



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE BLOQUEADORES SOLARES PRESENTES EN
AGUAS DE RIEGO DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN Y SU POSIBLE
MIGRACIÓN EN HORTALIZAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

KAREN PATRICIA VILLASEÑOR VÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS

DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES

Ciudad Universitaria, CD.MX. 2019.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROFESOR: JOSÉ GUILLERMO DE JESÚS AGUILAR OSORIO

VOCAL: PROFESOR: ARGELIA SÁNCHEZ CHINCHILLAS

SECRETARIO: PROFESOR: SERGIO RODRÍGUEZ MORALES

1ER. SUPLENTE: PROFESOR: ALLAN NOÉ DOMÍNGUEZ ROMERO

2º SUPLENTE: PROFESOR: TANIA GÓMEZ SIERRA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIDAD DE QUÍMICA EN SISAL, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM Y UNIDAD DE QUÍMICA, C.I.C.T.A.T, UJAT.

ASESOR DEL TEMA: DR. SERGIO RODRÍGUEZ MORALES

SUPERVISOR TÉCNICO: DR. MIGUEL VILCHIS REYES

SUSTENTANTE: KAREN PATRICIA VILLASEÑOR VÁZQUEZ

Tabla de contenido

1. Resumen.....	5
2. Antecedentes.....	9
2.1 Características del suelo de la Península de Yucatán.....	9
2.2 Contaminación de ecosistemas acuáticos.....	12
2.3 Desarrollo de filtros solares.....	15
2.4 Filtros solares en el medio ambiente.....	22
2.5 Metodologías analíticas para determinación y cuantificación de contaminantes emergentes.....	26
2.6 Compuestos Disruptores Endocrinos.....	31
2.7 <i>Danio rerio</i>	38
3. Objetivos.....	41
3.1 Objetivo general.....	41
3.2 Objetivos particulares.....	41
4. Metodología (Diagrama General de Trabajo).....	44
Etapa I. Validación del método analítico.....	45
Etapa II. Análisis de muestras por CLAR.....	53
Etapa III. Análisis de muestras por CL-EMAR.....	53
Etapa IV. Estudios de ecotoxicidad en pez cebr.....	56
Etapa V. Análisis no dirigido para la determinación de otros contaminantes.....	58
5. Resultados y Discusión	63
Etapa I. Validación del método analítico.....	63
Etapa II. Análisis de muestras por CLAR.....	68
Etapa III. Análisis de muestras por CL-EMAR.....	71
Etapa IV. Estudios de ecotoxicidad en pez cebr.....	81
Etapa V. Análisis no dirigido para la determinación de otros contaminantes.....	82

6. Conclusiones.....	88
7. Perspectivas.....	89
8. Referencias Bibliográficas.....	90
9. Anexo I (Figuras).....	109

Lista de abreviaturas

Log Kow: coeficiente de partición octanol/agua.

CLAR: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

CL-EMAR: Cromatografía de Líquidos Acoplada a Masas de Alta Resolución.

%RSD: Porcentaje de desviación estándar relativa.

ESI: Ionización por Electrospray o electropulverización de corriente de chorro. La ionización se genera por la aplicación de un gas de nebulización (N₂) y gas de secado (nitrógeno caliente).

ESI+: Electrospray o electropulverización de corriente de chorro operado en modo positivo, mediante aplicación de un ácido.

ESI-: Electrospray o electropulverización de corriente de chorro operado en modo negativo, mediante aplicación de una base.

TIC: Total Ion Chromatogram, en inglés. En español, Cromatograma Iones Totales. En muestras complejas, un pico (TIC) suele estar formado por varios compuestos no resueltos.

EIC: Extracted Ion Chromatogram, en inglés. En español, Cromatograma Extracción de Iones. En este tipo de cromatograma se deconvoluciona y extrae los compuestos individuales y sus espectros.

PM: Peso molecular de alta resolución

[M+H]⁺: Iones generados de una ionización positiva, iones protonados.

[M-H]⁻: Iones generados de una ionización negativa, iones desprotonados.

CDE: Compuesto Disruptor Endócrino

hpf: horas después de la fertilización

dpf: días después de la fertilización

1. Resumen

Los contaminantes ambientales representan un riesgo significativo para los ecosistemas acuáticos y la salud humana. Estos contaminantes incluyen compuestos sintéticos y naturales, así como sus productos de transformación que se forman en el medio ambiente o durante el tratamiento de aguas residuales. Además de esto, muchos trabajos han reportado la presencia de nuevos compuestos en ambientes acuáticos, llamados contaminantes emergentes, EC (Deblondea, Cossu-Leguilleb, & Hartemann, 2011). Los "Contaminantes emergentes" abarcan un grupo diverso de compuestos, incluidos pesticidas, plastificantes, compuestos disruptores endocrinos (CDE), productos farmacéuticos y de cuidado personal, entre otros.

Ante la dinámica del acuífero subterráneo característico de la península de Yucatán; generado por la roca kárstica que constituye el suelo, esta región de la República Mexicana es muy susceptible a ser contaminada por diversos contaminantes emergentes, entre ellos los filtros solares. Los filtros solares presentan una alta incidencia debido al uso en la península; la población los utiliza para protegerse de los efectos dañinos de los rayos UVA y UVB en la piel. Sin embargo, se sugiere que estos compuestos llegan al acuífero subterráneo directamente, a través de la realización de actividades acuáticas, como nadar y bañarse en cenotes (cuerpos acuáticos que están interconectados con el acuífero subterráneo, a través de fracturas o uniones).

Otro contaminante importante para la península de Yucatán son los pesticidas, un grupo de compuestos bien conocido debido a su uso como control de plagas en la agricultura para tratar los cultivos antes y después de las cosechas (LeDoux, 2011) aunado a lo anterior y a la creciente actividad ganadera en la región, también es posible encontrar hormonas, vacunas o medicamentos. Todos estos contaminantes pueden llegar al acuífero subterráneo, indirectamente, a través de la descarga de plantas de tratamiento de aguas

residuales, o bien, por la descarga de residuos provenientes de la industria ganadera y de la agricultura. (Gago Ferrero, Díaz Cruz, & Barceló, 2012).

Ante lo anterior, la principal preocupación que surge es que, si existe una contaminación del acuífero subterráneo de la península de Yucatán, es muy probable que la población de la península esté enfrentando un riesgo a nivel alimentario, debido a que, del acuífero subterráneo de la península, se extrae del subsuelo mediante perforación de pozos 10% del agua para consumo humano y 90% del agua destinada al riego.

Como el ambiente acuático suele ser el último receptáculo para contaminantes orgánicos, muchos compuestos están presentes en abundancia en las aguas superficiales y los sedimentos. En la biota acuática, se observan regularmente efectos tóxicos, principalmente a nivel hormonal, por compuestos denominados disruptores endocrinos, debido a la bioacumulación de estos compuestos en los tejidos musculares a lo largo de la cadena alimenticia. Sin embargo, entre la gran cantidad de contaminantes orgánicos, solo unos pocos han sido investigados, tal es el caso de los filtros solares, compuestos orgánicos lipófilos, que tienen un $\log K_{ow}$ entre 4 y 8, y por su relativa resistencia a la degradación biológica, los filtros UV tienden a bioacumularse en los tejidos grasos y bioamplificarse a través de la cadena alimenticia (Díaz-Cruz & Barceló, 2009), reportando concentraciones máximas que alcanzan miligramos por kilogramo en organismos filtradores (mejillones y almejas) (Bachelot, Li, Munaron & Poiger, 2005; Balmer, Buser, Müller, & Poiger, 2005; Buser, Balmer, Schmid, & Kohler, 2006; Gago Ferrero P, 2013; Alonso, y otros, 2015).

Algunos efectos disruptores reportados en peces son: feminización, vitelo génesis, alteración del rendimiento conductivo, alteración de la función tiroidea, disminución de la fertilidad (U.S. EPA 1997), reducción en el tamaño gonadal, maduración sexual retardada y expresión reducida de características

sexuales. Por otro lado, en humanos se ha reportado cáncer de mama, testicular y prostático, disminución de la calidad y recuento del semen, frecuencia aumentada de la incidencia de ovarios poliquísticos en mujeres, endometriosis, alteración del desarrollo físico y mental (IEH 1995; Colborn, Dumanoski, & Myers, 1996; U.S EPA 1997; Foster, 2001), las alteraciones más sutiles del sistema endocrino pueden dar como resultado cambios en el crecimiento, el desarrollo o el comportamiento, que pueden afectar al organismo mismo o a la próxima generación (Guillette, Arnold, & McLachlan, 1996; Palanza, Morellini, Parmigiani, & vom Saal, 1999).

La falta de información sobre el efecto de los compuestos disruptores endócrinos dados por filtros solares, es una preocupación en la actualidad. Por este motivo, otra propuesta de este estudio es evaluar concentraciones nominales de filtros solares encontrados en agua de riego y hortalizas en el pez cebra, para determinar los posibles efectos disruptores o letales de estos compuestos. La utilización de esta especie, como organismo para efectuar bioensayos es común, debido a que, según lo reportado en la literatura, el pez cebra (*Danio rerio*) ha surgido como un modelo animal alternativo prometedor para detectar la teratogenicidad en la evaluación preclínica de la toxicidad del desarrollo, porque es más barato y rápido, en comparación con las pruebas con mamíferos. Además, este modelo permite la monitorización continua del desarrollo de un organismo completo desde la embriogénesis temprana hasta la eclosión, por lo tanto, la realización de este bioensayo nos proporcionará indicios sobre una alteración al ecosistema y posibles efectos adversos en el desarrollo fetal o embrionario. (Rojas-Muñoz, Bernad-Miana, & Izpisua-Belmonte, 2007)

En resumen, en el presente trabajo, se desarrolló una estrategia analítica para identificar y cuantificar seis compuestos químicos presentes en bloqueadores solares comerciales (3-benzofenona (BP3), homosalato (HMS), octilmetoxicinamato (OMC), avobenzona (AVO), octocrileno (OCT), 2-octil

salicilato/octisalato (OTS)) utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR en fase reversa), y para la identificación y cuantificación a nivel traza se empleó cromatografía de líquidos acoplada a un detector de masas de alta resolución (CL-EMAR) mediante un análisis dirigido. Adicionalmente, utilizando el poder analítico de la técnica CL-EMAR, se desarrolló un análisis no dirigido para detectar la presencia de contaminantes orgánicos, pesticidas, medicamentos, hormonas y vacunas. Para el análisis no dirigido fue necesario la creación de una biblioteca personalizada con 535 pesticidas para la búsqueda cualitativa automática de los contaminantes que pudieran estar presentes en las muestras.

Brevemente, resultado de esta tesis, se lograron cuantificar todos los filtros solares no ácidos (BP3, AVO, OCT y OMC de 9.27-55.61 $\mu\text{g}/\text{kg}$) en al menos una hortaliza de cada sitio y finalmente, se demostró la migración de filtros solares desde agua de riego hacia las hortalizas. Sin embargo, con el estudio de toxicidad en pez cebra, no se demostró que la migración de filtros solares represente un riesgo ambiental para la biota y consumidores de hortalizas, en el estado de Yucatán. Además, en cuanto al estudio no dirigido, para la búsqueda de otros contaminantes, como pesticidas y repelentes, se encontró el repelente dietiltoluamida (DEET) en muestras de arúgula (*Eruca versicaria*) de Montes Amé y arúgula y pepino sin cáscara de Timucuy. (Leo Nollet, 2004, Ramos, Homem, Alves & Santos, 2015).

2. Antecedentes

2.1 Características del suelo de la Península de Yucatán

Según lo reportado por (Millennium Ecosystem Assessment, 2005), el suelo, aporta diversos servicios ambientales a los ecosistemas. Por sus características, contribuye en los ciclos biogeoquímicos, debido a que las bacterias utilizan el suelo como sustrato para fijar nitrógeno atmosférico. Uno de los aportes más importantes al medio ambiente, es la disminución del efecto invernadero, ya que el suelo tiene la capacidad de capturar CO₂, acumulando carbono y reduciendo su liberación a la atmosfera (FAO, 2004). Por otro lado, el suelo tiene la capacidad de filtrar, desactivar o retener compuestos potencialmente tóxicos que pudieran llegar a aguas subterráneas o afectar las redes tróficas de los ecosistemas terrestres y acuáticos. También está relacionado con la regulación de inundaciones y regulación climática, debido a su capacidad para absorber y emitir calor.

Aunque los servicios ambientales que aporta son diversos, existen dos tipos de factores que pueden afectarlos directa o indirectamente, generando cambios en los ecosistemas y, por lo tanto, en la ecología, biodiversidad y bienestar humano:

1. Factores indirectos: demografía y población, economía (globalización y comercio), sociopolítica (gobierno, marco político, legal e institucional), ciencia y tecnología, estilo de vida cultural y religiosa (elecciones de consumo y creencias)
2. Factores directos: cambios en el uso de las tierras, introducción o captura de especies (por ejemplo: captura de peces), adaptación y uso de nuevas tecnologías, entradas externas (aplicación de fertilizantes y pesticidas y explotación del riego), cambio climático, cosecha y consumo de recursos, además, aspectos físicos y geológicos como la degradación del suelo o el tipo de material que lo conforma. (SEMARNAT y CP, 2003).

Derivado de los aspectos físicos y geológicos del suelo, el conocimiento sobre el suelo kárstico de la península de Yucatán, es vital para entender su comportamiento y repercusión en la permeabilidad y migración de contaminantes al subsuelo, ya que, junto con la degradación del suelo, ambos factores incrementan su permeabilidad ocasionando graves consecuencias en los diversos ecosistemas y en el bienestar humano.

Las áreas kársticas son regiones constituidas por rocas carbonatadas compactas y solubles por las cuales circula o fluye agua. El contenido en CaCO_3 (carbonato cálcico) de las rocas carbonatadas o calizas es el responsable de su solubilidad; las calizas muy puras, con porcentajes del orden del 96% de CaCO_3 , son muy solubles, por lo tanto, al entrar en contacto con el agua, generan la formación de acuíferos subterráneos por la disolución de la roca caliza (Pulido, A. 2007), y debido a la permeabilidad que esto genera, la península de Yucatán no posee ríos superficiales, provocando que la única forma de acceso de agua dulce sea por medio de agua subterránea, extraída mediante perforación de pozos.

Otro factor determinante en los fenómenos kársticos, es el clima, debido a que las regiones hidrogeológicas son unidades morfo tectónicas perfectamente definidas estructuralmente, sometidas a un clima determinado y con circulación subterránea específica (Llopis, 1970), por lo tanto, el clima al que se ven sometidas estas regiones altera la circulación de agua subterránea.

En general, las zonas con temperaturas bajas y lluviosas tienen elevada actividad de fenómenos kársticos y las zonas secas (inferiores a 200 mm), tienen escasa actividad. En la Fig 1 (ver Anexo I), se esquematiza el tipo de clima predominante en diferentes regiones de la península, observando que la zona norte, pegada a la región costera, presenta un clima semiseco muy cálido y, cálido, en cambio, la región central, presenta un clima cálido subhúmedo con lluvias en verano. De manera que, la región central es la región más

susceptible a sufrir fenómenos kársticos. Por otro lado, la precipitación anual varía de 760 mm a 1198 mm en la porción norte y de 1138 mm a 1440 mm en la porción sur. La mayor precipitación se produce en septiembre, con un promedio de 232 mm. La Península de Yucatán recibe en promedio $172\,158 \times 10^6$ m³ de agua de lluvia por año. La precipitación anual promedio aumenta desde el noroeste (500 mm) hacia el sureste (2000 mm) y alrededor del 85% de la precipitación es evapotranspirada (Schmitter, y otros, 2002), en la Fig 2 (ver Anexo I), se esquematiza la variación pluvial de la península. (INEGI, 2016).

Lo anterior se debe a que, dentro de los fenómenos kársticos, el agua es el elemento generador (elemento transitorio) y la caliza es el medio en que se desarrollan los fenómenos (elemento permanente), por lo tanto, la circulación de agua genera diversas transformaciones, principalmente disolución y erosión en las regiones calizas, debido a las diferentes características de circulación del agua en la caliza, por ejemplo, la erosión química por disolución de la caliza, que ocurre cuando el volumen de agua kárstica es pequeño y la circulación se realiza a lo largo de fisuras estrechas (Ek, 1968), se da principalmente por la acidez debida al CO₂ (agente disolvente de la caliza, aunque según lo reportado por (Pulido, A. 2007), el agua sin concentraciones de CO₂ disuelve 16 mg de CaCO₃/L a 16°C. Pero generalmente, el CO₂ se encuentra disuelto en el agua, generando H₂CO₃ (ácido carbónico), el cual acidifica el medio y actúa sobre la caliza (CaCO₃), superficie completamente insoluble, provocando la formación de Ca(HCO₃)₂, (bicarbonato cálcico) que es soluble en agua, provocando así, la disolución de la roca caliza.

Con lo anterior, se muestra la repercusión que tiene el contenido de CO₂ en la superficie kárstica, ya que al haber mayor contenido de CO₂ en el agua, habrá una mayor formación de H₂CO₃, acidificando el medio y, por lo tanto, provocando la disolución de la roca caliza, al generar bicarbonato cálcico (Ca(HCO₃)₂). Por otro lado, el agua que fluye a través de la roca caliza puede

tener presencia de ácidos orgánicos o húmicos (por desintegración bacteriana), lo cual acidifica aún más el medio y genera una mayor disolución de la caliza (Gaona-Vizcayno, Villasuso-Pino, & Anda, 1980).

