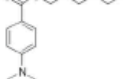
The objective of this work was to develop a sensitive, selective, and simple MSPD-PSSI-GC-MS method to determine simultaneously polycyclic aromatic musks (galaxolide and tonalide) and UV filters (4-MBC, 2-EHMC, padimate-O, oxybenzone, and octocrylene) in fish muscle. The validated method was used to determine the mentioned pollutants in rainbow trout artificially exposed to them in an *in vivo* study.

Materials and Methods

Chemicals, Reagents, and Materials

The polycyclic aromatic musks standards were purchased from Sigma-Aldrich with a certified purity >99% for tonalide (USA) and content >55% for galaxolide (solution at 50% in diethylphthalate, China). The UV filters standards were acquired from Sigma-Aldrich, 3-(4-methylbenzylidene) camphor (4-MBC, Germany), 2-ethylhexyl 4-methoxycinnamate (2-EHMC, Switzerland), octocrylene (Germany), oxybenzone (USA), and padimate-O, (USA) with a certified purity >98% (Table 1). Benzo[a]anthracene (B[a]A) was from Ultra Scientific, USA ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$ in dichloromethane). Water ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ resistivity) was obtained from a Millipore Direct-Q3 UV deionizer (USA), Silica CHROMABOND C₁₈ PAH (particle diameter 45 μm) from MACHEREY-NAGEL (USA), and florisil (60–100 mesh) from J.T. Baker (USA). The solvents used were acetonitrile (HPLC grade, VWR, France), methanol

Table 1 Target analytes

Type	Analyte	Structure	Molecular formula	Molecular weight (g mol ⁻¹)	Log K _{ow}	SIR monitoring ions (m/z)
Musks	Galaxolide		C ₁₈ H ₂₆ O	258.40	5.9 ^a	243, 258
	Tonalide		C ₁₈ H ₂₆ O	258.40	5.8 ^a	243, 258
UV filters	4-MBC		C ₁₈ H ₂₂ O	254.37	5.5 ^b	171, 211, 254
	Oxybenzone		C ₁₄ H ₁₂ O ₃	228.24	3.5 ^b	77, 151, 228
	2-EHMC		C ₁₈ H ₂₆ O ₃	290.40	5.8 ^b	161, 178, 290
	Octocrylene		C ₂₄ H ₂₇ NO ₂	361.48	6.9 ^b	204, 249, 360
	Padimate-O		C ₁₇ H ₂₇ NO ₂	277.40	5.8 ^b	148, 165, 277

^aGeyer et al. 2000^bKameda et al. 2011

(HPLC grade, Tecsiqum, Mexico), ethyl acetate (analytical grade, J.T. Baker, Mexico), and acetone (for pesticide residue analysis, Sigma-Aldrich, Germany).

Polypropylene syringes (6-mL capacity) and 20 μm polyethylene frits were purchased from Supelco (USA) and Agilent Technologies (USA), respectively.

Extran MA 05 detergent for glassware cleaning was purchased from Merk (Mexico).

GC-MS Analysis

All analyses were carried out using a Clarus 680 GC equipped with a programmable split/splitless injector (PSSI) coupled to a Clarus SQ 8C quadrupole mass spectrometer (Perkin Elmer), and data were collected using TurboMass 6.1.0 software. A Perkin Elmer Elite-5MS (30 m × 0.25 mm I.D.) 0.25-μm film thickness column was used. The gas chromatographic conditions were as

follows: the initial oven temperature was 80 °C for 1 min, then programmed at 10 °C min⁻¹ to 300 °C during 10 min, helium was used as carrier gas at 1 mL min⁻¹ for 20 min and programmed at 2 mL min⁻¹ during 13 min. For pre-concentration of the analytes in the PSSI injector, the following modes and temperatures were programmed: splitless (0.1 min), then split (50:1) during 1.5 min, again splitless (3 min) and split (50:1) 30 min, at initial temperature of 80 °C for 1.3 min, then programmed at 40 °C min⁻¹ to 320 °C for 31.7 min. Injection volume 5 μL. The MS ionization potential was 70 eV; the ion source and transfer line temperature were at 175 and 280 °C, respectively. Identification of target analytes was effected by comparing the retention times and spectral data with those of authentic compounds. Scan mode (50–400 m/z) was used for identification, while single ion recording (SIR) for quantification. Diagnostic fragments ions are shown in Table 1.

Glassware Clean-up

To keep interferences at minimum level in all the experiments, glassware used for trace analysis was rinsed with methanol, then washed with Extran liquid alkaline phosphate-free detergent, then rinsed with deionized water, and finally heated at 550 °C one hour.

Standard Solutions

Individual standard stock solutions were prepared by appropriate dilutions in methanol to obtain a concentration of 1.0 mg mL⁻¹ of each compound. From the individual analyte solution, a standard stock solution containing the seven analytes to be determined was prepared in methanol at an approximate concentration of 100 µg mL⁻¹ each. The solutions were stored in the dark at 4° C.

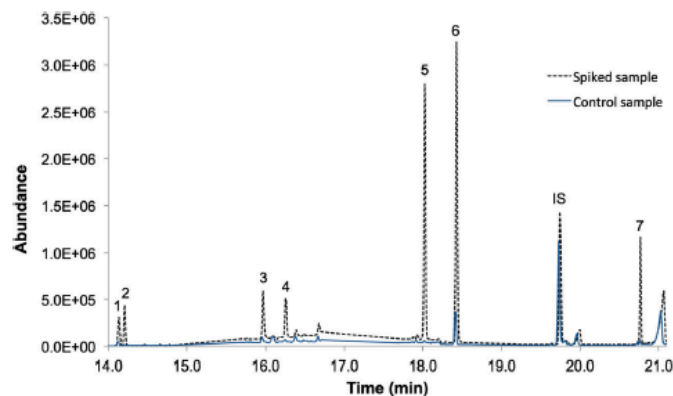
Preparation of Spiked Fish Muscle

For method development and validation, rainbow trout muscle was obtained in a local market as filets and lyophilized (Freezone Triad freeze dry system model 7400040, Labconco). 0.2 g of lyophilized muscle were spiked with 100 µL of standard solution (prepared from the standard stock solution in methanol containing the seven analytes and then diluted in acetone) at different concentrations levels, the spiked sample was homogenized, and then allowed to air-dry at room temperature for 3 h.

MSPD Extraction and Clean-up

0.2 g of lyophilized muscle sample was blended in an agate mortar with 1.0 g of florisil (preconditioned at 130 °C for 24 h) until a homogeneous mixture was obtained.

Fig. 1 Ionic chromatogram (SIR) for the analysis of a muscle sample control and spiked muscle sample at 1.0 µg g⁻¹. Peak identification: 1. Galaxolide, 2. Tonalide, 3. Oxybenzone, 4. 4-MBC, 5. Padimate-O, 6. 2-EHMC, 7. Octocrylene; IS. B[a]A



The mixture was transferred to a 6-mL polypropylene cartridge containing 0.5 g of C18 PAH silica as co-column and clean-up sorbent, and then it was compressed and covered with a polyethylene frit. The analytes were eluted from the cartridge with 5 mL of acetonitrile by gravity. Finally, the acetonitrile extract was evaporated to dryness (40 °C) under a nitrogen stream, and the residue re-dissolved with 1.0 mL of ethyl acetate containing 100 ng mL⁻¹ of internal standard (B[a]A).

MSPD-PSSI-GC-MS Validation

The following parameters were evaluated: precision, accuracy, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), and linearity.

Accuracy and precision were assessed by analyzing dry muscle samples spiked at two concentration levels: 0.1 and 1 µg g⁻¹. For each concentration, three replicates were made in two different days and the recoveries and relative standard deviation (RSD) were calculated for each level. LOD and LOQ of each analyte were determined as a signal-to-noise ratio (S/N) of 3 and 10, respectively, in extracts from spiked freeze-dried muscle from 0.004 to 0.050 µg g⁻¹.

Linearity of the method was evaluated using lyophilized muscle spiked at six concentration levels (0.05, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, and 1.0 µg g⁻¹). For each concentration level, three sample replicates were made. The determination coefficients (*r*²), slopes and Y intercepts of the calibration curve were calculated for each analyte.