En general, el agua filtrada fluye hasta llegar a una zona de rocas impermeables, por lo cual, se incorpora al flujo de agua subterránea, disolviendo la caliza y desembocando, posteriormente en un cuerpo de agua subterráneo, o bien, a los pozos para abasto humano o riego. (Montoriol, 1954; Llopis, 1970). La presencia de estas zonas de absorción, provoca que contaminantes presentes en el flujo pluvial o bien, del deshecho de residuos industriales como hormonas y vacunas de granjas porcinas o pesticidas de invernaderos, se incorporen al flujo de agua subterráneo, debido a la nula capacidad del suelo kárstico de filtrar, desactivar o retener compuestos potencialmente tóxicos que pudieran llegar a aguas subterráneas o afectar las redes tróficas de los ecosistemas terrestres y acuáticos, ocasionando una contaminación del agua subterránea. Es importante recalcar que el tratamiento de aguas residuales en la región está mal implementado. Normalmente, las aguas residuales se reinyectan en el acuífero (Marín, Steinich, Pacheco, & Escolero, 2000), por lo tanto, todos estos contaminantes (hormonas, medicamentos, vacunas, desechos industriales, entre muchos otros) se incorporan al flujo subterráneo de agua.

2.2 Contaminación de ecosistemas acuáticos

El Estado de Yucatán ha tenido una creciente actividad turística, debida a las zonas arqueológicas, pueblos mágicos, gastronomía y cultura, y principalmente por su gran riqueza natural con la infinidad de cenotes y humedales que posee. La mayoría de los visitantes que llegan a la península de Yucatán, visitan los diferentes cenotes y humedales ubicados alrededor de la región, generando con esto una gran susceptibilidad a la contaminación de estos ecosistemas, por la descarga de compuestos químicos provenientes de

productos para el cuidado personal. Uno de los más importantes, debido a que tanto los visitantes como los habitantes los utilizan con frecuencia para protegerse de la radiación solar, son los filtros solares, los cuales se descargan en estos sitios mediante la realización de actividades acuáticas.

Los cenotes son los ecosistemas acuáticos más peculiares de la Península de Yucatán, los cuales se forman por la disolución de la roca carbonatada en la plataforma kárstica de la península (Schmitter J, y otros, 2002), la disolución ocurre desde arriba, por infiltración pluvial y desde abajo por circulación subterránea. Según reportes del INEGI, 2016, en el estado hay cerca de 1000 cenotes ubicados alrededor de la península.

Muchos de estos cenotes, se encuentran ubicados al norte de la Península, ubicados a lo largo de un semicírculo, conocido como el Anillo de Cenotes, que se centra en Chicxulub (un pueblo en la costa norte, al este de Progreso) (Marín, 1990). Se ha propuesto que esta distribución de cenotes está asociada con el cráter de impacto de Chicxulub (Sharpton, y otros, 1993) lo que provoca que esta zona actúe como un río subterráneo o un canal de aguas subterráneas (Marín, 1990; Perry, Marín E, McClain, & Velazquez, 1995; Steinich & Marín, 1996), por lo que el agua de estos cenotes está bien interconectada con el agua subterránea a través de fracturas y características de disolución, y su tiempo de residencia es corto, ya que se lleva a cabo un recambio constante.

Por otro lado, con base en la edad de los cenotes, se distinguen dos tipos de cenotes: cenotes lénticos y lóticos. Se sugiere que los cenotes lénticos (antiguos) se alimentan principalmente de un flujo a bajas velocidades del agua subterránea, la capa de agua superficial es alcalina, sobresaturada con oxígeno, mientras que el agua cerca del fondo es ácida, desprovista de O_2 y con H_2S , lo que genera una mayor disolución de la roca caliza. Además, hay un gradiente de pH a lo largo de la columna de agua. Este tipo de cenotes aumentan fácilmente su estado trófico, ya que contienen aguas ricas en

nutrientes favoreciendo la producción de grandes cantidades de materia orgánica, el proceso trae consigo un aumento en el pH, la turbidez, la concentración de oxígeno disuelto en la superficie y las condiciones anóxicas y ácidas en la parte inferior del cenote (Schmitter, y otros, 2002).

Por otro lado, los cenotes lóticos (jóvenes) son alimentados principalmente por el agua subterránea que fluye a través de las cavidades de fractura y disolución, tienen un flujo de agua continuo (1–3 cm/s), por lo que su tiempo de residencia es corto y, por lo tanto, tienen aguas claras, fondos limpios, arenosos o rocosos, y una columna de agua homogénea y bien oxigenada. El pH también es homogéneo, generalmente con valores ácidos (<7). La concentración de nutrientes en los cenotes lóticos es más baja que en los lénticos, debido a la diferencia en la tasa de rotación, pero las aguas ricas en nutrientes del fondo se llevan a la superficie, donde nuevamente están disponibles para los organismos productores primarios. Su producción fotosintética es baja, debido a la disponibilidad limitada de nitrógeno y fósforo (Schmitter, y otros, 2002)

La alcalinidad fluctúa ampliamente en ambos tipos de cenotes, debido a la entrada variable de agua meteórica, rica en carbonatos y bicarbonatos (hasta 696 mg/L CaCO₃), y al agua de lluvia, que disminuye la concentración de estos iones por dilución y por neutralización con ácidos húmicos y taninos del manglar (Navarro-Mendoza, 1988; Alcocer, Lugo, Marín & Escobar, 1998).

Con lo anterior, se enfatiza en las diferentes características de los cenotes, principalmente en su velocidad de flujo del agua subterránea, es decir, por una parte, los cenotes antiguos tienen un flujo a bajas velocidades, por lo tanto, los contaminantes (filtros solares, principalmente) que pudieran estar presentes en este tipo de cenotes, no fluyen rápidamente y por lo tanto, quedan más tiempo retenidos en el agua del cenote, además tienen mayor potencial redox, por el contenido de oxígeno y una mayor actividad biológica

por el contenido de nutrientes que poseen. Por otro lado, los cenotes jóvenes si tienen un flujo continuo y rápido del agua subterránea, por lo tanto, los posibles contaminantes que pudieran estar presentes en sus aguas, fluyen rápidamente y no se quedan por mucho tiempo retenidos dentro del agua del cenote, sino que se incorporan rápidamente al flujo de agua subterránea, circulando, así, por las diversas fracturas y uniones dentro de la península y pudiendo, de esta manera, llegar a pozos, de donde se extrae agua ya sea para riego o para consumo humano.

Por lo tanto, la principal preocupación y en la cual se basa esta investigación, debido al riesgo alimentario que representa, es la llegada de contaminantes a los invernaderos que utilizan agua de pozos para el riego de sus hortalizas, ya que, dentro de la península de Yucatán, el flujo de agua dulce es el único recurso disponible para el uso humano, la cual es extraída del manto freático para consumo humano (10%) y para riego (90%) mediante perforación de pozos. En la península de Yucatán hay alrededor de 1,068 tomas de agua en operación en fuente de abastecimiento tipo pozo, siendo ésta, la principal forma de obtención de agua dulce para la población Yucateca (INEGI, 2016).

De manera que, al haber contaminación de cenotes con diversos compuestos, pero principalmente con filtros solares (por el alto uso de estos compuestos en la región Yucateca), es muy probable que estos compuestos circulen por medio del agua subterránea, llegando a pozos de riego y, por lo tanto, es muy posible que esta contaminación, migre a las hortalizas que se cultivan en el estado, generando un riesgo alimentario.

2.3 Desarrollo de filtros solares

El sol es una fuente natural de radiaciones electromagnéticas que se caracterizan por su frecuencia y longitud de onda, al conjunto de todas ellas se le denomina espectro electromagnético (100-10⁶ nm) y en él se distinguen desde ondas de radio, microondas, infrarrojos, luz visible, luz ultravioleta,

rayos X, rayos gamma, entre otros. De todo el espectro electromagnético sólo los infrarrojos (> 760 nm), la luz visible (400-760 nm), y una parte de la radiación ultravioleta (100-400 nm) atraviesan la atmosfera y alcanzan la superficie terrestre, en las siguientes proporciones: 55, 40 y 5%, respectivamente, de éste 5%, el 0.1% corresponde a la radiación UVB y el 4.9% a la radiación UVA (Ribera & Paradelo, 2011).

La estratosfera, en específico, la capa de ozono, es de vital importancia ambiental, debido a que, por sus características, logra filtrar la radiación ultravioleta de longitud de onda de 200 a 300 nm (radiación UVC), evitando posibles daños por la exposición directa a este tipo de radiación, por ejemplo: cáncer de piel, mutaciones genéticas, quemaduras de sol, envejecimiento acelerado de la piel, cataratas y otras enfermedades oculares, así como destrucción de cultivos y vegetación, entre otros.

La energía de la radiación ultravioleta es inversamente proporcional a su longitud de onda, de manera que la más corta es la más energética. Se extiende desde la parte violeta del espectro visible hasta la zona de rayos X blandos. Atendiendo a esta propiedad se le clasifica en tres bandas energéticas:

- a. UVC (200-290 nm)
- b. UVB (290-320 nm)
- c. UVA (320-400 nm)

Los rayos UVC son los más nocivos y afortunadamente la mayoría son absorbidos por la capa de ozono, de manera que no todos alcanzan la superficie terrestre. Además, el UVC ioniza los gases atmosféricos, por lo que contribuye a la creación y mantenimiento de la capa de ozono. Pero, no obstante, debido a las investigaciones realizadas sobre la destrucción del ozono en la estratosfera, es muy posible que los rayos UVC, logren traspasar esta capa, penetrando en la atmosfera y ocasionando severos daños biológicos

en la piel, aunque no todos los rayos pueden traspasar, es evidente que, con la formación de un agujero en la capa de ozono, una parte de estos rayos, penetra la atmosfera, aumentando, de esta manera, un efecto adverso en la piel. (Molina & Rowland, 1974).

Por otro lado, los rayos UVB y UVA generan diversos efectos biológicos, ya que penetran en la atmósfera y contribuyen a la fotosíntesis de las plantas, y a la síntesis de vitamina D en la piel de los mamíferos, la cual tiene un papel importante en la correcta absorción de calcio, por otro lado, aumenta la concentración de melanina, la cual tiene la principal función de aportar coloración a la piel, por feomelanina y eumelanina. Por lo tanto, es evidente que la exposición a la radiación solar no es del todo perjudicial, ya que, debido a esta radiación, se produce la síntesis de biomoléculas benéficas para el correcto funcionamiento de los organismos biológicos y el cuerpo humano.

Además, desde años atrás se ha evidenciado el efecto negativo de la exposición a la radiación solar, específicamente a los rayos UVA y UVB, debido a que los rayos UVB provocan daños inmediatos (eritemas), por el contrario, los rayos UVA provocan un daño severo a largo plazo, generando bronceado, envejecimiento, formación de manchas, entre otros efectos. (Maraboto, G. A. 2011)

Entre las principales enfermedades en la piel por la exposición a la radiación solar, están: cataratas y otras enfermedades de los ojos, parte de los daños generados por la radiación UV, se deben a la generación de radicales libres en la piel, generando melanoma o melanogénesis, uno de los cánceres de piel más comunes además del basocelular y espinocelular. El melanoma es el cáncer de piel más relacionado con exposiciones intensas y esporádicas al sol, sobre todo desde la niñez, globalmente es el menos frecuente pero el más severo de los tres (Hayden, Roberts, & Benson, 1997).

Es importante mencionar que los efectos negativos de la exposición excesiva

a la radiación solar, dependen de la longitud de onda, penetración en la piel, duración, frecuencia e intensidad de la exposición.

Ante los efectos negativos de la radiación, la piel tiene un mecanismo natural de protección contra la luz ultravioleta que le permite protegerse de los trastornos cutáneos que ésta le causa, dado principalmente, por la generación de melanina, la cual se produce cuando la radiación UVB llega a la piel, específicamente al ADN celular, provocando una alteración en la formación de los dímeros de tiamina-tiamina, alterando de esta forma, las defensas del cuerpo. De esta manera, se genera una mayor cantidad de melanina con la finalidad de proteger el ADN dañado, transformando los fotones de UV en energía calorífica sin generar radicales libres. (Allen, 2001; Maraboto, G. A. 2011).

Sin embargo, a pesar de que el cuerpo humano tiene este mecanismo de autoprotección a la radiación UV, se ha comprobado que no es suficiente para erradicar todos los efectos perjudiciales que tienen los rayos UV en la piel, sobre todo por el tiempo y la hora del día al que se está expuesto al sol, y aunado a los conocimientos sobre la destrucción del ozono en la estratosfera, se han desarrollado diversos productos químicos elaborados con el fin de proteger la piel de los daños ocasionados por la exposición a los rayos UV, denominados filtros solares.

A pesar de que desde tiempos atrás se han utilizado diversos productos naturales como salvado de arroz, jazmín y extracto de lupino (*Lupinus spp.*), para mantener la piel clara, no fue sino hasta el año 1928, cuando los experimentos de Karl Hausser y Wilhelm Vahle llevaron por primera vez a la producción de los primeros intentos de filtros solares. Pero fue hasta el año 1940, cuando Benjamin Greene, fundador de la marca Coppertone, creó la primera patente de un filtro solar. Años más tarde, con el fin de tener consciencia de la efectividad de un filtro solar y con el interés de mejorar su

protector solar, el científico Franz Greiter, en 1962, desarrolló el término FPS, o bien, Factor de Protección Solar, (Wilkinson & Moore, 1982). Sin embargo, actualmente, la FDA define este factor como la cantidad de energía solar requerida para producir una quemadura de sol en una piel protegida relativa a la cantidad de energía solar que se requiere para producir la quemadura en una piel desprotegida. De esta manera, el FPS es directamente proporcional a la cantidad de energía solar recibida, por lo tanto, un filtro solar con un FPS alto, genera una mayor protección, que un bloqueador con un FPS menor.

Es importante recalcar que el Factor de Protección Solar únicamente se basa en los efectos provocados por los rayos UVB, es decir, por el nivel de eritema o enrojecimiento provocado, y que además es relativo, ya que está en función del tipo de producto, tipo de piel, cantidad de producto aplicado y frecuencia de replicación.

En la actualidad se conoce una amplia variedad de filtros solares de uso común en productos cosméticos. En la tabla 1, se enlistan 10 de los principales filtros solares regulados en la Unión Europea (Cosmetics Europe, 2004), incluyendo la expresión de sus concentraciones máximas autorizadas.

Tabla 1. Principales filtros solares regulados por la Unión Europea

Bloqueador (Nombre comercial)	[X] máx. autorizada (%)
Ácido 4-aminobenzoico (PABA)	5
Sulfato de N,N,N-trimetil-4-[(2-oxo-3 bormiliden)-metil]-anilina; (Metosulfato de alcanfor-benzalconio)	6
Salicilato de 3,3,5-trimetil ciclohexilo; (Homosalato)	10
Oxibenzona, (Benzofenona 3) Reportar obligatoriamente en el etiquetado como: Contiene oxibenzona 1	10

Sales del Ácido 2-fenil-5-bencimidazolil sulfónico (Ácido 2-fenilbencimidazol sulfónico)	8 (expresado en ácido)
Ácido 3-3'-(1,4-fenileno dimetilidina) bis [ácido 7,7 dimetil-2-oxo- biciclo (2,2,1) heptano 1- metano sulfónico] (Ácido tereftaliden dicanfor sulfónico)	10 (expresado en ácido)
1-(4-tert-butil-fenil)-3-(4- metoxifenil) propano-1,3- diona	5
Ácido (2-oxo-3-bornilideno)-4- toluensulfónico (Ácido benciliden canfor sulfónico)	6 (expresado en ácido)
Éster 2-etilhexílico del ácido 2-ciano-3, 3-difenilacrílico (Octocrileno)	10 (expresado en ácido)
Polimero de n- [(2 y -) -(2- oxoborn-3-iliden)metil] bencil] acrilamida. (Poliacrilamidometil benciliden-alcanfor)	6
4-metoxicinamato de 2-etilhexilo (Octil metoxicinamato)	10
Dióxido de titanio	25

(Gago Ferrero P. , 2013).

Es importante recalcar que los países tienen diferentes normativas respecto a las sustancias permitidas en productos cosméticos, tal es el caso de EUA (FDA, 1999) que permite 11 de estas sustancias, o Japón (Japanese SCI, 1985), que permite 22. En México, se permite el uso de 36 filtros solares y solo se prohíbe el uso de ácido 4-aminobenzoico (PABA) (DOF, 2010).

Los filtros solares se han clasificado según su modo de acción (Marín & Del Pozo, 2005) en:

1. Biológicos: Son antioxidantes que evitan la formación de radicales libres y, por lo tanto, potencian el subsistema inmunológico cutáneo. Se emplean cada vez con mayor profusión, y las vitaminas A (betacarotenos), C y E son las más utilizadas (en forma de acetato o palmitato). Investigaciones recientes han demostrado que ambas vitaminas, aplicadas por vía tópica, tienen propiedades antirradicales y

actúan contra el envejecimiento cutáneo y los cánceres de piel fotoinducidos.

2. Físicos: Reflejan la radiación solar, actuando como impermeabilizantes. Son de amplio espectro; retienen las radiaciones solares de la zona del ultravioleta, violeta e infrarrojo. En ocasiones se les denomina "pantalla solar" y se utilizan para evitar tanto el eritema como el bronceado. Entre estos destacan: dióxido de titanio, óxido de zinc, carbonato de calcio y magnesio, óxido de magnesio y cloruro de hierro. Este tipo de filtros solares proporcionan una mayor protección y, al no penetrar en la piel, no constituyen ningún trastorno para el sistema inmunológico, por lo que se utilizan principalmente en productos para niños. A pesar de esto, no son utilizados con frecuencia en productos cosméticos debido a las características sensoriales que les confiere a los productos y debido a que al realizar las formulaciones presentan mayor dificultad para formar emulsiones estables, además de que el costo de este tipo de filtros es más elevado que los filtros solares químicos.
3. Químicos: Son compuestos orgánicos; específicamente moléculas aromáticas conjugadas con grupos carbonilos, que por su estructura tienen una mayor estabilidad, lo que provoca que las moléculas no sufran cambios significativos bajo la luz, permitiendo una absorción de alta energía de los rayos UV (rayos UVC, UVB y UVA) y sus metabolitos y la liberación como rayos de baja energía. Requieren del orden de 30 min para ejercer esta acción, por lo que deben emplearse con la debida antelación antes de la exposición solar. No suelen presentar problemas de formulación, por lo que son los más utilizados. Un ejemplo de este tipo de filtros solares es la 3-benzofenona (BP3), la cual, es capaz de proteger contra la luz UVA y UVB, por lo que es considerado bloqueador de amplio espectro. Pero la mayoría de los bloqueadores solares

contienen mezclas de filtros para incrementar el factor de protección solar (FPS) o bien, la combinación de filtros químicos UVA/UVB y antioxidantes da lugar a preparados de amplio espectro de protección solar y elevada eficacia en algunos productos. Comúnmente se usa la fotoliasa, una enzima que es capaz de reparar los daños producidos por los rayos UV sobre el ADN de la piel. Por otro lado, el octocrileno (OCT), además de ser un filtro solar de amplio espectro, aumentan la capacidad de absorción de otros filtros UV orgánicos, como octilmetoxicinamato (OMC), avobenzona (AVO) y benzofenona-3 (BP3).

Actualmente el espectro de uso de los filtros solares se ha diversificado y se pueden encontrar ahora también como aditivos, como conservantes, potenciadores de sabor y olor, además son utilizados como fotoionizadores o inhibidores de polimerización por lo que se usan con frecuencia en productos plásticos, ropas, detergentes, tintes, shampoos, entre otros.

Existen algunos estudios centrados en la presencia de filtros solares en productos alimenticios como el café instantáneo y sopas deshidratadas, debido a la migración de filtros solares presentes en plásticos y empaques (utilizados con el fin de aumentar la vida de anaquel de los productos), de manera que, estos compuestos migran a los alimentos y son consumidos indirectamente (Gago Ferrero P. , 2013).

2.4 Filtros solares en el medio ambiente

Como ya se mencionó, la utilización de filtros solares químicos radica, principalmente, en su estabilidad para absorber la radiación solar sin sufrir cambios significativos en su estructura. Sin embargo, algunos estudios realizados hasta la fecha determinan que algunos filtros solares pueden degradarse por radiación solar (fotodegradación) y por la acción de organismos vivos (biodegradación). Por ejemplo, según lo reportado por (Urs, Beat, Urs, & Christopher, 2004), la benzofenona (BP3), octocrileno (OCT) y los

salicilatos son los filtros solares más estables a la fotodegradación, pero, por el contrario, el butilmetoxidibenzoilmetano ó avobenzona (BMDBM o AVO) y los cinamatos, específicamente, el metoxicinamato de octilo ó etilhexilmetoxicinamato (OMC ó EHMC) y el metoxicinamato de isoamilo (IMC) son los filtros solares más fotoreactivos, reportando que estos filtros solares se degradan hasta 40% bajo irradiación.

En cuanto a la biodegradación, (Hernández-Leal, Temmink, Zeeman, & Buisman, 2011), realizaron estudios con BP3, OCT y 4-MBC (4-metilbenzilideno alcanfor), bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas, obteniendo mayor eliminación en las primeras, pero las cuales, según los autores, se dan en mayor proporción gracias a la adsorción y a los altos valores de $\log K_{ow}$ de estos compuestos, y no a la biodegradación, en sí.

Por otra parte, según lo reportado por (Jurado, Gago-Ferrero, Vázquez-Suñé, M.Silvia, & Díaz-Cruz., 2014), se sugiere que bajo las condiciones redox de los acuíferos, en aguas subterráneas, los filtros solares como la benzofenona y sus derivados sufren algún tipo de proceso de óxido-reducción que las transforma, o puede llegar a eliminarlas completamente. Además, en ese mismo estudio, se reportó que los filtros solares tienen diferentes características móviles, las cuales dependen de su estructura, por ejemplo, en el caso de los compuestos aniónicos, como los derivados de la benzofenona (BP4, BP2 y 4DHB), al tener un carácter hidrófilo, son móviles y tienen a fluir con facilidad en el agua subterránea, por el contrario, las moléculas neutras con valores de $\log K_{ow}$ significativos, son menos móviles, por ejemplo, la 4-MBC, DHMB y BP3, debido a que pueden mostrar afinidad de adsorción por la cantidad de materia orgánica presentes en los sedimentos, por lo tanto, son menos móviles y no fluyen con facilidad, lo cual concuerda con lo reportado por (Hernández-Leal, Temmink, Zeeman, & Buisman, 2011; Ramos, Homem, Alves & Santos, 2015).

Ante esto, se han reportado diferentes concentraciones de varios filtros solares en agua y sedimentos, las cuales se reportan a continuación, recalcando que las concentraciones reportadas, dependen de la época del año en que se tomen las muestras debido a que hay temporadas, como en verano, en donde las concentraciones son significativamente más elevadas, dado el incremento que se produce en el uso de filtros solares. (Buser, Balmer, Schmid, & Kohler, 2006), (Fent, Zenker, & Rapp, 2010) . Las primeras investigaciones, realizadas por (Balmer, Buser, Müller, & Poiger, 2005), mostraron niveles de entre 2 y 35 ng/L para BP3, 4-MBC, OMC y OTC en aguas de lagos suizos y en Japón se han reportado concentraciones de BP3 de 25 a 266 ng / L ((Fent, Zenker, & Rapp, 2010); (Poiger, Buser, Balmer, Bergqvist, & Müller, 2004). Las concentraciones ambientales de 3-benzofenona (3BP) en aguas naturales oscilan entre 0,8 y 8 mg / L (Balmer, Buser, Müller, & Poiger, 2005). Por otro lado, según lo reportado por (Negreira, Rodríguez, Ramil, Rubí, & Cela, 2009), comparando la concentración de filtros solares de ríos y lagos (agua dulce) en dónde se realizan actividades acuáticas recreativas y en las que no tienen lugar este tipo de actividades, las concentraciones más altas de filtros solares se encontraron en los primeros sitios.

Hay pocas investigaciones sobre la determinación de filtros solares en agua de mar, sin embargo, los reportes que se tienen indican principalmente la presencia de BP3 y sus derivados, con concentraciones que llegan a sobrepasar los 3000 ng/L. (Tarazona, Chisvert, León & Salvador. 2010). Además, en el estudio realizado por (Balmer, Buser, Müller, & Poiger, 2005), también se reportaron altas concentraciones de filtros solares en aguas residuales, entre 500-19000 ng/L y 10-2700 ng/L para aguas tratadas. Específicamente, la benzofenona-3 (BP3) se ha encontrado a 700 ng / L y 10,400 ng / L en el efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales en Suiza y EE. UU, respectivamente (Balmer, Buser, Müller, & Poiger, 2005)). Por otro lado,

(Kasprzyk-Hordern, Dinsdale & Guwy, 2008) reportó concentraciones de BP4 superiores a 4000 ng/L en aguas residuales.

Aunque las concentraciones encontradas en aguas tratadas son relativamente menores a las de aguas residuales de entrada, es importante mencionar que, durante el tratamiento de estas aguas, pueden ocurrir diversas reacciones y cambios en la estructura de los filtros solares, por ejemplo, hidroxilación, la cual podría aumentar la biodisponibilidad e incluso aumentar la toxicidad de los subproductos (Gago Ferrero P. , 2013).

Por otro lado, en sedimentos y lodos se han encontrado principalmente derivados de BP3 en concentraciones de 0.3-47 ng/g (Ricking, Schwarzbauer & Franke. 2003; Jeon, Chung & Ryu, 2006; Zhang, Ren, Li, Kunisue, Gao & Kannan. 2011; Pintado-Herrera, González-Mazo & Lara-Martín. 2013), pero también se ha determinado OMC y OTC en un intervalo de 14-93 ng/g (Rodil & Moeder. 2008). En la Tabla 2 se incluyen algunas concentraciones de filtros solares reportadas en sedimentos. (Gago Ferrero P. , 2013)

Tabla 2. Niveles de Filtros solares comerciales (UV-F) encontrados en lodos y sedimentos de aguas residuales según datos de la bibliografía

UV-F	Lodo/sedimento de aguas residuales (ng/g)	Sedimento (ng/g)
BP3	10-20	0.7-4
	93-295	0.272-4.66
OMC	10-390	4
	100-3287	14-34
OTC	320-18740	61-93
	377-3263	
AVO	144-517	-
HMS	22-331	-
	110-401	
OTS	49-280	-
	13-270	

Por lo tanto, las diferencias de adsorción o sedimentación, así como la fotoreactividad de los filtros solares repercuten en su grado de bioacumulación y bioamplificación, debido a que todas estas son las principales vías de eliminación de los UV-F de los diferentes cuerpos de agua.

De manera que, la degradación de los filtros solares depende de la estabilidad (principalmente a la luz), de sus características lipofílicas ($\log k_{ow}$) y afinidad de adsorción. Además, las características de los diferentes cuerpos de agua (cenotes y humedales) en los que estos compuestos se descargan, son determinantes en el comportamiento de los UV-F y su persistencia en el medio, por ejemplo: la cantidad de materia orgánica presente, la capacidad redox del medio, o bien, la capacidad de las bacterias para degradar los filtros solares, la toxicidad y los procesos competitivos entre bacterias presentes en el sistema. Por lo tanto, las concentraciones de UV-F que se determinarán en aguas de pozos de riego y posteriormente en hortalizas, dependen directamente de todos los factores mencionados anteriormente.

2.5 Metodologías analíticas para determinación y cuantificación de contaminantes emergentes

En los últimos años se han desarrollado diversas metodologías analíticas para la determinación y cuantificación de contaminantes ambientales como pesticidas, fármacos, antibióticos, hidrocarburos, proteínas, etc. Las dos principales han sido Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) y Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas de Alta Resolución (CL-EMAR) debido a su destacada sensibilidad, además de su idoneidad para la separación de especies iónicas, no volátiles de alto peso molecular o especies termolábiles.

CLAR es un método de separación, identificación y cuantificación de mezclas moleculares que está basada en el intercambio de los solutos entre dos fases inmiscibles. Las fases empleadas se denominan fase móvil y fase estacionaria.

La separación se produce por migración diferencial en un sistema con dos fases, generando equilibrios de adsorción y partición, dependiendo de las características de las fases que se utilicen.

En Cromatografía de Líquidos, las fases móviles utilizadas son fases en estado líquido, que fluyen continuamente sobre fases estacionarias sólidas o líquidas. Esta técnica analítica se basa en la elución de analitos a través de la fase móvil y sobre la fase estacionaria, por lo tanto, la separación ocurre de acuerdo a la afinidad de los compuestos a la fase estacionaria.

Por lo anterior y por la alta sensibilidad que posee CLAR, ha sido necesario el desarrollo de metodologías para la preparación o tratamiento de las muestras, debido a que muchas de ellas, por su naturaleza, son matrices complejas que están conformadas por diversos compuestos, contaminantes, microorganismos, pigmentos, etc; lo cual, puede hacer difícil la determinación y cuantificación de analitos.

El tratamiento de muestras es la primera etapa en el proceso global de análisis de filtros solares en agua de riego y hortalizas, debido a que son matrices complejas, por lo tanto, se realiza un pretratamiento con el fin de evitar que interferencias de la matriz influyan en la identificación de los analitos.

La determinación de CDEs (Compuestos Disruptores Endocrinos) en estas muestras a menudo requiere una preparación extensa de la muestra antes del análisis instrumental. La preparación de las muestras generalmente depende de la matriz y el analito, por lo que es difícil establecer tendencias generales. Los métodos de extracción se seleccionan considerando muestras sólidas y líquidas. En la Fig 3 y 4 (ver Anexo I), se esquematiza de manera general, el proceso que se sigue durante el análisis de contaminantes tanto en muestras líquidas y sólidas.

Es importante mencionar que existen varias diferencias en el análisis y pretratamiento de muestras con alto contenido lipídico como grasa animal o grasas vegetales (>20% lípidos) y muestras con bajo contenido lipídico como leche con <3% grasa. Las primeras, son las muestras que generan un mayor reto, debido a que resulta complicado extraer CDEs sin coextracción de lípidos, debido a que son muy difíciles de remover y si no son eliminados, al ser compuestos no volátiles tienden a dañar el sistema cromatográfico, resultando en baja sensibilidad, una vida corta de la columna y un posible daño al sistema de detección, por lo tanto, los métodos para el pretratamiento de muestras utilizados para la determinación de CDEs es de primordial importancia. (Leo Nollet, 2011)

Además, la supresión de iones se ha convertido en el principal problema en bioanálisis cuantitativo cuando se utiliza LC-MS ó CL-EMAR. El efecto matriz proporciona datos incorrectos que afectan negativamente al rendimiento del estudio. La matriz biológica contiene muchos componentes como sales, fosfolípidos, proteínas y otras sustancias. Todos estos componentes son la principal fuente de supresión de iones en el bioanálisis. La supresión de iones es siempre la razón de que los datos sean incorrectos, lo que proporciona una precisión deficiente. Además, se ha demostrado que el porcentaje de supresión de iones se relaciona con la relación matriz/analito, es decir, la supresión de iones depende de la concentración del analito en la muestra. Para disminuir la supresión de iones por el efecto de la matriz, se recurre a un método apropiado de preparación de la muestra.

Los pretratamientos reportados y más comúnmente utilizados para extracción de CDEs en muestras líquidas son:

1. Extracción líquido-líquido (ELL)
2. Extracción en Fase Sólida (EFS)
3. Micro extracción en fase sólida (SPME)

4. Extracción Sorptiva Stir-bar
5. Otros métodos de limpieza, por ejemplo: QuEChERS (dSPE)

La técnica de Extracción en Fase Sólida es el método de preparación de muestras más usado para la determinación de medicamentos en fluidos biológicos y contaminantes ambientales en agua, debido a su alta eficiencia, rentabilidad, alta reproducibilidad, fácil de utilizar y automatizar, además de que permite la separación y concentración de analitos.

Se basa en la utilización de un sorbente de 50-200 mg en un cartucho para separar los analitos de interés de una matriz compleja, a través del cual pasa una muestra acuosa. Los analitos son absorbidos en el sorbente y luego eluidos de acuerdo con sus diferentes afinidades entre el material absorbente y la fase móvil utilizada, un disolvente orgánico.

Para la presente investigación se utilizó Extracción en Fase Sólida en Fase Reversa (RP-SPE), en el cual se utiliza un sorbente no polar del tipo sílice unida (C18, con un tamaño de partícula de 40 μm y un tamaño de poro de 60 Å). específicamente, se emplearon cartuchos Strata C18-U, 1g fase solida/6 mL, Phenomenex, los cuales, por su carácter no polar, son ideales para retener los compuestos de los filtros solares, además de otros contaminantes con características medianamente polares o no polares.

Es importante mencionar que este tipo de SPE es menos selectivo en comparación con la fase normal o el SPE de intercambio iónico, además, también se pueden utilizar absorbentes poliméricos o absorbentes de poliestireno.

Por otro lado, los tratamientos reportados y comúnmente utilizados para muestras sólidas son:

1. Extracción con disolventes
2. Extracción Soxhlet

3. Sonicación
4. Extracción asistida por microondas
5. Extracción acelerada con disolventes
6. Extracción de fluido supercrítico
7. Extracción en matriz de fase sólida

Para la presente investigación, se llevó a cabo extracción con disolventes, seguida de una sonicación y una limpieza con tubos QuEChERS (dSPE).