Study of Exposure of Rainbow Trout to the Contaminants

The validated method was used for the determination of the seven analytes to which the rainbow trout (this kind

Table 2 MSPD-PSSI-GC-MS validation data

Compound	Accuracy ($n = 6$) % recovery		Precision ($n = 6$) RSD		Linearity ($n = 3$) r^2	LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)
	0.1 $\mu\text{g g}^{-1}$	1.0 $\mu\text{g g}^{-1}$	0.1 $\mu\text{g g}^{-1}$	1.0 $\mu\text{g g}^{-1}$			
	Galaxolide	89	108	18			
Tonalide	79	98	18	13	0.9987	0.008	0.025
Oxybenzone	80	55	8	16	0.9829	0.012	0.040
4-MBC	101	102	18	12	0.9872	0.006	0.025
Padimate-O	77	88	6	10	0.9982	0.008	0.025
2-EHMC	111	96	12	11	0.9841	0.004	0.013
Octocrylene	96	105	7	7	0.9929	0.012	0.040

of fish is considered a bioindicator in toxicity tests, EPA 1996) were exposed during an in vivo study. The experimental procedures for in vivo study in fish were approved by the Bioethics Committee for Animal Health (CICUAL, Faculty of Chemistry, UNAM). Juvenile rainbow trouts were obtained from a local aquatic farm (length 16.4 ± 1.0 cm; weight 40.7 ± 7.6 g, $n = 6$). The trouts were conditioned in an aerated aquarium with 120 L of potable water for 1 week before the experiment (13:11-h light/dark photoperiod, 13 ± 2 °C). Five rainbow trouts were exposed in 70 L of dechlorinated potable water spiked with standard solution of musks and UV filters in methanol to have a concentration of $100 \mu\text{g L}^{-1}$ for each analyte, and one fish was maintained in dechlorinated potable water as control. To maintain stable concentrations of the analytes in the water, 50 L of the water was renewed with freshly spiked water every 24 h. After 4 days of exposure, the trouts were sacrificed. Bonds, skin, and inner organs were discarded and only the muscle of the fish was used for the analysis. The fish muscle was lyophilized and analyzed by MSPD-PSSI-GC-MS validated method.

Results and Discussion

MSPD-PSSI-GC-MS Optimization

PSSI injector was used because it allows an increase in the injection volume with a solvent vent mode improving analytes detectability. Volume injection (3, 5, 7, and 10 μL), injector initial temperature (60 and 80 °C), and flow rate were evaluated. The results showed that the lowest RSD value (<12%) was obtained with the following parameters: 5 μL volume injection, injector initial temperature 80 °C, and flow rate program of 1 mL min^{-1} for 20 min and then 2 mL min^{-1} for 13 min, which diminished the octocrylene band broadening. Phenanthrene, benzo[a]anthracene (B[a]A), and benzo[a]pyrene (B[a]P) were evaluated as internal standards in order to decrease variations due to injector pre-concentration step and improve repeatability, especially for semivolatiles such as galaxolide and tonalide. The best repeatability was achieved with B[a]A.

Matrix solid-phase dispersion (MSPD) conditions were optimized by studying the ratio sample/dispersant 1:4

Fig. 2 Analysis of rainbow trout muscle diluted extract by MSPD-PSSI-GC-MS in SIR mode. Peak identification as Fig. 1

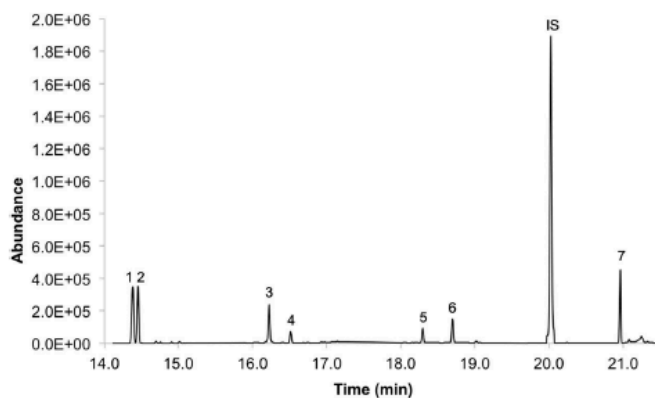


Table 3 Rainbow trouts data

Sample	Total length (cm)	Weight (g)	Lipid content (%)	Humidity (%)
Control	15.0	31.9	1.0	79.3
1	17.7	45.5	1.2	79.9
2	16.2	52.5	2.4	79.1
3	16.5	34.0	1.3	79.6
4	15.8	39.4	2.3	80.2
5	17.3	40.7	1.6	81.8

(0.5 and 2.0 g) and 1:5 (0.2 and 1 g); 0.5 g as co-column (C18 PAH and PSA) and volume elution solvent (3, 5, and 7 mL acetonitrile). The best conditions were as follows: 0.2 g of freeze-dried sample equivalent to 1 g of fresh tissue, approximately; 1 g of florisisil as dispersant; 0.5 g of C18 PAH, as co-column; and 5 mL of acetonitrile as elution solvent.

Figure 1 shows the ionic chromatogram of muscle control sample and spiked muscle sample superimposed. In spite of the special precautions taken to avoid contamination, the ion chromatogram of the control sample shows some interfering peaks in the same retention time of galaxolide, tonalide, and 2-EHMC. This problem has been previously reported as they are ubiquitous due to their extended use in daily life (Bester 2009; Peck 2006; Meinerling and Daniels 2006). However, the contribution to the response was calculated to be well below the LOQ of the corresponding compounds. The ion chromatogram of spiked sample shows good resolution, efficiency, and selectivity for all the analytes.

MSPD-PSSI-GC-MS Validation

Adequate precision (repeatability, inter-day) was found for all compounds; RSD values were < 19%. These values are in agreement with the United Nations guidance for testing biological specimens, which considers a method to be precise when RSD < 20% for trace concentration determinations (United Nations Office on Drugs and

Crime 2009). The mean recovery of analytes in spiked samples at 0.1 $\mu\text{g g}^{-1}$ ranged 77–111% and for 1.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ ranged 88–108%; except for oxybenzone, that ranged 55–80%, being the most polar analyte, it is possible that it is more strongly retained than the others in dispersant florisisil that has also a very polar nature (Moldoveanu and David 2015). These results confirm the adequate accuracy and precision of the MSPD-PSSI-GC-MS method. Limits of detection (LODs) and quantification (LOQs) were 0.004–0.012 and 0.013–0.040 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively, referred to dry weight, all the limits were comparable with reported values (Mottaleb et al. 2009; Negreira et al. 2013; Gago-Ferrero et al. 2015). Linearity was studied from 0.05 to 1.0 $\mu\text{g g}^{-1}$, obtaining determination coefficients (r^2) for musks > 0.990 and for UV filters > 0.980 (Table 2).

Rainbow Trout Study

The developed methodology was used for monitoring the content of the seven target analytes in rainbow trout muscle after an exposure study in vivo. The exposition time for the study was 4 days, based on previously reported studies for tilapia (Chen et al. 2015). The samples analyzed according to the method showed high absorption of analytes in rainbow trouts exposed; therefore, the extracts had to be diluted in order to keep them in the linear range for quantitation (Fig. 2). The results of the study showed that polycyclic aromatic musks content in fish is greater than UV filters, this could be due to musks being more soluble in water which increase the bioavailability. The lipid content of each trout (Table 3) was determined gravimetrically, and was observed that fish with lipid content > 1.6% (samples 2, 4, and 5) showed higher absorption of the compounds in the muscle than fish with low fat content (samples 1 and 3). These results (Table 4) suggest correlation between analyte absorption and lipid content; this is *high lipid content high absorption*. It remains open the possibility that these contaminants can enter in the food chain and biomagnify.

Table 4 PCPs concentration in rainbow trout ($\mu\text{g g}^{-1}$)

Sample	Galaxolide	Tonalide	Oxybenzone	4-MBC	Padimate-O	2-EHMC	Octocrylene
Blank	< LOQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	13.2	24.8	< LOQ	2.8	ND	0.9	12.0
2	24.5	39.4	14.5	8.0	1.3	2.0	19.6
3	14.8	28.1	4.9	7.1	1.0	1.9	17.9
4	23.6	43.0	23.1	14.2	2.6	3.6	16.7
5	21.4	36.1	13.7	6.2	1.2	2.5	14.3

ND not detected

Conclusions

A simple, sensitive, and fast methodology for the simultaneous determination of musks and UV filters in fish muscle based on matrix solid-phase dispersion (MSPD) followed by PSSI-GC-MS was developed. The matrix solid-phase dispersion provides an efficient extraction and clean-up in one step with maximal lipid removal. In addition, the sensitivity of the method developed for all the analytes was enhanced achieving very low LOD (trace level) using PSSI injector. The method was applied successfully to evaluate the concentration of the seven contaminants in rainbow trout, artificially exposed to these compounds, showing that the trout absorbs and bioaccumulates them which could cause health problems to humans by contaminated fish consumption. Therefore, this method could be an alternative to determine food quality and safety.

Acknowledgments The authors want to thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the scholarship awarded to Iran Ocaña-Rios (scholar number 273473), Rocío Juárez Cipres for technical support, and Perkin Elmer de México S.A.