Para limpiar las muestras de algunos compuestos como lípidos, azúcares, ácidos orgánicos, o pigmentos, como la clorofila e incluso agua residual, se empleó el método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe, Marchis, Ferro, Brizio, Squadrone & Abete; 2012). En español, Rápido, Fácil, Barato, Efectivo, Robusto y Seguro. Este tipo de tratamiento se basa en la extracción en fase sólida dispersiva (d-EFS), el cual se utiliza principalmente para la extracción simultánea de compuestos polares y no polares y que además son afectados por el pH del medio, debido al control del pH durante la fase de extracción, optimizando la recuperación de los analitos. Aunque es un método muy nuevo (publicado por primera vez en 2003; Anastassiades, Lehoutay, Stajnbaher & Schenck, 2003), ya ha sido ampliamente aceptado por la comunidad internacional de analistas de contaminantes medioambientales. Es importante mencionar que la principal ventaja de este tratamiento es el consumo relativamente bajo de disolventes. La tendencia se ha inclinado hacia la partición líquido-líquido con acetonitrilo, seguida por una etapa de limpieza de extracción en fase sólida dispersiva con amina secundaria (PSA), debido a que el acetonitrilo se separa del agua con facilidad y eficacia, al agregar sal, siguiendo esta tendencia, los dos tipos de tubos QuEChERS utilizados fueron Supelco 55227-U y Supelco 55464-U.

Por otra parte, en cuanto al análisis de muestras para confirmación y cuantificación de analitos, se ha implementado con mayor frecuencia el uso de

Cromatografía de Líquidos Acoplado a Masas. Es importante mencionar que esta metodología analítica también se utiliza en el análisis de otros contaminantes, no solo filtros solares, también se pueden determinar pesticidas y medicamentos.

Debido a que el análisis en CL-EMAR realiza una separación por masa-carga, se tiene que ionizar la muestra, la cual se lleva a cabo utilizando interfaces de ionización a presión atmosférica (API), es decir, ionización por electrospray (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI) y ionización fotoelectrónica a presión atmosférica (APPI).

ESI es una ionización por transferencia de carga muy suave, especialmente adecuada para compuestos muy polares o iónicos y compuestos con un alto peso molecular, generalmente proporciona una mejor sensibilidad para análisis de compuestos. Por lo anterior, en modo positivo (ESI+) la especie que generalmente detecta el equipo es el ion molecular protonado $[M+H]^+$, mientras que en modo negativo (ESI-) la especie que es el ion molecular desprotonado $(M-H)^-$.

Más recientemente, la técnica de masas en tándem (MS^n) se ha convertido en una herramienta poderosa para el análisis de residuos en una variedad de matrices complejas debido a sus ventajas inherentes: selectividad y sensibilidad notablemente mejoradas, tanto que los pasos previos a la muestra pueden minimizarse, y aun así son confiables. La cuantificación y la confirmación se pueden lograr fácilmente a los niveles de concentración bajos que se requieren en la determinación de pesticidas (ppb o ppm).

2.6 Compuestos disruptores endocrinos

Desde 1992 y especialmente desde la publicación del libro *Our Stolen Future* (Colborn, Dumanoski, & Myers, 1996), se detonó una gran discusión centrada en la repercusión de ciertos compuestos químicos en el funcionamiento

anormal del sistema endocrino, los cuales pueden llegar a ser detonantes de enfermedades cancerígenas y de posibles efectos negativos como disruptores en el sistema endocrino, afectando la reproducción y el desarrollo de mamíferos y humanos. (Aisev, Korsgaard & Bjerregaard, 2005; Chen et al. 2008; Darbre, 2006; Schlumpf y otros, 2008 a; Yang et al. 2008). Entre los compuestos denominados disruptores endocrinos, se encuentran diversos productos para el cuidado personal, entre los cuales destacan: desinfectantes/antisépticos (triclosan, triclocarbono, etc), fragancias (compuestos policíclicos, nitrados y sus metabolitos) antioxidantes/conservadores (ácido ascórbico, ácido benzoico, parabenos, terbutil-4-hidroxianisol, 2,6-di-tert-butil-p-hidroxitolueno, tocoferoles, etc.) y filtros solares: benzofenona (BP3), ácido octil-dimetil-p-amino-benzoico (OD-PABA), homosalato (HMS), octilsalato (OTS)), etc.

Aunado a los productos para el cuidado personal, existen otros grupos de compuestos identificados como disruptores endocrinos, entre estos se encuentran: pesticidas (dieldrin, endosulfan, entre otros), fármacos (dietilestilbestrol, mestranol, etinil-estradiol, etc.), organohalógenos (diclorodifeniltricloroetano (ddt), diclorodifenildicloroetileno (dde), bifenilos de policlorinato (pcb), dioxinas y furanos), organoestaño (tributilestaño (tbt)), fenoles (bisfenol a y f), ftalatos (dietilhexilftalato, butilbenzilftalato, etc), hormonas naturales (17b-estradiol, estrona, etc), fitoestrógenos (isoflavonoides, lignanos, b-sitosterol, etc), hidrocarburos aromáticos (benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b/h) fluoranteno, etc), metales pesados (cadmio, plomo, mercurio, etc), residuos industriales y diversos contaminantes provenientes de la agricultura, actividad minera, aguas residuales domésticas, entre otros.

El sistema endocrino, junto con el sistema nervioso son los principales sistemas de comunicación de mamíferos, vertebrados (peces, anfibios, reptiles y pájaros) e invertebrados (caracoles, langostas, insectos y otras especies).

Está compuesto por glándulas (pituitaria, tiroides, paratiroides, adrenalina, glándula pineal, gónadas (ovarios en hembras y testículos en machos), etc.) y hormonas (moléculas bioquímicas que viajan a través del sistema sanguíneo, aminoácidos, proteínas, esteroides, eicosanoides, etc.), los cuales promueven el desarrollo, el crecimiento, la reproducción y el comportamiento de animales y humanos, actuando como mensajeros con un receptor específico (Lister & van der Kraak, 2001).

Cuando una hormona se encuentra con su receptor, se unen, desencadenando la producción de proteínas particulares que activan la actividad biológica asociada con las hormonas. La manera en la que actúan las hormonas puede ser:

1. Organizacional (funciones endócrinas): Son las más importantes, en términos de efectos permanentes en relación con contaminantes del medio ambiente, especialmente durante el desarrollo fetal. Generado por hormonas y glándulas, responsables de la comunicación celular. Cada glándula produce una o más hormonas. Las hormonas son sustancias químicas naturales producidas en las células de una glándula y liberadas al sistema circulatorio, donde viajan a través del torrente sanguíneo hasta llegar a un tejido u órgano blanco. Allí se unen a receptores específicos, disparando respuestas tales como la producción y/o liberación de otra hormona, un cambio en el metabolismo, una respuesta conductual u otras respuestas. Por ejemplo, la glándula pituitaria produce más de ocho hormonas, entre ellas, la prolactina y la hormona del crecimiento. La prolactina participa en la producción de la leche materna (únicamente en mujeres que están en esta etapa de lactancia), por otro lado, la hormona del crecimiento es sintetizada durante toda la vida, por lo tanto, esta es una de las hormonas más importantes para el sistema endócrino, especialmente en la etapa de la

infancia. (Lister and van der Kraak 2001; Guillete, y otros, 1996; Palanza y otros, 1999; Gore, A. C, y otros, 2014).

2. Activacional (funciones no endócrinas): Solo causa cambios transitorios en una gran cantidad de procesos celulares. Por ejemplo, el páncreas produce la hormona insulina, que circula en el torrente sanguíneo y es necesaria para mantener la homeostasis de la glucosa. También produce las enzimas digestivas que van directamente al tracto digestivo y no son parte del sistema endocrino porque no son liberadas en la sangre (Lister and van der Kraak 2001).

Según la Sociedad de Química y Toxicología Ambiental (SETAC, por sus siglas en inglés), define a un disruptor endocrino como la sustancia o sustancias químicas, sintéticas o naturales que perturban el funcionamiento normal del sistema endocrino y sus hormonas en humanos y mamíferos (SETAC, 2000). Por otro lado, U.S. EPA. 1997, los define como un agente externo que interfiere con la producción, liberación, transporte, metabolismo, unión, acción y eliminación de hormonas naturales en el cuerpo, las cuales son responsables de mantener la homeostasis y la regulación de los procesos de desarrollo.

Hay varias maneras en que los disruptores endocrinos pueden interferir con el sistema endocrino, pueden imitar o bloquear las hormonas naturales y alterar los niveles hormonales, por lo tanto, afectan las funciones que controlan estas hormonas, otra manera es la alteración de la capacidad para producir hormonas, interferencia con las formas en que las hormonas viajan a través del cuerpo y cambios en el número de receptores. Independientemente de la situación, tener demasiado o muy poco de las hormonas que necesita el cuerpo humano, puede hacer que el sistema endocrino funcione inadecuadamente (Sonnenschein & Soto 1998).

Para que los compuestos disruptores endocrinos puedan interferir en el sistema endocrino primero necesitan entrar en el organismo.

Desafortunadamente, el ser humano está expuesto a este tipo de compuestos de muchas maneras. En la fig 5 (ver Anexo I), se esquematizan las diferentes vías por las que estos compuestos pueden ingresar al cuerpo humano. (Leo Nollet, 2011).

La principal preocupación que se ha generado acerca de los compuestos disruptores endocrinos radica en que, durante los 9 meses entre la concepción y el nacimiento, el cerebro fetal se desarrolla y guía por señales químicas naturales y las hormonas juegan un papel crucial en el desarrollo y crecimiento fetal, por lo tanto, debido a la forma en la que actúan estos compuestos, los fetos y los embriones son especialmente sensibles en ciertas etapas y aún a bajas dosis de estos compuestos.

Además, las consecuencias que causan estos compuestos en la mayoría de los casos no se hacen visibles sino hasta después de un tiempo prolongado, incluso años, debido a la bioacumulación y bioamplificación de estos compuestos. Por lo tanto, los efectos no se reflejan de manera inmediata, sino a través de los años, llegando a afectar a las siguientes generaciones. (Colborn, Dumanoski, & Myers, 1996; U.S. EPA. 1997).

Aunque se ha reportado que, en humanos, hay un aumento en la incidencia de cáncer de mama, testicular y prostático, disminución de la calidad del semen, mayor incidencia de ovarios poli quísticos en mujeres y endometriosis (IEH 1995; Colborn, Dumanoski, & Myers, 1996; U.S. EPA 1997; Foster, 2001). El daño ocasionado por los diversos compuestos disruptores endocrinos en el cuerpo humano, se ha reportado de manera empírica, debido al desconocimiento del daño que podían generar ciertos medicamentos o compuestos. La población se vio expuesta a diversos CDE`s que tuvieron severas consecuencias en la población, tal es el caso del dietilestilbestrol (DES) o del PCB y dibenzofuranos policlorados (PCDF) presentes en aceite de arroz.

A pesar de la evidencia empírica que se tiene sobre el efecto de estos compuestos en los humanos, según lo reportado por Damstra, Barlow, Bergman, Kavlock & Van Der Kraak, 2002, en "Global Assessment of the State of the Science of Endocrine Disruptors", se concluyó que los estudios que determinan los efectos de los compuestos disruptores en humanos, han arrojado resultados inconsistentes y no concluyentes, por lo que resalta la necesidad de estudios más rigurosos, debido a que la única evidencia que se tiene sobre los efectos negativos en el cuerpo humano, es proporcionada por estudios con altos niveles de exposición, por lo que, para muchos de estos compuestos, la relación dosis-respuesta no ha sido establecida todavía, específicamente en rangos bajos de dosis, además de que éstas dosis varían de especie a especie.

La principal evidencia que permite cuestionarse la implicación de los filtros solares como disruptores en el sistema endócrino, radica en sus características lipofílicas, debido a que por su elevada lipofilicidad, la mayoría de los compuestos tienen un $\log K_{ow}$ entre 4 y 8, y por su relativa resistencia a la degradación biológica, los filtros UV tienden a bioacumularse en los tejidos grasos de los organismos por lo tanto, aumentan de concentración a medida que avanzan a través de la cadena alimenticia, es decir, se bioamplifican (Díaz-Cruz & Barceló, 2009).

Debido a que las especies más altas en la red alimentaria pueden ser expuestas a todos los compuestos químicos que acumulan las especies de orden inferior (bioamplificación). Un estudio realizado por (Fent, Zenker, & Rapp, 2010) sobre la bioamplificación de OMC en cormoranes, aves que se alimentan de peces, mostró que las concentraciones promedio de OMC en 5 de estas aves fueron de 341 ng/g peso lipídico, con valores en el rango de 16-701 ng/g peso lipídico.

En otros países se ha documentado la acumulación de filtros solares a varios niveles tróficos en mejillones, almejas, camarones, peces o pescados, los cuales son consumidos de manera directa por el humano (Bachelot, y otros, 2012; Gago Ferrero, y otros, 2013; Alonso, y otros, 2015). En peces de ríos y lagos de Suiza se ha reportado la bioacumulación de 4-MBC y OCT, con concentraciones de 50-1800 ng/g masa lipídica y 40-2400 (ng/g masa lipídica, respectivamente).

Teniendo en cuenta el gran número de filtros solares utilizados y otras alteraciones endocrinas. Los compuestos, filtros UV hormonalmente activos, pueden actuar de manera aditiva. De hecho, las interacciones acumulativas se han demostrado en pocos estudios y muchos de ellos informan efectos sinérgicos significativos de combinación de filtros UV. (Brian, y otros, 2005; Kunz & Fent, 2006; Kunz & Fent, 2009).

Algunas de las consecuencias de la bioacumulación de diversos compuestos disruptores endocrinos en mamíferos son cambios de sexo, incremento en la generación de cáncer, reducción de la función reproductiva, alteración de la inmunidad y sistema nervioso, así como un desarrollo anormal.

Sin embargo, los trabajos sobre el efecto de estos compuestos en la biota aún son escasos y la mayoría de ellos se han centrado en experimentos tanto *in vivo* como *in vitro*, principalmente en peces, reportando feminización y masculinización, vitelogénesis, bajo rendimiento reproductivo, alteración de la función tiroidea, disminución de la fertilidad y eficacia en el proceso de incubación y, por lo tanto, de la población, así como alteraciones del sistema inmune.

En trucha arco iris y medaka japonés (*Oreochromis latipes*), las concentraciones de umbral para una respuesta estrogénica en la vitelogenina (VTG) a la exposición de BP3 fue de 620-749 ug/g. (Coronado, y otros, 2008). Por otra parte, en peces macho de cabeza pequeña (*Pimephales promelas*), se determinó que

concentraciones superiores a 1.2 mg/L de BP2 inducían VTG, modificaban la histología de las gónadas y la producción de ovocitos en peces hembras se inhibió significativamente. (Weisbrod, Kunz, Zenker & Fent, 2007; Fent, Kunz & Gomez, 2008). En el mismo pez, se determinó que concentraciones superiores a 435 ug/L de 3BC, tenían alta potencia estrogénica, induciendo VTG. (Purdom, y otros, 1994; Jobling, y otros, 1995; Routledge, y otros, 1998; Kunz, Gries & Fent, 2006).

2.7 *Danio rerio*

Ante los efectos en el sistema endocrino que se han reportado por diversos CDE`s, se han generado dos principales dudas: ¿cuán grande es el efecto de estos compuestos en la salud humana, especialmente en niveles bajos de exposición? ¿cuáles son los efectos no observados de los filtros solares? Para responder esto, recientemente se han determinado efectos adversos inducidos por UV-F, que afectan la reproducción y al desarrollo de los individuos, como una reducción de la fecundidad o alteraciones en los órganos o en el desarrollo embrionario, así como efectos en el eje hipotálamo-pituitario-tiroide, en diversos organismos acuáticos, uno de los más importantes es el pez cebra.

Desde los años 80`s y 90`s, el pez cebra (*Danio rerio*) se ha convertido en un prometedor modelo animal alternativo para detectar la teratogenicidad en la evaluación de la toxicidad del desarrollo preclínico, además ha aportado grandes avances en el desarrollo de la biología, oncología, estudios sobre reproducción, genética, neurobiología, ciencias ambientales, medicina regenerativa, en el desarrollo y evolución de fármacos.

El pez cebra es un teleósteo tropical de agua fresca perteneciente a la familia Cyprinidae representando únicamente cuatro especies indígenas del sur de Asia, siendo estas: *Danio dangila*, *Danio jaintianensis*, *Danio meghalayensis* y *Danio rerio*, las cuales están distribuidas principalmente alrededor de India, Bangladesh, Nepal, Myanmar y Pakistan.

Las diferencias morfológicas entre machos y hembras de pez cebra son muy claras, aunque en general son una especie pequeña debido a que su tamaño oscila entre los 2-3 cm de largo. Los machos son translúcidos con franjas negras, delgados y con forma de torpedo, seguidos por franjas negras longitudinales y usualmente una coloración dorada en el vientre y las aletas. Las hembras son gordas cuando están cargadas de huevos y tienen poco o nada de color dorado en la parte inferior. Por otra parte, los embriones se desarrollan en 2-4 días, son claros, por lo cual, son fáciles de observar al microscopio y permite estudiar diferentes fases de desarrollo embrionario, (Driever, Stemple, Schler & Soinica-Krezel, 1994), por lo tanto, estas características son importantes para su creciente utilización como modelo biológico.

El desarrollo embrionario del pez cebra (Kimmel, y otros, 1995) se ha estudiado a detalle, desde las etapas pre-gástrula hasta la gástrula a través de la organogénesis (Schmitt y Dowling, 1994; Stainier y Fishman, 1994), lo cual genera información sólida sobre la detección e interpretación de fenotipos mutantes. Aunado a lo anterior, el pez cebra posee diversas características similares al humano, principalmente en la construcción del genoma y la organización cerebral. Incluso, está reportado que el pez cebra mostró una homología del 50% al 80% con el genoma humano disponible (Sprague, 2008), por tal motivo una de las aplicaciones más conocidas sobre el pez cebra, es en investigaciones sobre Alzheimer (Santana, Rico & Burgos, 2012).

Debido a las similitudes entre el pez cebra y el humano y a su accesibilidad económica, también se ha utilizado este organismo acuático para interpretar el comportamiento y toxicidad de ciertos compuestos químicos en el cuerpo humano, por ejemplo: filtros solares, pesticidas, entre otros.

Es, por lo tanto, que la prueba de embriotoxicidad del pez cebra (ZF) (ZET) se propuso recientemente como actualización en la guía ICH S5. Además, este

modelo permite el monitoreo continuo del desarrollo de un organismo completo desde la embriogénesis temprana hasta la incubación y más allá, primeramente, porque es más barato y más rápido que los ensayos con mamíferos. (Streisinger, Walker, Dower, Knauber & Singer 1981).

Se han realizado estudios en el pez cebra (*Danio rerio*) para evaluar el potencial endocrino y efectos tóxicos de diversos filtros solares, entre ellos, AVO, OMC y OTC (Kaiser, y otro, 2012), los resultados revelaron que la toxicidad de estos filtros solares es baja. En particular, OMC tuvo efectos sub-letales con NOEC de 100 mg/kg. En peces, se ha descrito que concentraciones de BP3 de hasta 439 mg/L exhiben múltiples actividades hormonales en los niveles de transcripción en eleuteroembriones y pez cebra adulto (Blüthgen, Zucchi & Fent, 2012). Por otra parte, un reciente estudio sobre el efecto de BP3 en la expresión del gen de vitelogenina 1 (VTG1) y la transcripción de las enzimas catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx)., que participan en el equilibrio redox celular, reveló que a una concentración de 1000 mg/L BP3, únicamente se produjo un aumento significativo del gen VTG1 con respecto al control (Rodríguez, y otros, 2015)

Ante las características químicas de BP3, OCT, OMC, AVO, OTS y HMS, que los hacen susceptibles a ser bioacumulados, la exposición aguda a concentraciones determinadas en las muestras, se usó en el presente estudio para obtener información toxicológica importante, con respecto a estos compuestos orgánicos.

3. Objetivos

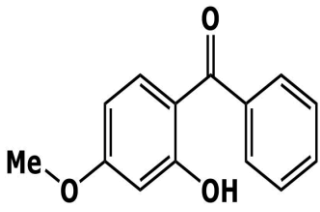
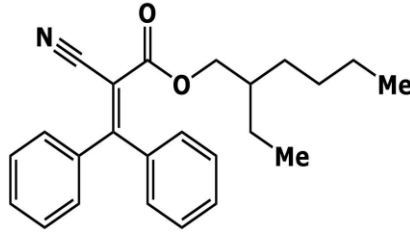
3.1 Objetivo General

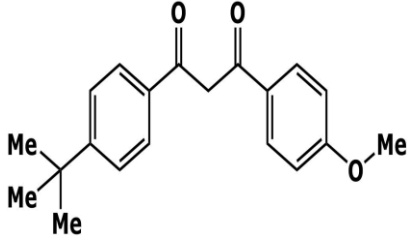
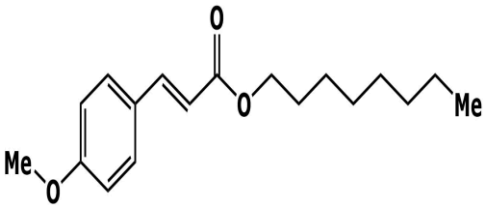
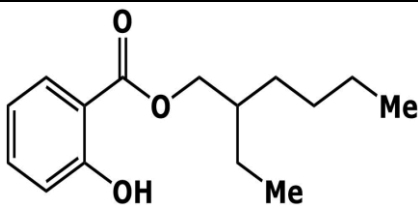
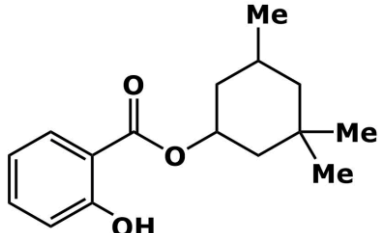
Demostrar la presencia de seis compuestos químicos que se aplican más frecuentemente en los filtros solares comerciales, en el agua de riego y hortalizas cultivadas en la península de Yucatán, señalando con ello la migración de contaminantes del agua de riego hacia las hortalizas y por tanto un riesgo alimentario para los consumidores.

3.2 Objetivos particulares

1. Validar el método analítico desarrollado por Osorio-León, 2017, en CLAR, mediante la calibración del proceso de extracción (porcentaje de recuperación en EFS) y determinando el límite de detección, límite de cuantificación y especificidad del método, para posteriormente identificar filtros solares presentes en hortalizas y agua de riego de la península de Yucatán:

Tabla 3. Filtros solares orgánicos analizados.

Nombre químico	Estructura química	Log K _{ow} (lipofilicidad)	Solubilidad en agua (mg/L)
Filtros solares no ácidos			
3-benzofenona (BP3)		3.79	210
Octocrileno (OCT)		7.35	0.2

Avobenzona (AVO)		4.51	4
Octil- metoxicinamato (OMC)		5.8	150
Filtros solares ácidos			
Octisalato (OTS)		5.97	15
Homosalato (HMS)		6.16	20

2. Realizar un estudio de confirmación de filtros solares identificados en CLAR, mediante un análisis dirigido implementado en CL-EMAR.
3. Determinar las concentraciones nominales de filtros solares tanto en agua de riego como en hortalizas, por medio de CL-EMAR.
4. Evaluar los efectos biológicos de filtros solares en un bioensayo de toxicidad en embriones de pez cebra, para:
 - 1) Determinar una disrupción visible, y de esta manera, demostrar un riesgo alimentario para la población de la península de Yucatán, evaluando el efecto que causan las concentraciones nominales determinadas en agua y hortalizas, en embriones de pez cebra.

- 2) Detectar un problema ambiental, es decir, el o los posibles efectos toxicológicos que los filtros solares ocasionan en la biota de los cenotes, generalmente peces bagres. Evaluando concentraciones mayores a las determinadas en agua y hortalizas.
5. Determinar la presencia de pesticidas y otros contaminantes emergentes en agua de riego y hortalizas cultivadas de los mismos sitios muestreados por medio de un análisis no dirigido en CL-EMAR.

4. Metodología

Tabla 4. Diagrama general de la Investigación

Etapa I	Etapa II	Etapa III	Etapa IV	Etapa V
<p>Validación del método analítico</p> <p>Determinar la linealidad, límite de detección, cuantificación y especificidad del método.</p> <p>Calibración del proceso de extracción (EFS).</p> <p>Muestreo y preparación de muestras.</p> <p>(Osorio-León, E. 2017)</p>	<p>Análisis dirigido en CLAR (filtros solares).</p> <p>Separación de analitos por polaridad y afinidad a la fase estacionaria (C18), utilizando como fase móvil metanol/agua (82:18 v/v) en CLAR</p> <p>Identificación de filtros solares en las muestras, por tiempo de retención de los analitos.</p>	<p>Análisis dirigido en CL-EMAR (filtros solares).</p> <p>Confirmación de analitos en CL-EMAR mediante dos métodos de ionización por electrospray (ESI), ESI+ y ESI-.</p> <p>Cuantificación de analitos mediante la inyección de un estándar deuterado</p>	<p>Bioensayo en pez cebra</p> <p>Selección de las concentraciones a evaluar.</p> <p>Cuidado y mantenimiento de organismos</p> <p>Apareamiento de organismos</p> <p>Bioensayo</p>	<p>Análisis no dirigido en CL-EMAR (pesticidas)</p> <p>Implementación de condiciones de análisis en CL-EMAR..</p> <p>Creación de la base de datos PCLD.</p> <p>Identificación de contaminantes en las muestras.</p> <p>(Hoja de aplicación 20035), (Phenomenex, 2019)</p>

Etapa I. Validación rápida del método de análisis desarrollado por Osorio (Osorio-León, E. 2017).

Para el análisis de los filtros solar se realizó una validación parcial rápida del método desarrollado por Osorio (Osorio-León, E. 2017). Luego se desarrolló un método analítico por CL-EMAR, para la confirmación y cuantificación de los filtros solares presentes en las hortalizas.

El método implementado por Osorio-León, E. 2017, se basa en un equilibrio de adsorción, en fase reversa, al utilizar como fase estacionaria una fase no polar químicamente unida (C18) en un lecho cromatográfico cerrado en columna y como fase móvil una mezcla de disolventes polares grado cromatográfico previamente desgasificados y filtrados (MeOH/agua 88:12, v/v) en un método isocrático con un flujo de 1 mL/min, durante 20 min. Además empleó un detector UV/vis programado a la longitud de onda máxima de cada filtro solar.

La validación del método es parte importante de las buenas prácticas de laboratorio y se realiza con la finalidad de garantizar la calidad del método analítico y la obtención de resultados fiables. Para realizar la validación del método desarrollado por Osorio (Osorio-León, E. 2017), se realizó una curva de calibración de cada analito para determinar la exactitud, la precisión del método y optimizar las condiciones de separación. Además, se realizó una calibración del proceso de extracción por EFS (Extracción en fase Sólida), mediante pruebas de porcentaje de recuperación en EFS para determinar el disolvente de elución y condiciones óptimas para la extracción, concentración y determinación de los analitos.

1. Linealidad (Curva de calibración o Curva Estándar)

Con el fin de determinar la linealidad del método, es decir, la facilidad del método analítico para obtener resultados de las pruebas que son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, se realizó una curva

de calibración de 4 puntos (0.5, 1.0, 10 y 20 µg/mL) de cada uno de los filtros solares en estudio, analizadas bajo las siguientes condiciones.

Tabla 5. Condiciones de análisis implementadas por Osorio-León, E. 2017.

Sistema cromatográfico	Sistema CLAR Varian Polaris 211, que consta de dos bombas 211, detector de UV 315 programado a la longitud de onda máxima de cada filtro solar, y colector de fracciones 701 e inyector automático 431.
Fase	Reversa
Columna (Fase Estacionaria)	Luna C18 (Phenomenex 100 Å , 5 µm, 4.5 x 250 mm)
Fase Móvil	MeOH-Agua (88:12 v/v, método isocrático), flujo de 1mL/min por 20 minutos,
Análisis (Software)	Programa Galaxie de Varian.

El límite de detección (LOD) es la cantidad más baja de analito en una muestra que se puede detectar, pero no necesariamente cuantificar, es la cantidad inyectada que produce una señal con una altura al menos tres veces más alta que el nivel de ruido basal. El límite de cuantificación (LOQ) o también denominada sensibilidad, es la cantidad mínima que se puede cuantificar con una exactitud y precisión aceptables. (Mohammad, Aziza & Mohamed, 2017).

2. Calibración del proceso de extracción (Porcentaje de recuperación en EFS)

Cada cartucho se lavó con metanol y se acondicionó con agua (5 mL de cada fase móvil), luego se aplicó cada muestra. Para el recobro, se aplicaron soluciones de 20 y 100 µg de cada bloqueador en 500 mL de agua destilada y se pasaron por el cartucho EFS, por duplicado, empleando un manifold, para enseguida lavar el cartucho con agua tres veces.

Para determinar el disolvente adecuado, la elución de los analitos se realizó con tres diferentes mezclas de disolventes, con el fin de comparar el porcentaje de recuperación obtenido con cada disolvente y de esta manera, elegir el disolvente óptimo para la determinación y cuantificación de filtros solares. (Dimosthenis, Amparo & Chisvert, 2007; Ramos, Homem, Alves & Santos, 2015)

Las condiciones y disolventes probados fueron:

1. Metanol/Acetato de etilo (1:1)
2. Metanol/Acetato de etilo (1:1) (dejando secar el cartucho)
3. Metanol/Diclorometano (1:1)

El disolvente se evaporó en un Rotavapor Buchi R-215 y se reconstituyó la muestra en 400 μL de metanol, para inyectar 20 μL en el sistema CLAR (Sánchez, Miguel & Tadeo, 2011). Finalmente se calculó el porcentaje de recuperación obtenido con cada disolvente.

3. Muestreo y Preparación de muestras

A) Muestreo

Las zonas en las cuales se llevaron a cabo los muestreos corresponden a Cholul, Col. Montes de Amé (en la Cd. de Mérida) y Timucuy, todas ubicadas dentro de la Península de Yucatán, seleccionadas con base a las características del suelo y dinámica del acuífero subterráneo. En la figura 6 se presenta la georreferenciación de las zonas muestreadas.

- Muestras de agua de pozos de riego.

Para el muestreo de agua, se utilizaron recipientes color ámbar (para minimizar la degradación de los filtros por la luz solar), previamente lavados con metanol (para evitar contaminación proveniente de otros agentes). Las botellas se enjuagaron con agua de muestra antes de llenarlas.

En el sitio, se solicitó que se encendiera la bomba de extracción del agua, y de la toma de agua de riego se dejó correr el agua por 3 minutos para quitar el agua residual previa. Luego se tomaron 8 L de agua de los pozos. Después de rellenar se aseguró que no había espacio de cabeza. En cada sitio se solicitó la profundidad de cada pozo (profundidad mínima: 10 m; profundidad máxima: 18 m).

Para realizar una comparación con agua no contaminada con filtros solares, se utilizó agua purificada (agua de garrafón) como el control de las muestras de pozos.

- Muestras de hortalizas.

Se seleccionaron cultivos de hortalizas de agricultores orgánicos del mercado "Slow food", quienes implementan técnicas libres de pesticidas, por lo que el estudio persiguió dos objetivos:

- 1) verificar la ausencia de pesticidas en estos alimentos orgánicos y,
- 2) demostrar la presencia de filtros solares en las hortalizas, los cuales migraron debido al agua de riego de pozo empleada en su cultivo.

Antes de realizar el muestreo de las hortalizas, se verificó que las hortalizas de todos los invernaderos visitados fueran regadas con agua de pozo.

La recolección de las hortalizas se realizó tomándolas con la mano, cubriéndolas con papel aluminio, almacenadas en bolsas herméticas (Kaiser, et al. 2011). En la figura 7 se presenta el invernadero "Colectivo Milpa", ubicado en Montes Amé (Mérida, Yucatán).

Para realizar una comparación con hortalizas cultivadas con agua de riego diferente a la de la Península, se compraron hortalizas de un centro comercial de la Ciudad de Mérida, verificando que su origen fuera de Cuernavaca o Cd. de México; estas muestras durante todo el análisis fueron establecidas como control de la matriz.

En cada procesamiento de las hortalizas, se realizaron controles negativos, analizando los reactivos y disolventes empleados. En la tabla 6 se presentan las diferentes hortalizas colectadas.

Tabla 6. Hortalizas muestreadas en cada sitio.

Área de muestreo	Cholul	Col. Montes de Amé (en la Cd. de Mérida)	Timucuy	Centro Comercial
Hortalizas	Arúgula	Arúgula, espinaca y cebollín.	Pepino, cebollín, y arugula.	Cebollín, arugula y pepino

B) Preparación de las muestras

1. Muestras de agua de riego

Análisis dirigido por CLAR

Se llevó a cabo un enriquecimiento en EFS (Extracción en Fase Sólida), EFS es una técnica utilizada para el enriquecimiento de las muestras de agua (pozos), debido a que las concentraciones esperadas de bloqueadores solares en estas muestras, están dadas en ng/L y el sistema CLAR detecta $\mu\text{g/L}$, por lo tanto, esta técnica permite concentrar las muestras y trabajar con un volumen menor de muestra, al inyectar en el sistema CLAR. Con base en lo reportado en la literatura, los disolventes de elución más utilizados en RP-EFS son metanol, acetonitrilo o mezclas de disolventes, (Dimosthenis, Amparo & Chisvert, 2007; Ramos, Homem, Alves & Santos, 2015). Para la elección del disolvente adecuado se hicieron pruebas de recuperación (*vida supra, pag 46*). Se utilizaron cartuchos Xtrata fase reversa C-18U (Phenomenex Inc.) de 1g fase/6 mL, para el manejo de las muestras en lote se empleó una bomba de vacío (Felisa) y un sistema Manifold de 12 muestras (Phenomenex), el proceso general se ilustra en la fig 8. La técnica de Extracción en Fase Sólida se dividió en 5 pasos principales:

Tabla 7. Procedimiento en Extracción en Fase Sólida

Paso	Nombre	Descripción
1	Acondicionamiento	Activación de sorbentes hidrofóbicos. En este caso, se lavó con metanol y se acondicionó con agua (5 mL de cada fase móvil).
2	Carga de la muestra	C18, afinidad con compuestos de polaridad media y baja. Se aplicaron 8 L de agua de cada pozo, empleando el manifold
3	Lavado	Eliminación de compuestos que puedan interferir con los analitos. Se lavó el cartucho con agua grado HPLC tres veces.
4	Elución	Finalmente los analitos se eluyeron con una mezcla de disolventes MeOH/Diclorometano 1:1 (5 mL).
5	Concentración	El disolvente se evaporó en un Rotavapor Buchi R-215 para determinar rendimiento y se almacenaron en viales ámbar a -20 °C.