Funding information This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico from the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) project PAPIIT: IN 218116 and Faculty of Chemistry PAIP: 5000-9026.

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest Iran Ocaña-Rios declares that he has no conflict of interest. Elena Loeza-Fuentes declares that she has no conflict of interest. Ignacio Zuñiga-Perez declares that he has no conflict of interest. Araceli Peña-Alvarez declares that she has no conflict of interest.

Ethical Approval All institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals were followed. All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution at which the studies were conducted.

Informed Consent Informed consent was not applicable.

References

- Balmer ME, Buser HR, Müller MD, Poiger T (2005) Occurrence of some organic UV filters in wastewater, in surface waters, and in fish from Swiss lakes. *Environ Sci Technol* 39:953–962
- Barber LB (2014) Emerging contaminants. In: Ahuja S (ed) *Comprehensive water quality and purification*. Vol. 1, status and trends of water quality worldwide. Elsevier, United States, pp 245–266
- Barker SA (2000) Matrix solid-phase dispersion. *J Chromatogr A* 885: 115–127
- Barker SA (2007) Matrix solid phase dispersion (MSPD). *J Biochem Biophys Methods* 70:151–162
- Bester K (2009) Analysis of musk fragrances in environmental samples. *J Chromatogr A* 1216:470–480
- Birkholz DA, Stilson SM, Elliott HS (2014) Analysis of emerging contaminants in drinking water—a review. In: Ahuja S (ed) *Comprehensive water quality and purification*. Vol. 2, assuring purity of drinking water. Elsevier, United States, pp 212–229
- Chen G, Jiang R, Qiu J, Cai S, Zhu F, Ouyang G (2015) Environmental fates of synthetic musks in animal and plant: an *in vivo* study. *Chemosphere* 138:584–591
- Dietrich DR, Hitzfeld BC (2004) Bioaccumulation and ecotoxicity of synthetic musks in the aquatic environment. In: Rimkus GG (ed) *Series anthropogenic compounds. The handbook of environmental chemistry*, vol. 3X. Springer, Berlin, pp 233–244
- EPA Environmental Protection Agency (1996) Ecological effects test guidelines OPPTS 850.1075 fish acute toxicity test, freshwater and marine, United States of America <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/850-1075.pdf>. Accessed 10 Jan 2018
- Farré M, Barceló D (2013) Analysis of emerging contaminants in food. *Trends Anal Chem* 43:240–253
- Fent K, Zenker A, Rapp M (2010) Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. *Environ Pollut* 158: 1817–1824
- Gago-Ferrero P, Díaz-Cruz MS, Barceló D (2012) An overview of UV-absorbing compounds (organic UV filters) in aquatic biota. *Anal Bioanal Chem* 404:2597–2610
- Gago-Ferrero P, Díaz-Cruz MS, Barceló D (2015) UV filters bioaccumulation in fish from Iberian river basins. *Sci Total Environ* 518–519: 518–525
- Geyer HG, Rimkus GG, Scheunert I, Kaune A, Schramm K, Kettrup A, Zeeman M, Muir DCG, Hansen LG, Mackay D (2000) Bioaccumulation and occurrence of endocrine disrupting chemicals (EDCs), persistent organic pollutants (POPs), and other organic compounds in fish and other organisms including humans. In: Beek B (ed) *Bioaccumulation new aspects and developments*, 1st edn. Springer, Heidelberg Berlin, pp 1–66
- Gros M, Petrovic M, Barceló D (2008) Analysis of emerging contaminants of municipal and industrial origin. In: Barceló D, Petrovic M (eds) *The handbook of environmental chemistry*. Springer, Berlin, pp 37–104
- Hansen PD (2007) Risk assessment of emerging contaminants in aquatic systems. *Trends Anal Chem* 26:1095–1099
- Kameda Y, Kimura K, Miyazaki M (2011) Occurrence and profiles of organic sun-blocking agents in surface waters and sediments in Japanese rivers and lakes. *Environ Pollut* 159:1570–1576
- Kümmerer K (2011) Emerging contaminants. In: Wilderer P (ed) *Treatise on water science*, Vol. 3, aquatic chemistry and biology. Elsevier, United States, pp 69–83
- Marchal M, Beltran J (2016) Determination of synthetic musk fragrances. *Int J Environ Anal Chem* 96:1213–1246
- Meinerling M, Daniels M (2006) A validated method for the determination of traces of UV filters in fish using LC–MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 386:1465–1473
- Mersch-Sundermann V, Schneider H, Freywald C, Jenter C, Parzefall W, Knasmüller S (2001) Musk ketone enhances benzo(a)pyrene induced mutagenicity in human derived Hep G2 cells. *Mutat Res* 495:89–96
- Mol HGJ, Janssen H, Cramers CA, Brinkman UAT (1996) Large-volume injection in gas chromatographic trace analysis using temperature-programmable (PTV) injectors. *Trends Anal Chem* 15:206–214
- Moldoveanu S, David V (2015) Modern sample preparation for chromatography. Elsevier, Amsterdam
- Mottaleb MA, Usenko S, O'Donnell JG, Ramirez AJ, Brooks BW, Chambliss KC (2009) Gas chromatography–mass spectrometry screening methods for select UV filters, synthetic musks, alkylphenols, an antimicrobial agent, and an insect repellent in fish. *J Chromatogr A* 1216:815–823
- Negreira N, Rodríguez I, Rodil R, Rubí E, Cela R (2013) Optimization of matrix solid-phase dispersion conditions for UV filters determination in biota samples. *Int J Environ Anal Chem* 93:1174–1188

- Peck AM (2006) Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices. *Anal Bioanal Chem* 386:907–939
- Rimkus G (1999) Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment. *Toxicol Lett* 111:37–56
- Smital T, Luckenbach T, Sauerborn R, Hamdoun AM, Vega RL, Epel D (2004) Emerging contaminants-pesticides, PPCPs, microbial degradation products and natural substances as inhibitors of multixenobiotic defense in aquatic organisms. *Mutat Res* 552:101–117
- Tsai D, Chen C, Ding W (2014) Optimization of matrix solid-phase dispersion for the rapid determination of salicylate and benzophenone-type UV absorbing substances in marketed fish. *Food Chem* 154:211–216
- United Nations Office on Drugs and Crime (2009) Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens. United Nations, New York. https://www.unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf. Accessed 10 Jan 2018
- Van Der Burg B, Schreurs R, Van Der Linden S, Seinen W, Brouwer A, Sonneveld E (2008) Endocrine effects of polycyclic musks: do we smell a rat? *Int J Androl* 31:188–193



Trace analysis of UV filters and musks in living fish by in vivo SPME-GC-MS

Iran Ocaña-Ríos¹ · Araceli Peña-Alvarez¹ · Ignacio Zuñiga-Perez² · Elena Loeza-Fuentes³

Received: 8 January 2019 / Revised: 13 March 2019 / Accepted: 19 March 2019

© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

Abstract

A method was developed for the simultaneous determination of two groups of personal care products, namely UV filters (oxybenzone, 3-(4-methylbenzylidene)camphor, padimate-O, 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate, and octocrylene) and polycyclic aromatic musks (galaxolide and tonalide), in fish by in vivo solid-phase microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry. The in vivo method was validated by carrying out in vitro experiments; the method validation parameters were linearity ($r^2 > 0.98$), interday precision (relative standard deviations $< 35.50\%$), limits of detection and quantification ranging from 2 to 25 ng g⁻¹ and 5 to 70 ng g⁻¹, respectively. The calibrations in vivo and in vitro were determined using a pre-equilibrium sampling rate calibration method. In vivo sampling rate (R_s) was greater than that in vitro; therefore in vivo R_s was applied to the uptake and elimination tracing under controlled laboratory conditions to avoid quantitation error. All analytes were bioaccumulated in muscle tissue over the 5-day exposure in different grades depending on their molecular structure and physicochemical properties; the most absorbed compound was tonalide and the least absorbed compound was padimate-O. The elimination rate was initially high with a rapid decrease of the analyte concentrations for the first 24 h; thereafter, the rate of elimination tended to decrease which indicated that the target analytes were bioaccumulated. To our knowledge, this is the first time that UV filters have been analyzed with in vivo SPME-GC-MS. The proposed method is a simple, miniaturized, and non-lethal alternative for the determination of personal care products in living organisms.

Keywords In vivo sampling · UV filters and musk analysis in fish · Uptake and elimination of personal care products · In vivo SPME-GC-MS

Introduction

The ingredients of personal care products (PCPs) are emerging contaminants used daily for personal hygiene. They are considered ubiquitous because of their regular release into the

aquatic environment, mainly via wastewater discharge, and can cause adverse effects on ecosystems, but little is known about their occurrence and impact on aquatic communities [1, 2]. Among these, UV filters present estrogenic activity and affect thyroid function, and musks are antagonists towards estrogen, androgen, and progesterin receptors [3] and because of their hydrophobic character ($\log K_{ow} > 3.5$) can bioconcentrate in aquatic organisms such as fish. Bioconcentration and elimination studies are important to provide evidence that PCPs should be subject to regulation; however, a standard method for these kinds of experiments requires between 40 and 80 fish to study only one chemical [4], also environmental monitoring requires around 100 fish to establish significant intersite differences [5]; furthermore, most of the analytical methods used in these studies are based on solvents and require lethal sampling. As a consequence, there is currently a need to develop suitable alternative in vivo methods to reduce the number of organisms killed and not to alter the natural balance of the monitored ecosystem.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00216-019-01791-5>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Araceli Peña-Alvarez
arpeal@unam.mx

¹ Facultad de Química, Departamento de Química Analítica, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de México, Mexico

² Perkin Elmer México S. A, 01020 Ciudad de México, Mexico

³ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Ciudad de México, Mexico

Aquatic organisms are very complex samples because they contain salts, minerals, and macromolecules (proteins, carbohydrates, and lipids) which interfere with the determinations of analytes and prevent accurate results from being obtained [6]. Sample preparation techniques reported for the analysis of UV filters and musks in fish are Soxhlet extraction [7, 8], solid-liquid extraction [9], pressurized liquid extraction (PLE) [10, 11], matrix solid-phase dispersion (MSPD) [12], and QuEChERS [13], but these techniques require lethal sampling and additional cleanup steps.

Solid-phase microextraction (SPME) has many environmental applications, because it is a technique that integrates sampling and enrichment into a single step. The fibers for SPME are commonly used for head space and immersion extractions. The main disadvantage is the fragility of the SPME fibers that are easy to break, but recently a new format of fibers for *in vivo* sampling that are resistant and can be used in biological samples (e.g., fish, vegetables, fruits, etc.) have become commercially available. These SPME fibers have been used for sampling analytes in living fish without tissue removal, providing benefits such as minimal invasion of the animals, non-lethal sampling, and the possibility of monitoring the same animal several times, thereby reducing variability [14]. The studies using *in vivo* SPME to determine emerging contaminants in living fish are relatively scarce and they have mostly been developed for pharmaceuticals [15–17]; for PCPs there are only two studies with synthetic musks [18] and flame retardants [19], and both these studies use PDMS fibers. On the other hand, fibers with C18 silica particles embedded in a biocompatible polymer (polyacrylonitrile) are used in clin-

ical rather than environmental analysis; these fibers have the advantage that the polymer minimizes binding of macromolecules, thereby diminishing interferences and avoiding matrix effects. There is therefore no need of a further cleanup. These fibers are suitable for non-polar compounds and are sealed into a hypodermic needle to facilitate their exposure and retraction [20].

In vivo SPME is a non-exhaustive technique that allows the extraction of analytes that can be present in very small amounts and it has been also verified that localized SPME sampling of muscle contaminant burdens is representative of the larger tissue [21] which is why detection limits at trace level are needed. In quantitative *in vivo* SPME analysis, the calibration correlates the amount of analyte extracted from a sampling system by the SPME fiber to the real sample concentration. The quantification accuracy depends on the selection of an appropriate calibration method, which determines how the SPME sampling will be carried out [22]. There are two main calibration methods, *in-fiber* standardization and predetermined sampling rate [18]. The first uses the desorption of the standards preloaded in the extraction phase to calibrate the extraction; it has the disadvantages of requiring determination of the distribution coefficient between sample and

fiber (K_{fs}) and preloaded isotopically labeled standards prior to extraction which are left in fish muscle. The second assumes (within a linear model) that the rate of mass transfer remains constant during sampling, and the concentration of target analytes in the sample matrix is directly proportional to the amount of extracted analytes at a specific time. For this method only sampling rate constant (R_s) has to be calculated without isotopic standards or K_{fs} value; therefore, this method was selected in this study because of its simplicity [23]. The sampling rate method with R_s *in vitro* has been used to determine the concentration of pollutants in living fish [14, 24]; however, a study has found that the sampling rates (R_s) determined *in vitro* and *in vivo* were significantly different [25] and R_s *in vitro* cannot always be applied for *in vivo* analysis. On the basis of this information, in this work the sampling rates (R_s) *in vivo* and *in vitro* were determined in order to establish which R_s is the more appropriate for *in vivo* SPME.

The aim of this study was to develop an *in vivo* SPME-GCMS method to determine UV filters (oxybenzone, 3-(4-methylbenzylidene)camphor, padimate-O, 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate, octocrylene) and polycyclic aromatic musks (galaxolide and tonalide) in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and apply this methodology to trace the uptake and elimination of the mentioned PCPs. As far as we know, this is the first time that two groups of PCPs with different physicochemical properties have been determined simultaneously with *in vivo* SPME using C18 fibers.

Materials and methods

Chemicals and materials

Polycyclic musks and UV filters standards as well as internal standard were like those reported in previous work [26]. Chemical structures and physicochemical properties are shown in Electronic Supplementary Material (ESM) Table S1. C₁₈ SPME fiber probes (45 μ m, 1.5 cm coating length) were purchased from Supelco (Bellafonte, PA, USA). The fibers were conditioned according to instructions provided by the supplier. Each fiber was used once.

Acetonitrile (HPLC grade) and methanol (analytical grade) were obtained from J.T. Baker (Xalostoc, State of Mexico, Mexico). *N*-Methyl-*N*-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) was purchased from Sigma-Aldrich (Germany) and *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) was obtained from Supelco (Bellafonte, PA, USA).

Stock solutions of each target compound (10 mg mL⁻¹) were prepared by weighing and dissolving each compound in methanol and the solutions were stored at 4 °C. Working standard solutions were prepared by dilution of stock solutions in methanol.

GC-MS conditions

All analyses were carried out using a Clarus 680 GC equipped with a programmable split/splitless injector (PSSI) coupled to a Clarus SQ 8C quadrupole mass spectrometer (Perkin Elmer); data were collected with TurboMass 6.1.0 software. A Perkin Elmer Elite-5MS (30 m × 0.25 mm I.D. × 0.25 μm film thickness) fused silica capillary column was used. GC-MS conditions were like those reported in previous work [26]. The qualifier and quantifier ions are presented in Table S1 (see ESM). Derivatization of oxybenzone was required to enhance its volatility and response; MSTFA and BSTFA were studied as derivatizing agents, and MSTFA was selected because of its higher response (four times) and lower variation (MSTFA: RSD 15.2%, $n = 6$ vs BSTFA: RSD 28.1%, $n = 6$).

Analytical procedures

The calibration method used was predetermined sampling rate and is described in Eq. (1):

$$C_s = \frac{n}{R_s t} \quad (1)$$

where C_s (ng mg⁻¹) is the concentration of the analyte in the sample, n (ng) is the amount of analyte extracted onto the fiber, R_s (mg min⁻¹) is the sampling rate constant for the analyte, and t (min) is the extraction time [23]. According to Eq. (1), the amount of analyte extracted should be proportional to its initial concentration, if the other parameters are kept constant.

To obtain the R_s in vivo constant, exposed trout were

analyzed with in vivo SPME-GC-MS to obtain the amount of analyte extracted onto the fiber (n). On the other hand, the total concentration of the target analytes (C_s) was determined by applying the previously reported MSPD-PSSI-GC-MS method [27], the extraction time (t) was obtained from the extraction profile, and with these data R_s was calculated. On the other hand, R_s in vitro was the slope of the equation obtained by plotting $C_s t$ (ng min g⁻¹) versus n (ng) using spiked fish muscle.

Fish

Juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were purchased from a local aquatic farm (Piedra colorada, Santa Rita Tlahuapan, Puebla, México, 19°21'29.7"N 98°34'26.4" W). Trout were adapted as reported in previous work [26]. The fish were fed twice a day with pellets (2.4 mm, Nutripec, Agribands Purina, Mexico). All animal experimental procedures were approved by the Bioethic Committee for Animal Health (CICUAL, Faculty of Chemistry, UNAM). The experimental procedures were based on the guide ASTM E 1022–94 [28].