Confirmación y cuantificación de los filtros solares mediante CL-EMAR

5 mL de la muestra de agua de riego se liofilizaron. Se pesó la muestra obtenida y se reconstituyó en un mL de MeOH grado CL-EMAR, luego se realizaron diluciones con MeOH para tener un rango de ug a pg de la muestra y a cada una se le adicionó 40 µL del estándar interno deuterado (BP3-D5).

2. Muestras de hortalizas.

Una vez realizado el muestreo, las muestras de hortalizas se lavaron con agua destilada, se empaquetaron en papel aluminio y se congelaron a -70 °C (ultra congelador REVCO).

Extracción en frío con aplicación de sonicación

Las hortalizas previamente congeladas, se molieron y homogeneizaron hasta obtener un polvo fino en un mortero de porcelana, para enseguida pesar 10 g de cada muestra. A cada muestra se le añadió 40 mL de una mezcla de AcOEt/MeOH (70:30), se agitó manualmente durante 10 minutos y se sonicó 15 minutos (baño ultrasónico Branson 2510). En la fig 9, se ilustra el proceso de elaboración de extractos. La muestra se centrifugó a 5000 RPM por 10 minutos a 25 °C. Se recuperó el sobrenadante y finalmente se llevó a sequedad con un Rotavapor Buchi R-215 para determinar rendimiento.

Debido a la selectividad limitada de las extracciones basadas en disolventes, fue necesario realizar una limpieza exhaustiva antes del análisis instrumental.

Limpieza de los extractos de hortalizas

Debido a que las muestras de hortalizas son matrices demasiado complejas; por su alto contenido de pigmentos, vitaminas, lípidos, entre otros, y a que todos estos compuestos pueden interferir con la determinación y cuantificación de los analitos, es necesario recurrir a un tratamiento que ayude a eliminar estos coextractivos de las hortalizas, con el fin de tener una cuantificación eficiente.

Las muestras se reconstituyeron en 4 mL de AcOEt y se transfirieron a tubos de centrífuga de 15 mL Supel QuE Citrate (Supelco 55227-U, NaCl 1 g, MgSO₄ 0.9, Citrato, ver figura 10, en anexo I). Los componentes principales de este tipo de tubo QeChERS son:

1. Sulfato de magnesio anhidro/ Cloruro sódico: Mejora la recuperación del analito (incluidos compuestos bastante polares), al facilitar la partición líquido-líquido de los analitos en la fase orgánica (AcOEt), proporcionando una separación de fases sin dilución. Ayuda a controlar la polaridad, favoreciendo la separación de fases entre el agua y la fase orgánica.

2. Acetato de sodio: Regulación de pH
3. Sales de citrato: Se emplea para ajustar el pH a valores de 5.5, donde se extraen la mayoría de los compuestos ácidos y básicos.

Se agitó manualmente durante 2 min y se centrifugó a 5000 RMP durante 10 min a 25 °C, se recuperó el sobrenadante y se dividió en dos partes:

A) Análisis de los compuestos ácidos (HMS y OTS):

Una de las partes se llevó a sequedad con el Rotavapor, para determinar rendimiento. La muestra se reconstituyó en MeOH (1 mL) y de esta solución, se prepararon diluciones de 1, 10 y 100 µg/mL y se almacenaron en viales ámbar a -20 °C hasta el día de su análisis.

B) Análisis de los filtros solares no ácidos (BP3, AVO, OCT y OMC):

A la otra mitad se le dio un segundo tratamiento en otro tubo de centrifuga Supel QuE clean-up (Supelco 55464-U, con carbón grafitado 25 mg, silica gel poliamina (PSA) 150 mg), el cual contiene:

1. Sulfato de magnesio: Elimina exceso de agua residual
2. Amina primaria/secundaria (PSA): Elimina compuestos acídicos (ácidos orgánicos polares, azúcares, ácidos grasos y pigmentos de antocianinas)
3. Sorbente: C18, elimina interferencias no polares
4. Carbón negro grafitado (GCB): Elimina pigmentos (clorofilas y carotenoides).

Finalmente se llevó a sequedad con rotavapor Buchi R-215 (fig 11, anexo I) para determinar rendimiento. Las muestras se almacenaron en viales ámbar a -20 °C.

Etapa II. Análisis dirigido para la identificación de filtros solares por CLAR.

Las muestras preparadas, se reconstituyeron en un mL de metanol, y se inyectaron 20 μ L en el sistema CLAR, con las condiciones de separación previamente validadas, las cuales se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Condiciones de análisis validadas para la identificación de filtros solares por CLAR.

Sistema cromatográfico	Sistema CLAR Varian Polaris 211, que consta de dos bombas 211, detector de UV 315 programado a la longitud de onda máxima de cada filtro solar (BP3 (290 nm), OCT (306 nm), AVO (306 nm), OMC (360 nm), HMS (238 nm) y OTS (238 nm)), y colector de fracciones 701 e inyector automático 431. (Fig 12, Anexo I)
Fase	Reversa
Columna (Fase Estacionaria)	Luna C18 (Phenomenex, 5 μ m, 4.5 x 250 mm)
Fase Móvil	MeOH-Agua (82:18 v/v, método isocrático), flujo de 1mL/min por 43 minutos, volumen de inyección: 20 μ L

Etapa III. Análisis dirigido para la confirmación y cuantificación de filtros solares por CL-EMAR

Confirmación de la presencia de los filtros solares por CL-EMAR

Para el análisis, se migraron las condiciones empleadas en el sistema CLAR a un sistema CL-EMAR. Las condiciones de análisis se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones de análisis del detector de masas.

Sistema cromatográfico	Agilent 1260 LC acoplado a un detector de masas 6545 QToF/HRMS de alta resolución. (Fig 13).
Fuente de ionización	ElectroSpray (ESI) de tipo Jet, operado en modo negativo (ESI-) para filtros solares ácidos (aniónicos) (HMS y OTS), a la fase móvil se le adicionó 0.1% de hidróxido de amonio a las muestras (5mM) para inducir la ionización de los compuestos y en modo positivo (ESI+) para los filtros solares restantes (catiónicos), a la fase móvil se le adicionó 0.1% de ácido fórmico. (Zenker, Schmutz & Fent, 2008)
Fase móvil	MeOH/Agua (82:18)(v/v)
Voltaje del capilar	3500 V
Gas para secado	N ₂ , 10mL/min a 300 °C,
Gas de envoltura	10 mL/min 350 °C
Voltaje del nozzle	1000 V
Fragmentador	70 eV/1614 kcal/mol, Skimmer 65 V.
Estandares	121.0509 m/z (purine, C ₅ H ₅ N ₄) y 922.0098 m/z (hexakis (1H, 1H, 3H-tetrafluoropropoxy) phosphazine, C ₁₈ H ₁₉ O ₆ N ₃ P ₃ F ₂₄).

El masas fue operado en modo 2 GHz extendido, rango dinámico, y una velocidad de adquisición de 3 (all ions Ms/Ms). Las energías de colisión para el MS/MS en tándem se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Datos de la identificación de los filtros solares por Espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) y masas en tándem. Iones Identificadores y Cuantificadores. (Monitoreo de Reacción Múltiple-MRM)

Modo	Analito	RT (min)	EM, Transiciones ^a	Linealidad, R ₂
ESI+	BP-3	15.1	229.0 (45) --->151.0 (28)	0.9924
		15.1	229.0 (45) --->105.0 (28)	

	OCT	16.3	362.0 (48) --->250.0 (28)	0.9932
		16.3	362.0 (48) --->232.0 (12)	
	AVO	16.7	311.0 (45) --->161.0 (30)	0.9950
		16.7	311.0 (40) --->135.0 (30)	
	OMC	16.7	291.0 (35) --->161.0 (25)	0.9913
		16.7	291.0 (30) --->179.0 (17)	
ESI-	OTS	17.3	249.0 (38) --->93.0 (36)	0.9924
		17.3	249.0 (38) --->137.0 (25)	
	HMS	17.3	261.0 (38) --->93.0 (40)	0.9918
		17.3	261.0 (38) --->137.0 (30)	

La confirmación de los compuestos se realizó con la fragmentación de cada analito en la celda de colisión a una energía empleada (20 V) con nitrógeno ionizado en QTOF. Para cada compuesto se utilizaron los iones modo MS / MS, es decir, adquisición simultánea a baja (LE-Low Energy) y alta energía de colisión (HE-High Energy), que proporciona información útil sobre la molécula (des)protonada (comúnmente en LE), conocido como ión identificador y en el fragmento principal de iones (comúnmente en HE), conocido como ión cuantificador. Sobre la base de esta información y la distribución isotópica observada en los espectros, es factible una identificación confiable de los compuestos detectados en las muestras. (Munaretto, May, Saibt & Zanella, 2016)

B) Cuantificación de filtros solares por CL-EMAR

Para la cuantificación en CL-EMAR es necesario aplicar un estándar interno de la misma naturaleza que el analito, de alta pureza y que no eluya en el área de algún pico de interés. Generalmente se emplean los derivados deuterados, principalmente porque el detector si discrimina por peso molecular. Para el análisis se adicionaron 40 µL de una solución standard de 10 ng/mL como estándar interno (BP3-D5). Debido a los altos costos de los estándares

internos deuterados, únicamente fue posible la adquisición del estándar deuterado, BP3-5D, el cual, debido a sus características de ionización (condiciones ácidas, 0.1% ácido fórmico), se empleó para la cuantificación de los filtros solares no ácidos (BP3, AVO, OTC y OMC). Se realizó la curva de calibración de cada filtro solar y se calculó el área bajo la curva de cada bloqueador solar y del estándar deuterado. Luego se interpoló el cociente de áreas y el resultado se utiliza para calcular la concentración de cada bloqueador en la muestra.

Cada muestra se analizó en el sistema MassHunter B.06.00, mientras que el análisis cuantitativo se realizó en el módulo Quantitative MassHunter B.06.00 implementado en el MassHunter (Agilent technologies).

Etapas IV. Estudios de ecotoxicidad en pez cebra

Se diseñó una estrategia para evaluar los efectos toxicológicos de BP3, AVO, OMC y OTC en embriones de pez cebra, siguiendo la metodología descrita por Rodríguez Fuentes (Rodríguez Fuentes, G. *et al.*; 2015). Para ello, se evaluó la letalidad en el modelo de pez cebra (*Danio rerio*), y considerando que el organismo durante el desarrollo embrionario es transparente, se pueden evaluar diferentes parámetros, entre ellos, si se ven afectados los organismos en su morfología, latido del corazón, entre otros. En la figura 14, en el Anexo I, se muestran las etapas del desarrollo embrionario del pez cebra.

- Filtros solares a evaluar

Para el bioensayo, se seleccionaron los filtros solares que fueron cuantificados en las muestras tanto de agua como de hortalizas por CL-EMAR. De esta manera, se pesaron 10 mg de cada filtro solar (BP3, AVO, OMC y OTC) y se diluyeron en 1 mL de MeOH. De esta solución se tomaron 100 µL de cada uno y se aforaron a 1 mL con agua de garrafón [1000 µg/mL, 10% de MeOH]. De manera análoga se realizaron diluciones 1 a 10 empleando agua de garrafón

(rango de trabajo 100-0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$). De cada solución se tomaron 300 μL para aplicarlo a cada pozo de la microplaca y 2700 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de agua de garrafón (3 mL, por triplicado, concentraciones evaluadas: 100, 10 y 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Como control negativo se utilizó una solución al 10% de metanol y se diluyó con agua de garrafón de acuerdo con el esquema anterior. Los controles con metanol se realizaron debido a que según lo reportado por (Ferrer, A, 2005; Villegas del Ojo, y otros, 2011), la formación de metabolitos tóxicos (formaldehído y formato) que se producen por metabolización del metanol, en el hígado, son inhibidores de la enzima citocromo oxidasa, que está involucrada en el transporte de electrones en la cadena respiratoria, provocando acidemia formica, inhibición de la función mitocondrial en la retina provocando toxicidad visual y aumentando el estrés oxidativo, provocando acidosis metabólica. Por lo tanto, realizar controles con metanol, asegurará que los efectos determinados en este bioensayo, sean debidos únicamente a la exposición de las diferentes concentraciones de filtros solares evaluadas.

- Cuidado y mantenimiento de los organismos.

Este bioensayo se llevó a cabo bajo condiciones controladas en el Laboratorio de Ecotoxicología y Ecología Microbiana Costera, de la Unidad de Química en Sisal. Se utilizaron peces cebras comunes (wild type) de un año de crecimiento en peceras de vidrio de 40 L con aireación constante, separados por sexo (hembras y machos), con fotoperiodo de luz 14/10 (oscuridad/luz) y alimentados con comida comercial 2 veces al día y 1 vez al día con nauplios de *Artemia sp.*

- Apareamiento de los peces.

Todo el proceso se llevó en maternidades para peces con separación de vidrio (4) las cuales se colocaron en una pecera de 40 L con temperatura controlada (28°C) aeración y fotoperiodo de 14/10. Los peces se colocaron en una proporción de 2 Hembras 1 macho, un día antes (Westerfield, 2000). A la

mañana siguiente se quitaron las separaciones media hora antes de empezar el fotoperiodo de luz. Después de 2 horas se verificó la puesta de los embriones.

Los embriones fueron recolectados de las maternidades, se lavaron con agua para quitar las heces, y se colocaron en cajas Petri para determinar su estadio de crecimiento.

- Bioensayo

En una microplaca de 24 pozos (Eppendorf, estéril) se transfirieron 3 mL de cada solución a evaluar (100, 10, 0.1 ug/mL y un control de metanol con agua de garrafón). Luego se colocaron 6 embriones de entre 2 y 5 horas posfecundación (2-5-hpf). Luego la microplaca es incubada a temperatura ambiente de manera estática por 5 días.

Los efectos de los bloqueadores en el pez cebra se determinaron en un microscopio de contraste de fase invertido Primo Vert (Carl Zeiss) acondicionado con cámara de alta resolución Motic 10K. Se tomaron fotos de cada biotratamiento cada día, se observó la tasa de muerte y morfología durante 5 días (Kimmel, y otros, 1995). Al final de los 5 días, se contabilizaron los organismos muertos y se determinó la DL50 utilizando el programa PROBIT de la EPA.

Etapa V. Análisis no dirigido para la determinación de otros contaminantes

Debido a que en la península de Yucatán hay una creciente actividad agrícola y ganadera, especialmente por producción porcina, surgió la curiosidad de determinar si dentro de las muestras obtenidas también había algún otro tipo de CDE, como pesticidas o vacunas u hormonas, debido a que para determinar estos analitos se requiere de un pretratamiento y análisis de muestra muy similar al realizado para la determinación de filtros solares, se aprovechó el

pretratamiento realizado a las muestras, para implementar un método untargeted o no dirigido para la determinación de este tipo de compuestos.

El análisis no dirigido llevado a cabo se realizó en Cromatografía Líquida acoplado a Espectrometría de Masas de Alta Resolución con tiempo de vuelo cuadrupolo (LC-QTOF/HRMS). Para ello, se implementó el método desarrollado por Phenomenex para la cuantificación de 535 pesticidas por LC-MS (Hoja de aplicación 20035), (Phenomenex, 2019). Para ello, se implementaron las condiciones cromatográficas y se construyó la base de datos para la búsqueda automática de los pesticidas reportados en la hoja de la aplicación, empleando el software PCLD de MassHunter B.06.00 (Agilent Technologies).

- Creación de la base de datos PCLD

El método de selección de objetivos propuesto en este estudio se inició con la creación de un archivo csv (valores separados por comas) con la masa exacta monoisotópica teórica de los compuestos integrados en la base de datos de Phenomenex y que se evaluarán en este trabajo y la información del tiempo de retención (Tr). Para ello, cada compuesto se dibujó en el programa ACD/ChemSketch 2018.2.1 (ACDLbs, USA) y se calculó el $[M+H]^+$ de alta resolución que se determina en CL-EMAR. Después, se utilizó el formato que emplea MassHunter para comparar las masas e identificar a los pesticidas presentes en la muestra, de acuerdo al programa PCLD. En la tabla 11, a manera de ejemplo se presentan las primeras 20 moléculas de esta base creada.

Tabla 11. Base de datos creada para la identificación de los 535 pesticidas presentes en la hoja de análisis aplicación 20035 de Phenomenex. Solo se presentan las primeras 20 moléculas de la base de datos PCLD, de manera análoga se calcularon los pesos moleculares de alta resolución de las 535 moléculas.

No.	Fórmula	RT (min)	[M+H] ⁺	Nombre
1	C ₁₀ H ₁₁ N ₄ Cl	6.5	223.075	Acetamiprida
2	C ₅ H ₁₅ N ₂ O ₄ P	0.4	180.04	Glufosato
3	C ₃ H ₆ N ₂ S	0.4	103.032	Malica hidrazida
4	C ₂ H ₂ N ₄	0.5	85.0509	Aminotrol
5	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₃	0.5	143.0821	Daminozida
6	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	0.5	211.016	Prohexadiona
7	C ₆ H ₃ Cl ₂ NO ₂	0.7	191.9614	Clopyralida
8	C ₃ H ₆ N ₂ S	0.6	103.0324	Etilenetiourea
9	C ₄ H ₁₀ NO ₃ PS	1.0	184.019	Acefato
10	C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₃	1.0	262.1185	Imazapyr
11	C ₂ H ₈ NO ₂ PS	0.8	142.008	Methamidopos
12	C ₁₄ H ₁₃ NO ₇ S	1.1	340.0485	Mesotriona
13	C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S	1.4	163.0537	Oxamyl Oxima
14	C ₃ H ₇ NOS	1.3	106.0321	Methomyl oxima
15	C ₆ H ₁₁ N ₅ O	1.6	170.1036	Atrazine-desethyl-hydroxy
16	C ₆ H ₁₀ N ₆	1.6	167.1039	Cyromasina
17	C ₁₄ H ₁₃ ClO ₅ S	2.1	329.0245	Sulcotriona

18	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₄ S	1.8	223.074	Aldoxycarb
19	C ₁₁ H ₈ ClNO ₂	2.2	222.0316	Quinmerac
20	C ₁₁ H ₁₅ ClN ₄ O ₂	2.6	271.0956	Nitempyram

- Condiciones de análisis.