In vivo SPME analysis

For in vivo experiments Rainbow trout were placed in water spiked with target compounds at 100 μg L⁻¹ and one fish was maintained in potable water as a control, as described in previous work [26]. During the experiments trout were fasted to minimize variations in metabolic rates. To maintain steady concentrations, 50 L was renewed with freshly spiked water twice a day. After the desired exposure time, fish were anesthetized in an airtight container with 0.3 ± 0.1 g of Alka-Seltzer tablet dissolved in 200 mL of water (depending on the fish size) until vertical equilibrium was lost (approximately 1 min). Once the fish were anesthetized, the dorsal-epaxial muscle was pierced with the 22-gauge needle of the C₁₈ SPME fiber to a depth of approximately 20 mm. Following fiber placement, the fish was placed in spiked water (or drinking water for the control trout) to resume vertical balance and consciousness (no signs of oxygen stress were observed after anesthesia). In vivo SPME sampling is shown in Fig. 1. After the extraction time, the fiber was withdrawn from the needle, and the needle was quickly removed from the trout muscle without anesthetizing. After sampling, the fish were recovered completely. The fiber was rinsed with deionized water, then desorbed with 300 μL of acetonitrile (300 rpm, 2 h) and repeated with another 300 μL (300 rpm, 1 h) for complete recovery of the analytes. The extracts were combined and evaporated to dryness with a gentle flow of nitrogen and derivatized with 30 μL of MSTFA (80 °C for 30 min); after cooling, 20 μL of internal standard (B[a]A, 0.125 μg mL⁻¹) was added and analyzed by GC-MS.

In vivo extraction time profile In order to determine the extraction time (t), five juvenile rainbow trout (15.08 ± 0.89 cm; 34.78 ± 4.61 g) were exposed to analytes for 5 days; analytes were extracted at 10, 20, 30, 45 and 55 min and analyzed as described previously (Sect. "In vivo SPME analysis"). For each extraction time studied, one trout and one C₁₈ fiber were used.

In vivo calibration To determine the in vivo sampling rate (R_s), six trout (14.93 ± 1.16 cm; 35.50 ± 6.40 g) were also exposed to analytes for 5 days, and target analytes were extracted for 20 min with C₁₈ fibers and analyzed as described previously (Sect. "In vivo SPME analysis"). After the in vivo extraction, trout were killed using Alka-Seltzer; bones, skin, and inner organs were discarded.

To obtain the total concentration (C_s) of the target analytes, the fish muscle was freeze-dried and analyzed by MSPD-PSSI-GC-MS as described in previous work [26].

In vitro experiments

For in vivo analysis, it would be challenging to calculate the parameters necessary for validation, because it is difficult to

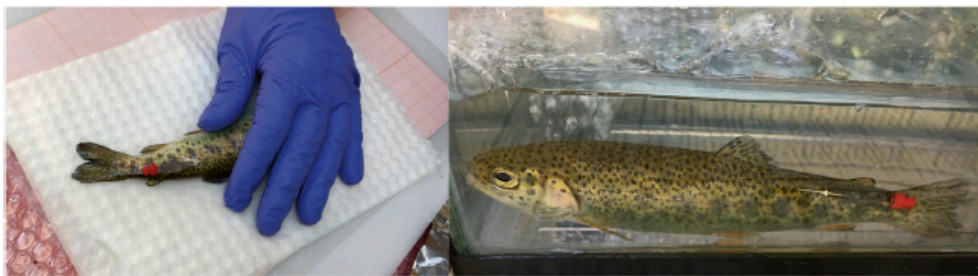


Fig. 1 SPME fiber inserting position for in vivo sampling in fish dorsal-epaxial muscle

replicate the exact sample matrix during preparation from a representative animal as a result of significant interanimal variations in matrix, even using the same species and the same developmental stage. For this reason, the method was validated with in vitro SPME analysis [22]. Also the in vitro calibration was done to evaluate if it was suitable for in vivo analysis as was mentioned previously.

In vitro extraction experiments were performed for calibration and validation by using homogenized fish muscle spiked at different concentrations. Fish fillet was purchased from a local market (Mexico City, Mexico). Spiking was achieved by carefully adding 2000 μL of a mixed standard solution in methanol over 100 g of fish fillet and homogenizing simultaneously with a clean blender, ensuring that no droplet of solution fell off the sample. The spiked fish muscle was left to equilibrate for 2.5 h at 4 $^{\circ}\text{C}$ before extraction.

The parameters evaluated for in vitro experiments were extraction profile, linearity, repeatability, limit of detection (LOD), and limit of quantitation (LOQ). For all the parameters evaluated, after extraction fibers were

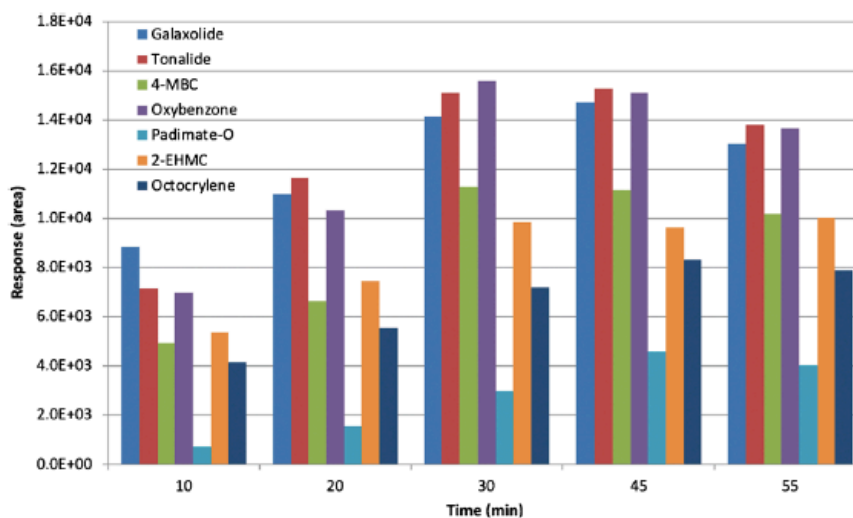
removed and rinsed with deionized water followed by desorption, derivatization, and chromatographic analysis (Sect. “In vivo SPME analysis”).

Extraction time profile It was carried out using 100 g of homogenized fish muscle spiked at 5 $\mu\text{g g}^{-1}$ of each analyte. The extraction was performed at different times (10, 20, 30, 45, and 55 min) using C_{18} fibers. All experiments were performed in triplicate.

Linearity Six samples of homogenized fish muscle (100.2 ± 0.5 g) were spiked at different concentrations (1, 2, 3, 4, 5, and 7 $\mu\text{g g}^{-1}$). The extraction was performed with C_{18} fibers for 20 min. All experiments were in performed in triplicate. To calculate sampling rate constant (R_s), $C_s t$ was plotted versus n , and the slope obtained was R_s .

Repeatability From 100 g of homogenized fish muscle spiked at 0.5 $\mu\text{g g}^{-1}$, three samples were taken (4.0 ± 0.1 g) and extracted with C_{18} fibers for 20 min for intraday repeatability and another three samples for interday repeatability.

Fig. 2 In vivo SPME extraction time profile from fish exposed in spiked water at 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ for 5 days. Oxybenzone response was divided by 10 ($n=1$)



Trace analysis of UV filters and musks in living fish by in vivo SPME-GC-MS

Table 1 R_s values (mean \pm SD) obtained for in vivo SPME

Compound	R_s (mg min ⁻¹) ^a	RSD ($n = 6$)
Galaxolide	0.0937 \pm 0.0240	26
Tonalide	0.0311 \pm 0.0068	22
Oxybenzone	0.3056 \pm 0.1156	38
4-MBC	0.0387 \pm 0.0080	21
Padimate-O	0.0399 \pm 0.0112	28
2-EHMC	0.0700 \pm 0.0225	32
Octocrylene	0.0453 \pm 0.0165	36

^a Values referred to the wet weight

Limits of detection and quantitation From homogenized fish muscle (4.0 \pm 0.2 g) spiked at different concentration: (1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 55, 70, 80 ng g⁻¹) were analyzed to determine the LOD and LOQ of each analyte considering signal-to-noise ratio (S/N) of 3 and 10, respectively.

Matrix effect It was evaluated by comparing the average relative response ($n = 3$) between standards in acetonitrile (0.2 μ g mL⁻¹) and extracts of a control trout spiked at 0.2 μ g mL⁻¹; all were evaporated, derivatized with MSTFA, and analyzed by GC-MS.

Uptake and elimination tracing

For the uptake experiment, ten rainbow trout (14.97 \pm 0.67 cm; 32.75 \pm 4.02 g) were exposed for 4 days in 70 L of spiked water at 100 μ g L⁻¹. The in vivo SPME sampling of three random fish was carried out at 24, 48, 72, and 96 h and extracts were analyzed as described previously (Sect. “In vivo SPME analysis”). After sampling, each fish was returned to the aquarium to continue with the uptake experiment.

For the elimination experiment, five trout (12.10 \pm 1.17 cm; 17.74 \pm 7.58 g) were exposed for 5 days in 70 L of spiked water at 100 μ g L⁻¹. At the end of the 5-days exposure, the initial concentration of the analytes in fish muscle was obtained by

Table 2 Validation results for in vitro SPME

Compound	Linearity ^a	r^2	Repeatability RSD ($n = 6$)	LOD (ng g ⁻¹) ^b	LOQ (ng g ⁻¹) ^b
Galaxolide	$y = 0.0116 (\pm 0.0011)x + 0.4397 (\pm 0.1030)$	0.9921	35	15	40
Tonalide	$y = 0.0088 (\pm 0.0005)x + 0.0515 (\pm 0.0465)$	0.9923	29	20	55
Oxybenzone	$y = 0.0318 (\pm 0.0019)x + 0.2163 (\pm 0.1536)$	0.9985	19	5	15
4-MBC	$y = 0.0101 (\pm 0.0009)x + 0.2275 (\pm 0.0726)$	0.9945	27	2	5
Padimate-O	$y = 0.0128 (\pm 0.0011)x + 0.1022 (\pm 0.0912)$	0.9975	24	10	30
2-EHMC	$y = 0.0165 (\pm 0.0012)x + 0.2608 (\pm 0.1031)$	0.9928	27	5	15
Octocrylene	$y = 0.0129 (\pm 0.0013)x + 0.4279 (\pm 0.1049)$	0.9883	11	25	70

^a R_s in vitro is the slope of the linearity equation presented; it is expressed in mg min⁻¹^b Values referred to the wet weight**Table 3** Results for matrix effect experiment

Compound	Average relative area	
	Standard in acetonitrile	Spiked blank extract
Galaxolide	0.35 \pm 0.05	0.34 \pm 0.08
Tonalide	0.42 \pm 0.06	0.38 \pm 0.05
4-MBC	0.46 \pm 0.02	0.45 \pm 0.03
Oxybenzone-TMS	1.85 \pm 0.04	1.90 \pm 0.11
Padimate-O	2.51 \pm 0.07	2.43 \pm 0.15
2-EHMC	2.46 \pm 0.05	2.43 \pm 0.20
Octocrylene	0.57 \pm 0.04	0.61 \pm 0.04

sampling three random fish (Sect. “In vivo SPME analysis”). Then trout were transferred to an aquarium with 70 L of dechlorinated drinking water for elimination tracing; every day 50 L of drinking water was renewed. The sampling of three random trout was performed at 24, 48, and 96 h, and extracts were analyzed as described previously (Sect. “In vivo SPME analysis”). After sampling, each fish was returned to the aquarium to continue with the elimination experiment.

Results and discussion

In vivo extraction time profile

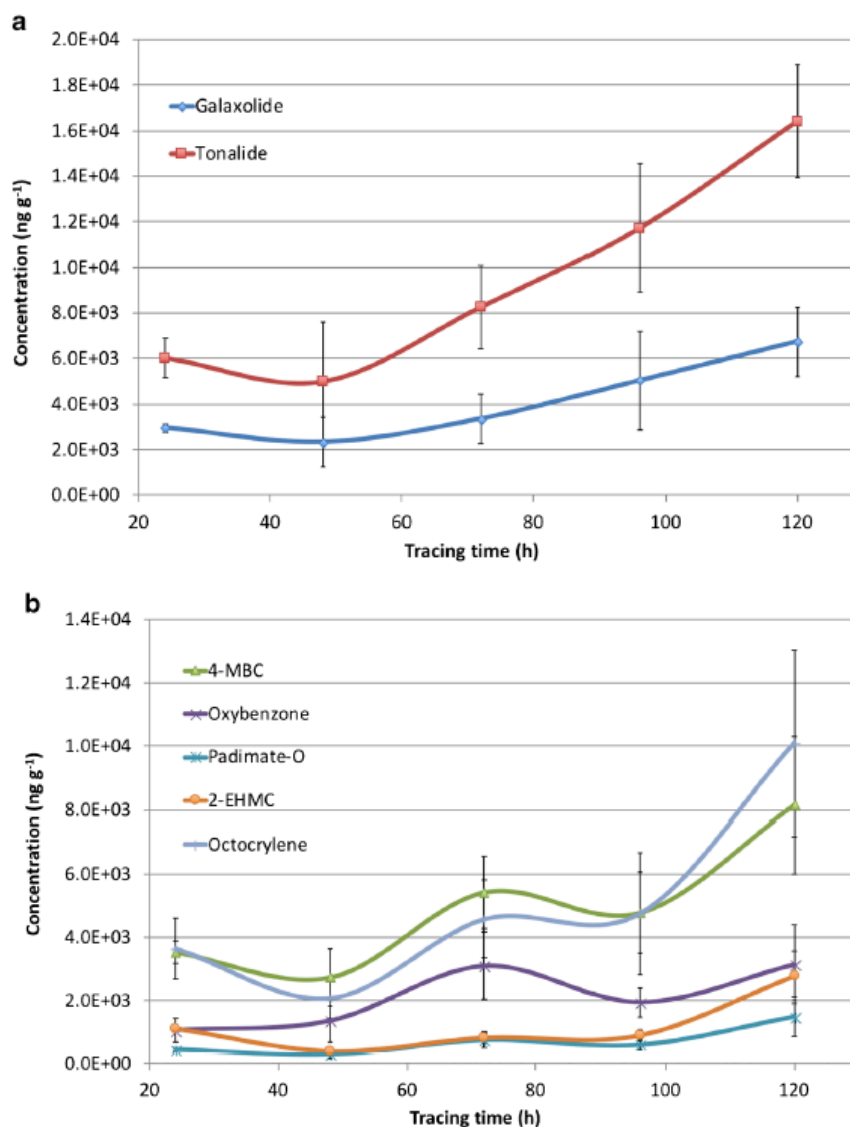
In order to determine which calibration was more suitable for the in vivo analysis, in vitro and in vivo R_s constants were calculated. To compare both values it was necessary to perform the experiments under the same conditions, including extraction time. As shown in Fig. 2, the time required for each analyte to achieve equilibrium was about 45 min; with in vitro experiments, the equilibrium was not reached even after 55 min (ESM, Fig. S1), showing that the kinetic

calibration approach is more suitable than equilibrium. This difference could be explained because in real samples the analytes can be present in several forms (conjugated with matrix substances or bound to the organic or inorganic constituents of the matrix) in a completely different way than that of the free analyte in the spiked sample [29]. Although the extraction time profiles in vivo and in vitro were different, in both cases, 20 min was selected for the extraction time because it is in the kinetic range; then the predetermined sampling rate calibration could be used. A short extraction time minimizes stress and handling of the fish.

In vivo calibration

In vivo R_s values of the target analytes were 0.0311–0.3056 mg min^{-1} (Table 1). The highest R_s value was for oxybenzone, the most polar analyte. Although galaxolide and tonalide are structural isomers their R_s values are different, probably because they have different functional groups in their structure; galaxolide has a cyclic ether and tonalide has an aromatic ketone (ESM, Table S1). In vivo R_s values were higher than those in vitro (Table 2), possibly because of physiological functions in living organisms. These results were in agreement with previously reported R_s values for musks in

Fig. 3 Uptake tracing of rainbow trout muscle using in vivo SPME for (a) musks and (b) UV filters, $n=3$



Tilapia [18]. As a result of the differences between in vivo and in vitro R_s values, the in vivo sampling rates were applied for the calculations of uptake and elimination tests.