En la tabla 12, se presentan las condiciones de análisis implementadas en CL-EMAR, según lo reportado en la Hoja de aplicación 20035, (Phenomenex, 2019).

Tabla 12. Condiciones de análisis implementadas

Columna	Synergy Fusion-RP C18 de 100 Å (50 x 2 mm con 2.5 μm de tamaño de partícula)		
Fase Móvil	ESI+, con una mezcla de Agua-MeOH (90:10, 5mM formato de amonio) como fase móvil A, y como fase móvil B MeOH-Agua (90:10, 5mM formato de amonio) con gradiente (Tabla 12)		
Flujo	0.4 mL/min a 40 °C		
Gradiente			
Paso	Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
1	0	100	0
2	1	100	0
3	15	0	100
4	18	0	100
5	18.05	100	0
6	20	100	0

Se inyectaron 5 μL de cada muestra en el sistema CL-EMAR, con las mismas condiciones de adquisición en el detector de masas (Tabla 13).

Tabla 13. Condiciones de adquisición en detector de masas.

Voltaje del capilar	3500 V
---------------------	--------

Gas para secado	N ₂ , 10mL/min a 300 °C,
Gas de envoltura	10 mL/min 350 °C
Voltaje del nozzle	1000 V
Fragmentador	70 eV/1614 kcal/mol, Skimmer 65 V.
Estandares	121.0509 m/z (purine, C ₅ H ₅ N ₄) y 922.0098 m/z (hexakis (1H, 1H, 3H-tetrafluoropropoxy) phosphazine, C ₁₈ H ₁₉ O ₆ N ₃ P ₃ F ₂₄).

Dadas las condiciones de análisis (ESI+), las muestras que se sometieron al análisis no dirigido, únicamente fueron las muestras tratadas con PSA (para la determinación de filtros solares no ácidos).

- Identificación de los pesticidas presentes en las muestras (Non targeted análisis)

Cada muestra fue analizada mediante el software Qualitative Analysis implementado en MassHunter (Agilent technologies, USA). Una vez abierto el archivo de cada análisis se procedió a utilizar el protocolo de búsqueda de componentes por comparación de bases de datos (MFE searching compounds).

La detección automática se realizó con base en el estudio de (Munaretto, May, Saibt & Zanella, 2016), con ventana de tiempo de retención de $\pm 0,4$ min y tolerancia de masa de 5 ppm. El software Qualitative MassHunter B.06.00 también incluye valores de puntuación en la búsqueda, que se calculan teniendo en cuenta las masas precisas y la distribución isotópica, donde los valores más altos significan una composición elemental más plausible. Los valores de puntuación inferiores al 70% no se consideraron resultados positivos. La búsqueda de los contaminantes se llevó a cabo mediante la formación de iones protonados [M+H]⁺, aductos de amonio [M+NH₄]⁺ y/o sodio [M+Na]⁺. La precisión de la masa se calculó mediante el software que comparó la masa teórica y la masa experimental obtenida, y el resultado se da en partes por millón (ppm).

5. Resultados y Discusión

Etapa I. Validación parcial rápida del método analítico desarrollado por Osorio, E. 2017.

- Linealidad (Curva de calibración).

Inicialmente se realizó la curva de calibración de cada filtro solar con las condiciones reportadas por Osorio-León, E. 2017, pero conforme se llevaron a cabo las curvas de calibración de cada filtro solar, los parámetros se fueron cambiando debido a que, bajo las condiciones reportadas, los últimos dos picos, correspondientes a los filtros solares ácidos (HMS y OTS), no se lograban separar adecuadamente. De esta manera, los cambios realizados en el método de análisis fueron: el tiempo de análisis que se modificó de 20 min a 43 min y la proporción de la fase móvil MeOH/agua, la cual se cambió de 88:12 (v/v) a 82:18 (v/v).

Finalmente, las condiciones óptimas para la identificación de los 6 filtros solares fueron: Fase estacionaria en columna Luna C18 (Phenomenex, 5 μ m, 4.5 x 250 mm). Fase móvil MeOH-Agua (82:18 v/v), flujo de 1mL/min mediante método isocrático por 43 minutos, vol de inyección 20 μ L.

Se realizaron 6 inyecciones de 0.5, 1, 10 y 20 μ g/mL de cada filtro solar, en total, 24 inyecciones en el sistema CLAR, además se inyectó una solución blanco (fig 16), con la finalidad de determinar la especificidad del método. En la figura 15 se presenta el cromatograma de la solución estándar de 10 μ g/mL, del cromatograma se obtienen los tiempos de retención de cada bloqueador (t_r , en min), el área bajo la curva (Area, en Mau.Min), presentados en la tabla 14.

Tabla 14. Datos obtenidos del cromatograma generado mediante la inyección de un estándar de los seis filtros solares de estudio a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Index	Name	Time [Min]	Quantity [% Area]	Height [mAU]	Area [mAU.Min]	Area % [%]
6	BP3	7.23	17.40	48.0	12.6	17.403
7	OCT	22.19	7.90	10.4	5.7	7.902
8	AVO	27.31	17.34	14.6	12.5	17.342
9	OMC	30.29	16.55	16.7	12.0	16.549
11	HMS	36.96	9.22	8.1	6.7	9.217
12	OTS	40.28	7.74	6.2	5.6	7.738
Total			100.00	132.2	72.4	100.000

Las curvas estándares de cada bloqueador se construyeron mediante el análisis estadístico de regresión lineal, las cuales se presentan en la Tabla 15, junto con el tiempo de retención de cada filtro solar y el área bajo la curva (ABC) de cada concentración, la linealidad del método, el límite de detección y cuantificación. Las gráficas de cada una de las soluciones estándar se presentan en la figura 17.

Tabla 15. Resultados de la curva estándar de cada filtro solar, LOD (Límite de detección) = 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, LOQ (Límite de cuantificación) = 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tr (min)	7.17	21.84	26.88	29.83	36.43	39.7
Filtros	BP3	OCT	AVO	OMC	HMS	OTS
$[\mu\text{g}/\text{mL}]$	Área bajo la curva [mAu*min]					
0.5	4.8	0.5	0.8	0.95	0.7	0.4
1	4.4	1.2	2.5	2.6	2.2	1.4
10	10.4	5.9	10.2	12.8	7.4	5.5
20	24.3	11.4	19.6	25.3	14.1	11.1
Ecuación de la recta						

Filtros	BP3	OCT	AVO	OMC	HMS	OTS
m=	0.994	0.551	0.935	1.221	0.657	0.527
b=	3.168	0.426	0.930	0.799	0.924	0.465
R²	0.961	0.999	0.997	0.998	0.994	0.994

Como se observa en la figura 17 y tabla 15, y dadas las características de la columna Luna C18 (de carácter no polar) y los tiempos de retención de cada compuesto, se puede inferir que la Benzofenona-3 es el compuesto más polar, es decir, el menos afín a la columna debido a que eluyó primero, octocrileno, avobenzona y octilmetoxicinamato son compuestos medianamente polares y finalmente homosalato y octisalato son compuestos con mayor carácter no polar, fueron los más afines a la fase estacionaria.

En el cromatograma de la solución blanco (fig 16), se asegura la especificidad del método, es decir, que tanto el equipo como los disolventes utilizados no presentan ninguna contaminación con alguno de los 6 filtros solares en estudio, con lo cual, los filtros solares que se logren identificar mediante CLAR, únicamente provienen de las muestras analizadas.

- Calibración del proceso de extracción (Porcentaje de recuperación de analitos en EFS)

La primera vez que se realizó la recuperación de analitos se pasaron 500 mL de soluciones de concentraciones 20 y 100 µg/mL, usando la metodología validada por Osorio (Osorio-León, E. 2017), pero al analizar las muestras en el equipo CLAR, no se lograban ver los últimos 2 compuestos correspondientes a HMS y OTS, así que se optó por cambiar la mezcla de disolventes para eluir los compuestos. Se evaluaron acetato de etilo/metanol (1:1) y diclorometano/metanol (1:1), siendo la última, la que tuvo mejor capacidad de eluir a los compuestos.

El cromatograma del recobro de 20 µg/ mL y 100 µg/mL, se muestra en la figura 18 y 19, respectivamente.

Como se observa en las figuras 18 y 19, los picos obtenidos de cada filtro solar tienen una buena resolución y los dos últimos picos, correspondientes a los compuestos de homosalato (HMS) y octisalacilato (OTS), si se logran extraer con esta mezcla de disolventes (metanol/diclorometano 1:1). Con el área de cada filtro solar, se calculó el porcentaje de recobro o recuperación de analitos (como ejemplo para realizar el cálculo, se tomaron las áreas del cromatograma de la solución de 100 µg/mL (tabla 16).

Tabla 16. Resultado de los picos obtenidos en el recobro de la solución de 100 ug/mL.

Index	Name	Time [Min]	Quantity [% Area]	Height [mAU]	Area (ABC) [mAU.Min]	Area % [%]
4	BP3	7.29	22.27	452.0	99.9	22.272
5	OCT	22.47	11.57	92.3	51.9	11.574
6	AVO	27.62	25.11	150.8	112.6	25.112
7	OMC	30.68	24.02	149.6	107.7	24.022
9	HMS	37.44	7.17	38.5	32.1	7.167
10	OTS	40.81	7.19	36.0	32.2	7.188
Total			100.00	944.8	448.4	100.000

Con la ecuación de la recta de cada filtro solar (tabla 15), se calculó el %Recobro de cada filtro solar:

Ejemplo de cálculo para calcular el %Recobro de BP3:

$$[BP3] = \frac{ABC - b}{m} = x$$

$$[BP3] = \frac{99.9 - 3.168}{0.9945} = 97.2667 \text{ ug/mL}$$

100% ----- 100 ug/mL

X-----97.2667 ug/mL

%Recobro BP3= 97.2667%

En la fig 20, se muestra una comparación de los porcentajes de recobro obtenidos con cada disolvente (MeOH/DCM (1:1), MeOH/AcOEt (1:1), MeOH/AcOEt (1:1) con cartucho seco). Comparando los tres métodos de Extracción en Fase Sólida, el disolvente más adecuado para la extracción de filtros solares es la mezcla metanol/diclorometano (1:1). Por lo tanto, bajo estas condiciones se realizó el tratamiento de las muestras de agua en EFS. El porcentaje de recuperación de cada filtro solar, para este método de elución, se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Porcentaje de recuperación usando diclorometano/MeOH (1:1)

Filtro solar	%Recuperación
BP3.- Benzofenona/Oxibenzona	97.3
OCT.- Octocrileno	93.5
AVO.- Avobenzona	119.3
OMC.- Octil-metoxicinamato/Octixinato	87.6
HMS.- Homosalato	50.2
OTS-2.- Octil salicilato/octisalato	60.2

A pesar de que los dos últimos compuestos se logran extraer, no se extraen eficientemente, ya que sus porcentajes de recobro están por debajo del 70% y el recobro de avobenzona está sobrevalorado, sin embargo, esta dentro de los límites estadísticos, debido a que, al tratarse de un método analítico de matrices complejas, cuando el estándar de control de extracción excede del 70% de recuperación, se cumple el criterio de calidad para una extracción

eficiente, (Zenker, Schmutz & Fent, 2008). Lo anterior se debe a que las muestras analizadas provienen de ambientes acuáticos, ambientes demasiado complejos en cuanto a las moléculas que pueden estar presentes en ellos, de esta manera, existen moléculas que son de polaridades semejantes o análogos que eluyen en el mismo tiempo de retención, es factible que se pueda tener mayor cantidad de compuesto o que este sobrevalorado por errores aleatorios, por lo que se acepta hasta un 20 % de error. (Dimosthenis, Amparo & Chisvert, 2007; Ramos, Homem, Alves & Santos, 2015).

Etapa II. Análisis dirigido para la identificación de filtros solares por CLAR

Después de haber preparado las muestras de agua y hortalizas y una vez verificado el método de análisis, las muestras se inyectaron en el equipo CLAR (20 μ L). Los filtros solares cuantificados y detectados en las muestras de agua de riego por medio de CLAR, se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Concentraciones en ng/L de filtros solares obtenidas en muestras de agua de pozo de riego de la Península de Yucatán. ND: No detectado, D: detectado.

Tiempo de retención (min)	Filtro solar	Concentración filtro solar ng/L agua		
		Montes Ame	Timucuy	Cholul
7.17	BP3	783.20	D	ND
21.84	OCT	ND	243.87	ND
26.88	AVO	3,949.41	223.05	ND
29.83	OMC	ND	D	ND
36.43	HMS	ND	271.00	289.94
39.7	OTS	ND	ND	ND

Para ejemplificar la manera en la cual se realizó la identificación de los filtros solares en las muestras tanto de agua como de hortalizas, en la figura 21, Anexo I, se presenta el cromatograma correspondiente a la muestra de agua del invernadero ubicado en Montes Amé, "Colectivo Milpa". En la Tabla 19 se muestran los resultados de los picos de los filtros solares identificados en esta muestra de agua.

Tabla 19. Resultado de los picos del cromatograma de la muestra de agua de pozo del Colectivo Milpa, ubicado en Montes Ame.

Index	Name	Time [Min]	Quantity [% Area]	Height [mAU]	Area [mAU.Min]	Area % [%]
6	BP3	7.50	3.88	10.2	2.1	3.876
9	AVO	27.89	56.52	40.6	30.5	56.524
Total			100.00	97.4	54.0	100.000

Del cromatograma y el resultado de los picos, se identifica un pico que eluye con un tiempo de retención de 27.89 min. Comparando este tiempo de retención con los obtenidos en las curvas de calibración de cada filtro solar (*vida supra*, pag 66), posiblemente esté presente avobenzona en la muestra de agua de riego del invernadero ubicado en Montes Amé.

El área bajo la curva de los filtros solares identificados en las muestras se interpola en su correspondiente curva de calibración para determinar su concentración. Así, por ejemplo, El ABC de AVO en agua de pozo del invernadero ubicado en Montes Amé es de 30.5 mAU/min, se interpoló en la ecuación de la recta de avobenzona ($y=0.9359x + 0.93$), y considerando las diluciones, la concentración determinada es de 3.95 µg/L. El ejemplo de cálculo se muestra a continuación:

$$[AVO] = \frac{30.5 - 0.93}{0.9359} = 31.595 \text{ ug en } 8 \text{ L de agua de pozo}$$

$$\frac{31.595 \text{ ug}}{8 \text{ L agua}} = 3.949 \frac{\text{ug}}{\text{L}} = 3,949.41 \frac{\text{ng}}{\text{L}}$$

En la tabla 20 y 21 se muestran los filtros solares identificados y cuantificados por CLAR en cada una de las muestras de cada sitio.

Tabla 20. Identificación de filtros solares en agua de riego y hortalizas muestreados en la península de Yucatán, mediante CLAR. Concentraciones en ng/L (ppt)

Filtro solar	Cholul		Montes Amé				Timucuy				
	Agua	Arúgula	Agua	Arúgula	Cebollín	Espinaca	Agua	Arúgula	Cebollín	Pepino sin cáscara	Pepino con cáscara
BP3	D	ND	783	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND
OCT	D	ND	ND	ND	ND	ND	244	ND	ND	ND	ND
AVO	D	ND	3,949	ND	ND	ND	223	ND	ND	ND	ND
OMC	D	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND	ND	ND
HMS	290	ND	ND	ND	ND	ND	271	ND	ND	ND	ND
OTS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	D	ND	ND

Tabla 21. Identificación de filtros solares en controles de hortalizas (Centro Comercial)

Hortalizas de Centro Comercial				
Filtro solar	Cebollin	Arúgula	Pepino sin cáscara	Pepino con cáscara
BP3	ND	ND	ND	ND
OCT	ND	ND	ND	ND
AVO	ND	ND	ND	ND
OMC	ND	ND	ND	ND
HMS	ND	ND	ND	ND
OTS	ND	ND	ND	ND

Aunque no fue posible cuantificar algunos filtros solares en las aguas de riego y en hortalizas de todos los sitios, el análisis por CL-EMAR servirá para confirmar la presencia o ausencia de los filtros solares en las muestras, ya que es posible que los filtros solares se encuentren en cantidades menores a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (LOD, LOQ CLAR) y el detector de masas tiene una sensibilidad mayor para detectar concentraciones que van desde nanogramos hasta fentogramos.