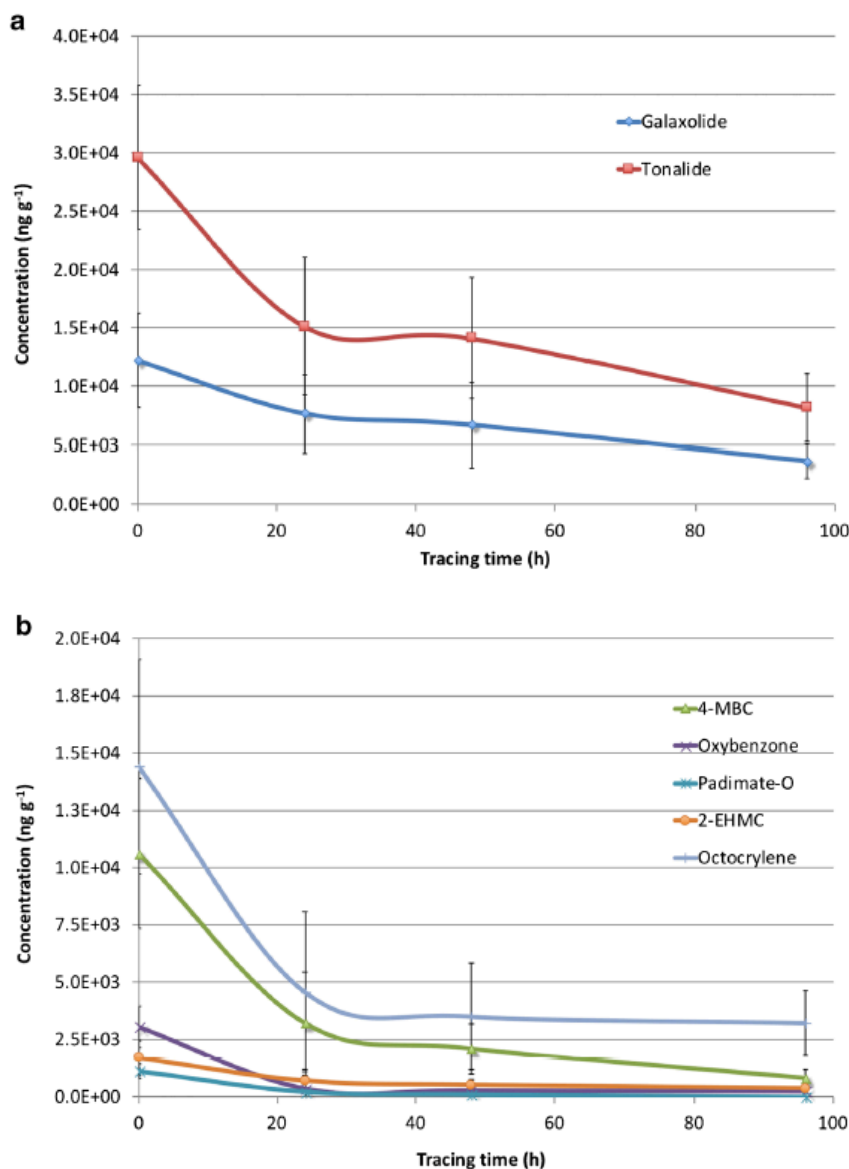
In vitro extraction time profile and validation

Results showed that the R_s values of the analytes were from 0.0088 to 0.0318 mg min^{-1} (Table 2) and can be used to quantify concentrations up to 7 $\mu\text{g g}^{-1}$. The values of R_s were similar between the compounds except for oxybenzone,

which is the most polar analyte because it has a hydroxyl group within its structure.

Results of interday repeatability of the in vitro SPME method are listed in Table 2. Satisfactory repeatability was obtained; the RSDs range between 10.74% and 35.50%. The greater RSD values were for musks (galaxolide and tonalide), the most volatile compounds. As can be seen in Table 2, LOD values ranged from 0.002 to 0.025 $\mu\text{g g}^{-1}$ and LOQ values from 0.005 to 0.070 $\mu\text{g g}^{-1}$ for all analytes, which demonstrated the high sensitivity of the proposed methodology.

Fig. 4 Elimination tracing of rainbow trout muscle using in vivo SPME for (a) musks and (b) UV filters, $n = 3$



Matrix effect

The matrix effect is the combined effect on the analyte's response caused by all components in the sample; these components can interfere with the ionization process in the mass spectrometer causing suppression or enhancement of the analytical response. Matrix effects have long been associated with bioanalytical techniques because of the complexity of the matrix [27]. In this methodology, the use of the SPME C₁₈ fiber excludes matrix-derived large biomolecules while allowing small molecules to penetrate and be adsorbed onto the embedded particles, thereby reducing matrix interference. To evaluate the matrix effect, the relative areas of the standards in acetonitrile and spiked control trout extracts were compared; even though the absolute areas of the analytes were between 30% and 40% higher for spiked control trout extracts than standards, this effect was corrected by the internal standard resulting in no significant difference ($\alpha = 0.05$) between relative areas of standards and the spiked control trout extracts (Table 3).

Uptake and elimination

In the uptake experiment, the concentration of the analytes in fish muscles rapidly increased from the first to the fourth day and did not reach equilibrium (Fig. 3). The experiment finished at the fourth day because the fish health was affected by the irritating properties of the analytes; the trout showed layers of mucus accumulated on the skin and gills, and these symptoms are normally present in fish stressed by adverse environmental conditions and handling [30]. Absorption of the com-

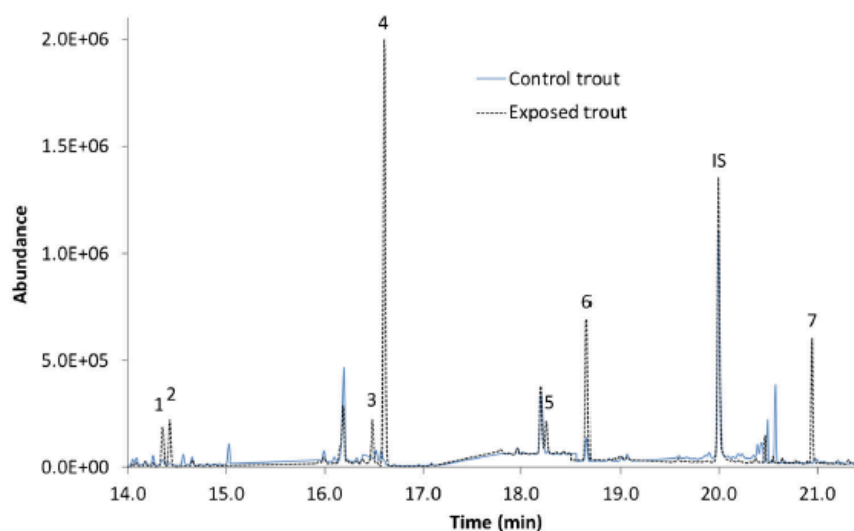
pounds depends on their physicochemical properties and on the physiology of the fish; in this study the absorption of almost all PCPs was similar, except for tonalide and

padimate-O; the former was the most absorbed perhaps owing to its high water solubility and the latter compound was the least absorbed, probably because the tertiary amine group in its chemical structure.

The elimination of the compounds was a two-step process, with an initial rapid decrease rate and then a slow decreasing rate (Fig. 4). In the first 24 h (first step), the concentrations of target compounds decreased rapidly, maybe caused by permeation through gills and skin as well as excretion; after 24 h (second step) the concentration decreased slowly. It was remarkable that even after 96 h, the residues of PCPs (except padimate-O) were detected: 4-MBC $0.81 \pm 0.39 \mu\text{g g}^{-1}$, oxybenzone $0.27 \pm 0.09 \mu\text{g g}^{-1}$, 2-EHMC $0.39 \pm 0.06 \mu\text{g g}^{-1}$, octocrylene $3.22 \pm 1.38 \mu\text{g g}^{-1}$, galaxolide $3.72 \pm 1.45 \mu\text{g g}^{-1}$, and the concentration of tonalide was as high as $8.21 \pm 2.88 \mu\text{g g}^{-1}$, indicating that UV filters (especially octocrylene) and musks were difficult to eliminate completely and highlighting the bioaccumulation potential of the analytes.

The chromatogram of the control trout analysis (Fig. 5) showed minimal interferences at the retention times of the target analytes; special care was taken in sample handling and glassware cleanup to avoid contamination problems which have been reported frequently because of the ubiquitous use of PCPs [7, 31]. To minimize the interferences, the glassware used was rinsed with methanol, then washed with liquid alkaline phosphate-free detergent and heated at 550 °C for 1 h. Figure 5 also illustrates the analysis of exposed trout (5 days); it is observed that there is not any component co-eluting with the analytes studied; additionally the macromolecules such as proteins and lipids were not extracted because of the biocompatible nature of the C₁₈ fiber coating which reduces their binding. This helped to avoid further cleanup of the extract.

Fig. 5 Analysis of a control trout and a trout exposed for 5 days ($100 \mu\text{g L}^{-1}$ of each analyte) using in vivo SPME-GC-MS in selected ion recording mode. Peak identification: 1. Galaxolide, 2. Tonalide, 3. 4-MBC, 4. Oxybenzone-TMS, 5. Padimate-O, 6. 2-EHMC, 7. Octocrylene; IS. B[a]A



Conclusions

A sensitive, precise, and simple in vivo SPME-GC-MS method was developed for the simultaneous identification and quantitation of UV filters and musks in fish. This procedure has several advantages, such as simplicity and it is miniaturized, environmentally friendly, and mainly non-lethal.

Method applicability was demonstrated in the uptake and elimination tracing of target analytes in living fish. The bioaccumulative behavior varied according analyte properties; the most absorbed analyte was tonalide and the least was padimate-O. As far as we know, this is the first time that UV filters were determined with in vivo SPME, and further studies exploring this technique with other groups of contaminants could be useful in environmental monitoring to diminish fish death. Moreover, because of its simple operation, in vivo SPME is promising for use in on-site analysis, to detect contaminant residues in food products before harvesting and real-time analysis of biological samples.

Acknowledgements This work was supported by Dirección General de Asuntos del Personal Académico from the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) [grant PAPIIT: IN 218116] and Faculty of Chemistry [grant PAIP: 5000-9026]. The authors want to thank Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the doctoral scholarship awarded to Iran Ocaña-Rios (scholar number 273473). The authors also want to thank Mr. Pascual Sánchez Ramírez for providing the trout, Rocío Juárez Cipres for technical support and Perkin Elmer de México S.A. for instrumental GC-MS support.

Compliance with ethical standards

All animal experimental procedures were approved by the Bioethic Committee for Animal Health (CICUAL, Faculty of Chemistry, UNAM).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Anca Caliman F, Gavrilescu M. Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment – a review. *Clean*. 2009;37:277–303. <https://doi.org/10.1002/clean.200900038>.
- Birkholz DA, Stilson SM, Elliott HS. Analysis of emerging contaminants in drinking water. In: Ahuja S, editor. *Comprehensive water quality and purification*, volume 2. Elsevier; 2014, pp. 212–229. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382182-9.00035-9>.
- Witorsch RJ, Thomas JA. Personal care products and endocrine disruption: a critical review of the literature. *Crit Rev Toxicol*. 2010;40:1–30. <https://doi.org/10.3109/10408444.2010.515563>.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Bioaccumulation in fish: aqueous and dietary exposure. In: *Guidelines for testing of chemicals*. OECD, 2011. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-305-bioaccumulation-in-fish-aqueous-and-dietary-exposure_9789264185296-en;jsessionid=IsLXSzXJym_hQV0QxkK0ldW3.ip-10-240-5-188. Accessed 12 May 2018.
- Gagnon MM, Hodson PV. Field studies using fish biomarkers – how many fish are enough? *Mar Pollut Bull*. 2012;64:2871–6. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.08.016>.
- Núñez M, Borrull F, Pocurull E, Fontanals N. Sample treatment for the determination of emerging organic contaminants in aquatic organisms. *Trends Anal Chem*. 2017;97:136–45. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.007>.
- Meinerling M, Daniels M. A validated method for the determination of traces of UV filters in fish using LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*. 2006;386:1465–73. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0706-9>.
- Gatermann R, Hellou J, Hühnerfuss H, Rimkus G, Zitko V. Polycyclic and nitro musks in the environment: a comparison between Canadian and European aquatic biota. *Chemosphere*. 1999;38:3431–41. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00564-5](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00564-5).
- Mottaleb MA, Usenko S, O'Donnell JG, Ramirez AJ, Brooks BW, Chambliss CK. Gas chromatography–mass spectrometry screening methods for select UV filters, synthetic musks, alkylphenols, an antimicrobial agent, and an insect repellent in fish. *J Chromatogr A*. 2009;1216:815–23. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.072>.
- Draisci R, Marchiafava C, Ferretti E, Palleschi L, Catellani G, Anastasio A. Evaluation of musk contamination of freshwater fish in Italy by accelerated solvent extraction and gas chromatography with mass spectrometric detection. *J Chromatogr A*. 1998;814:187–97.
- Gago-Ferreto P, Diaz-Cruz MS, Barceló D. Multi-residue method for trace level determination of UV filters in fish based on pressurized liquid extraction and liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2013;1286:93–101. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.02.056>.
- Negreira N, Rodríguez I, Rodil R, Rubí E, Cela R. Optimization of matrix solid-phase dispersion conditions for UV filters determination in biota samples. *Intern J Environ Anal Chem*. 2013;93:1174–88. <https://doi.org/10.1080/03067319.2012.702277>.
- Saraiva M, Cavalheiro J, Lancelour L, Monperrus M. Synthetic musk in seafood products from South Europe using a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method. *Food Chem*. 2016;200:330–5. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.017>.
- Xu J, Chen G, Huang S, Qiu J, Jiang R, Zhu F, et al. Application of in vivo solid-phase microextraction in environmental analysis. *Trends Anal Chem*. 2016;85:26–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.003>.
- Wang S, Oakes KD, Bragg LM, Pawliszyn J, Dixon G, Servos MR. Validation and use of in vivo solid phase micro-extraction (SPME) for the detection of emerging contaminants in fish. *Chemosphere*. 2011;85:1472–80. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.08.035>.
- Ouyang G, Oakes KD, Bragg L, Wang S, Liu H, Cui S, et al. Sampling-rate calibration for rapid and nonlethal monitoring of organic contaminants in fish muscle by solid-phase microextraction. *Environ Sci Technol*. 2011;45:7792–8. <https://doi.org/10.1021/es201709j>.
- Huang S, Xu J, Wu J, Hong H, Chen G, Jiang R, et al. Rapid detection of five anesthetics in tilapias by in vivo solid phase microextraction coupling with gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*. 2017;168:263–8. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.045>.
- Chen G, Jiang R, Qiu J, Cai S, Zhu F, Ouyang G. Environmental fates of synthetic musks in animal and plant: an in vivo study. *Chemosphere*. 2015;138:584–91. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.07.003>.
- Allan IJ, Bæk K, Haugen TO, Hawley KL, Høgfjeldt AS, Lillicrap AD. In vivo passive sampling of nonpolar contaminants in brown trout (*Salmo trutta*). *Environ Sci Technol*. 2013;47:11660–7. <https://doi.org/10.1021/es401810r>.

20. Vuckovic D, Shirey R, Chen Y, Sidisky L, Aurand C, Stenerson K, et al. In vitro evaluation of new biocompatible coatings for solid-phase microextraction: implications for drug analysis and in vivo sampling applications. *Anal Chim Acta*. 2009;638:175–85. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.02.049>.
21. Zhang X, Oakes KD, Hoque ME, Luong D, Taheri-Nia S, Lee C, et al. Depth-profiling of environmental pharmaceuticals in biological tissue by solid-phase microextraction. *Anal Chem*. 2012;84:6956–62. <https://doi.org/10.1021/ac3004659>.
22. Zhang X, Oakes KD, Wang S, Cui S, Pawliszyn J, Metcalfe CD, et al. In vivo sampling of environmental organic contaminants in fish by solid-phase microextraction. *Trends Anal Chem*. 2012;32:31–9.
23. Ouyang G, Vuckovic D, Pawliszyn J. Nondestructive sampling of living systems using in vivo solid-phase microextraction. *Chem Rev*. 2011;111:2784–814. <https://doi.org/10.1021/cr100203t>.
24. Bai Z, Pilote A, Sarker PK, Vandenberg G, Pawliszyn J. In vivo solid-phase microextraction with in vitro calibration: determination of off-flavor components in live fish. *Anal Chem*. 2013;85:2328–32. <https://doi.org/10.1021/ac3033245>.
25. Xu J, Luo J, Ruan J, Zhu F, Luan T, Liu H, et al. In vivo tracing uptake and elimination of organic pesticides in fish muscle. *Environ Sci Technol*. 2014;48:8012–20. <https://doi.org/10.1021/es5009032>.
26. Ocaña-Ríos I, Peña-Alvarez A, Loeza-Fuentes E, Zúñiga-Pérez I. Determination of personal care products in fish tissue based on matrix solid-phase dispersion combined with programmable split/splitless injector gas chromatography-mass spectrometry. *Food Anal Methods*. 2018;11:2272–9. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1206-1>.
27. Akutsu K, Yoshimitsu M, Kitagawa Y, Takatori S, Fukui N, Osakada M, et al. Evaluation of the matrix-like effect in multiresidue pesticide analysis by gas chromatography with tandem mass spectrometry. *J Sep Sci*. 2017;40:1293–300. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600942>.
28. American Society for Testing and Materials. Standard guide for conducting bioconcentration tests with fishes and saltwater bivalve mollusks (E 1022–94). ASTM. 1994 https://www.arpae.it/cms3/documenti/_cerca_doc/ecotossicologia/ASTM_E_1022_bioconcentrazione.pdf. Accessed 01 Feb 2019.
29. Michael C, Bayona JM, Lambropoulou D, Agüera A, Fatta-Kassinos D. Two important limitations relating to the spiking of environmental samples with contaminants of emerging concern: how close to the real analyte concentrations are the reported recovered values? *Environ Sci Pollut Res*. 2017;24:15202–5. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9154-7>.
30. Shepard KL. Functions for fish mucus. *Rev Fish Biol Fish*. 1994;4:401–29. <https://doi.org/10.1007/BF00042888>.
31. Peck AM. Analytical methods for the determination of persistent ingredients of personal care products in environmental matrices. *Anal Bioanal Chem*. 2006;386:907–39. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0728-3>.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.