Etapa III. Análisis dirigido para la confirmación y cuantificación de filtros solares por CL-EMAR

A) Confirmación de la presencia de filtros solares por CL-EMAR

Al realizar el análisis de las muestras en el equipo de CL-EMAR, primero se inyectó el estándar de 100 ng/mL, para determinar los tiempos de retención de cada compuesto, operando en modo positivo, a fin de determinar los compuestos no ácidos (BP3, OCT, AVO y OMC).

Se añadió 0.1% ácido fórmico a la fase móvil para realizar la ionización de los compuestos, condición necesaria para realizar el análisis por masas, dado que la detección es por relación masa carga (m/z , se detecta iones $[M+H]^+$). En la figura 22, se muestra el cromatograma (iones totales, ó TIC) de la curva estándar de 100 ng/mL de BP3, AVO, OCT y OMC.

Como se observa en la figura 22, en el cromatograma aparecen 4 picos no muy bien definidos, por lo que se llevó a cabo la extracción del ión pseudo-molecular de cada filtro solar en el cromatograma (EIC, en inglés,) en modo positivo $[M+H]^+$. En la figura 23, se muestran los cromatogramas en modo EIC, de cada filtro solar en modo positivo.

No fue posible identificar a los derivados de salicilato (HMS y OTS) con esta metodología, dado que no se ionizan con ácido fórmico. Por lo anterior, se desarrolló el método en modo negativo, para lo cual, fue necesario añadir 0.1% hidróxido de amonio a la fase móvil. En la figura 24 se muestra el

cromatograma (iones totales, ó TIC) de la curva estándar de 100 ng/mL de OTS y HMS. La identificación de los analitos se realizó al buscar el pseudo ion molecular en modo negativo [M-H]-, cromatogramas EIC, figura 25.

En la Tabla 22, se muestra el peso molecular de alta resolución de cada filtro solar, así como su respectivo ión [M+H]+, o bien, en su caso, el ión [M-H]-. Con estos iones y, además, el tiempo de retención de cada filtro solar en CL-EMAR, se identificó la presencia de cada filtro solar en las muestras.

Tabla 22. Tiempos de retención y pesos moleculares de los iones [M+H]+ y [M-H]- de cada filtro solar, por CL-EMAR.

Filtro solar	Tiempo de retención	PM (alta resolución)	[M+H]+ (alta resolución)	[M-H]- (alta resolución)
BP3	3.42	228.2432	229.0859	-
OCT	8.97	361.4766	362.2114	-
AVO	12.25	310.3868	311.1641	-
OMC	12.80	290.3972	291.1954	-
OTS	10.05	250.3333	-	249.1496
HMS	10.24	262.3440	-	261.1496

Para ejemplificar la manera en la cual se realizó la confirmación de filtros solares por CL-EMAR, en la figura 26 se muestra el cromatograma (TIC) de la muestra de pozo de agua de Timucuy.

En el cromatograma no se observa la presencia de ningún pico bien definido, por lo que se llevó a cabo la extracción del ion pseudo-molecular de cada filtro solar en el cromatograma tanto en modo positivo ([M+H]+), como negativo ([M-H]-). Al realizar las extracciones (EIC), solo se encontró la presencia de avobenzona en la muestra, ya que se observó un pico en 12.295 min, el cromatograma se presenta en la figura 27.

Para asegurar la presencia de avobenzona, se extrajo el espectro de masas del pico presentado en la fig 27, en el cual se buscó la presencia del ión $[M+H]^+$ teórico de 311.1641 m/z, correspondiente a avobenzona. El espectro de masas se muestra en la figura 28, en donde se obtuvo una $[M+H]^+$ experimental de 311.1651, con lo cual se asegura la presencia de avobenzona en la muestra.

B) Cuantificación de filtros solares por CL-EMAR

Otro de los objetivos planteados en esta tesis, fue, después de confirmar la presencia de filtros solares tanto en agua como en hortalizas, realizar la cuantificación de estos filtros solares, con la finalidad de llevar a cabo un bioensayo de ecotoxicidad en pez cebra (*Danio rerio*) y de esta manera, evaluar si la presencia de filtros solares en hortalizas representa un riesgo alimentario para la población de la península de Yucatán, por lo tanto, se pretende determinar la probabilidad de que las concentraciones encontradas, generen un efecto nocivo para la salud y de ser así, evaluar la gravedad de dicho efecto, como consecuencia de la migración de filtros solares en alimentos.

Para realizar la cuantificación de los filtros solares confirmados por medio de CL-EMAR, fue necesario la adición de un estándar interno de alta pureza y con la misma naturaleza química de los analitos, en este caso, por los elevados costos de los estándares deuterados de alta pureza, se utilizó únicamente un estándar deuterado de BP3-D5 (benzofenona-3, con cinco deuterios), por lo tanto, únicamente fue posible la cuantificación de los filtros solares no ácidos (tratadas con PSA). Primero se construyó una curva de calibración de 3 puntos preparando estándares de BP3, AVO, OCT y OMC (10, 20, y 40 ng/mL de cada uno) y adicionándoles 40 μ L del estándar interno (BP3-D5, 10 ng/mL) a cada uno, respectivamente. Las curvas de calibración de cada filtro solar se muestran en la tabla 23. En la fig 29 se muestra la curva de calibración del filtro solar OMC.

Tabla 23. Curvas de calibración de los filtros solares no ácidos

Filtro solar	BP3	AVO	OCT	OMC
m	1.029378	0.351261	0.195222	0.076710
b	-0.750931	1.559966	-0.158038	-0.074808
R ²	0.99887216	0.95517645	0.99831938	0.99938197

Para realizar la cuantificación de filtros solares en las muestras, a cada una de las muestras pretratadas se les adicionó la misma concentración del estándar interno, es decir 40 μL de una solución de 10 ng BP3-D5/mL. Se realizó la curva de calibración de cada filtro solar y se calculó el área bajo la curva de cada bloqueador solar y del estándar deuterado. Luego se interpoló el cociente de áreas y el resultado se utiliza para calcular la concentración de cada bloqueador en la muestra.

En la fig 30, se muestra el cromatograma EIC de la muestra de espinaca de "Colectivo Milpa", realizando la búsqueda del ion pseudomoléculas $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{teórico}}$ de 291.1957 (correspondiente a OMC), se observa una señal en el minuto 14.652, posteriormente, se llevó a cabo la extracción del ión pseudo molecular, con la finalidad de identificar ese ión en el espectro de masa. El espectro de masas de esta muestra se observa en la fig 31, obteniendo un ión $[\text{M}+\text{H}]^+_{\text{experimental}}$ de 291.1954, por lo tanto, de esta manera se determinó la presencia de OMC.

Para realizar la cuantificación de los filtros solares se utilizó el Software Quantitative de MassHunter, del programa, se obtuvo la concentración de cada filtro presente en la muestra, y considerando las diluciones realizadas, se calculó la concentración de los filtros solares en cada hortaliza, los valores se presentan en la tabla 24 y 25.

Tabla 24. Datos de la cuantificación de filtros solares presentes en las hortalizas y agua de riego. Las concentraciones se expresan en $\mu\text{g}/\text{kg}$ hortaliza y $\mu\text{g}/\text{L}$ agua (ppb) ND: no detectado.

Filtro solar	Cholul		Montes Amé				Timucuy				
	Agua	Arúgula	Agua	Arúgula	Cebollín	Espinaca	Agua	Arúgula	Cebollín	Pepino sin cáscara	Pepino con cáscara
BP3	ND	ND	ND	ND	ND	10.57	7.00	ND	ND	ND	9.27
OCT	ND	ND	ND	ND	ND	55.61	11.97	ND	ND	ND	43.91
AVO	ND	ND	ND	ND	ND	9.86	41.52	ND	ND	ND	18.99
OMC	ND	ND	ND	ND	ND	18.26	ND	ND	ND	ND	13.81

Tabla 25. Datos de la cuantificación de filtros solares presentes en las hortalizas control (Centro Comercial). Las concentraciones se expresan en $\mu\text{g}/\text{kg}$ hortaliza (ppb) ND: no detectado.

Hortalizas de Centro Comercial				
Filtro solar	Cebollín	Espinaca	Pepino sin cáscara	Pepino con cáscara
BP3	ND	7.32	ND	10.34
OCT	ND	20.50	ND	138.48
AVO	ND	18.34	ND	40.00
OMC	ND	ND	ND	5.21

Los resultados del análisis por CL-EMAR no mostraron la presencia de ningún filtro solar para las muestras del invernadero ubicado en Cholul, tanto de agua como de hortalizas. Este resultado se puede deber a que la zona muestreada está cercana a la región impactada por el cráter en Chicxulub, en la cual, el tiempo de residencia del agua subterránea es corto, ya que se lleva a cabo un recambio constante, por lo tanto, los filtros solares no se retienen mucho tiempo en esta región.

Por otra parte, en el caso del agua de riego de Montes Amé no se confirmó la presencia de ningún filtro solar, pero, por el contrario, se cuantificaron los cuatro filtros solares no ácidos BP3, OCT, AVO y OMC, en la muestra de espinaca de este invernadero, en concentraciones de 10.57, 55.61, 9.86 y 18.26 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente. Estos resultados se pueden deber a que se tomaron muestras puntuales de agua de riego. En el caso de las hortalizas, los periodos de siembra y cosecha son de al menos dos meses, tiempo en el cual las hortalizas están sujetas a riego con agua proveniente del agua subterránea que puede presentar variaciones de filtros solares de acuerdo a la época de lluvias y sequías, por lo que la concentración de filtros solares no es constante. Por lo anterior, es probable que al momento de regar estas hortalizas se hayan regado con agua con un mayor contenido de filtros solares y por tal motivo, al realizar su análisis, si se encontraron en las hortalizas, pero no en el agua.

Por otro lado, en las muestras de pepino con cáscara obtenidas del Centro Comercial se cuantificaron los cuatro filtros solares no ácidos BP3, OCT, AVO y OMC, en concentraciones de 10.34, 138.48, 40.00 y 5.21 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente, y en espinaca solo BP3, OCT y OMC, en concentraciones de 7.32, 20.5 y 18.34 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente, por lo que esta contaminación se puede deber a los plásticos en los que estos productos son comercializados. En el caso de la espinaca, debido a que la muestra obtenida es comercializada en bolsas de plástico y según lo reportado por Gago Ferrero P. , 2013, actualmente se utilizan filtros solares en empaques para aumentar la vida de anaquel de los productos, sobre todo, de aquellos que son sensibles a la radiación solar y que son cultivados en otros estados, por lo que, se implementan estas alternativas para garantizar la vida de anaquel de los productos desde su recolección hasta la llegada al consumidor final, de manera que, en el caso de la espinaca, es muy probable que la migración de filtros solares sea debido a los empaques. Por otro lado, debido a que la muestra de pepino no se comercializa en bolsas ni en un empaque que lo proteja, es

posible, que, al llegar al Estado de Yucatán, se realice un lavado de estos frutos con agua contaminada y de esta manera, los filtros solares pueden llegar a estos alimentos. Para el caso de estas muestras control no es posible confirmar de dónde se deriva la contaminación, debido a que se desconoce cómo es el control de estas hortalizas, desde su cultivo hasta su comercialización. Es posible que las dos vías mencionadas anteriormente sean las más comunes, pero para asegurar cual es el vector de contaminación, se sugiere realizar un control completo de la producción de estas hortalizas.

Finalmente, los resultados obtenidos del invernadero ubicado en Timucuy demuestran una clara migración de los filtros solares desde el agua de riego a las hortalizas, específicamente, en el pepino. Debido a que las concentraciones de filtros solares determinadas en agua de riego de este sitio fueron de 7.00 μg BP3/L, 11.97 μg OCT/L y 41.52 μg AVO/L. Por otro lado, en la muestra de pepino con cáscara se determinaron las siguientes concentraciones de filtros solares: 9.27 μg BP3/kg, 43.91 μg OCT/kg, 18.99 μg AVO/kg y 13.81 μg OMC/kg. Como se observa, en el agua de este sitio no se determinó la presencia de OMC, pero si, en la muestra de pepino, lo cual se debe al flujo continuo de agua subterránea y a que la concentración de los diferentes filtros solares no es constante, ya sea por sus características lipofílicas, por reacciones de foto degradación de los propios filtros solares, o bien, por la velocidad del flujo del agua, debido a que el muestreo se realizó de manera puntual y en el agua no hay una trazabilidad de los contaminantes.

La principal razón por la cual se encontraron filtros solares en las muestras de pepino con cáscara, se debe a que el pepino (*Cucumis sativus L.*) es una hortícola que dentro de la cáscara (superficie hidrofóbica) contiene lenticelas, las cuales permiten la entrada de oxígeno y el intercambio gaseoso entre los tejidos internos y el exterior, por lo tanto, estas estructuras provocan que el fruto se marchite más fácilmente debido a la pérdida de agua a través de la

respiración del fruto, disminuyendo la frescura y la turgencia (textura), se acelera la pérdida de vitamina A y C y disminuye su peso, lo cual repercute en la calidad del producto y su venta (Walter et al; 1990). Por tal motivo, y para reducir estos problemas, los productores enceran estos productos durante el proceso de selección, posterior al lavado y secado. Por lo tanto, al ser una superficie cerosa, sumamente hidrofóbica, los filtros solares quedan retenidos dentro de esta capa de carácter no polar. De esta manera se plantea la acumulación de filtros solares en la cáscara del pepino, lo cual concuerda con lo esperado, ya que la superficie hidrofóbica de esta hortaliza solamente es la cáscara, los filtros solares encontrados solo se determinaron en esta superficie y en las muestras sin cáscara no se determinó ningún filtro solar, por lo tanto, aunque el haber cuantificado filtros solares en pepino con cáscara habla de un riesgo alimentario, al confirmar ausencia de filtros solares en pepino sin cáscara, la alternativa más segura es consumirlos sin cáscara, debido a que estos compuestos no tienen la capacidad de migrar a la pulpa de pepino.

Por otro lado, la presencia de filtros solares en las muestras de espinaca (*Spinacia oleracea*) se puede deber, a las características hidrofóbicas de la membrana celular, compuesta principalmente por ácidos grasos insaturados y, además, dentro de la estructura de la espinaca se encuentran isoprenoides, es decir, vitaminas liposolubles, principalmente K (0.6 mg/100g espinaca), vitamina D₂ (ergocalciferol) y provitamina A, debido a que la vitamina A no está presente como tal en vegetales, pero se encuentra como provitaminas o precursores de carotenoides, generalmente expresada como equivalentes del retinol, en la espinaca hay alrededor de 8,100 µg retinol/100 g de espinaca. Además, dentro de la espinaca hay presencia de pigmentos liposolubles como β-caroteno y clorofila (Badui Dergal, S. 2013; Fundación Española de la Nutrición. 2013), Todos estos compuestos son altamente no polares y al tener una polaridad similar a la de los filtros solares, los filtros solares quedan

retenidos dentro de esta estructura liposoluble (Theodore L. Brown; 2009, Química la Ciencia Central).

Cabe mencionar que no todos los filtros solares fueron cuantificados, debido al estándar que se usó y las condiciones de análisis no fue posible la cuantificación de los filtros solares ácidos, además, las concentraciones determinadas fueron muy diversas, lo cual se debe en primer lugar a las características lipofílicas de cada filtro solar y a las características de la matriz en la cual se bioacumulan, de esta manera, las concentraciones más altas encontradas en hortalizas corresponden al filtro solar OCT, las cuales van de 20.50-138.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y esto se puede deber a que es el filtro solar con el $\log k_{ow}$ más alto, de 7.35, por lo tanto, su carácter lipofílico es elevado y es más afín a bioacumularse en las superficies lipídicas, en comparación con los otros filtros solares.

Comparando las características de OCT con BP3, la cual se determinó en concentraciones de 7.32-10.57 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en hortalizas. BP3 es un filtro solar con un carácter lipofílico menor que OCT, al tener un $\log k_{ow}$ de 3.79, es menos afín a las superficies lipofílicas, por lo tanto, su nivel de bioacumulación es menor. (*vida supra*, pág. 42), estas características se pueden ver con mayor claridad, en la fig. 17, en donde se observa la diferencia de polaridad de los seis filtros solares, BP3 es el compuesto más polar, octocrileno, avobenzona y octilmetoxicinamato son compuestos medianamente polares. Además, en agua, se determinó una concentración de 7.0 μg BP3/L y 11.92 μg OCT/L. Ante el análisis anterior, se esperaría que las concentraciones encontradas en agua sean mayores para BP3, pero no ocurrió así, debido posiblemente a que, según lo reportado por Jurado, Gago-Ferrero, Vázquez-Suñé, M.Silvia, & Díaz-Cruz., 2014., se sugiere que bajo las condiciones redox de los acuíferos, en aguas subterráneas, los filtros solares como la benzofenona y sus derivados sufren algún tipo de proceso de óxido-reducción que las transforma, o puede llegar a eliminarlas completamente. Además, en ese mismo estudio, se reportó que

los filtros solares tienen diferentes características móviles, las cuales dependen de su estructura, por ejemplo, en el caso de los compuestos aniónicos, como los derivados de la benzofenona (BP4, BP2 y 4DHB), al tener un carácter hidrófilo, son móviles y tienen a fluir con facilidad en el agua subterránea, por lo tanto, los resultados obtenidos en agua, se pueden deber a reacciones redox que ocurren en el acuífero subterráneo.

Por otro lado, es importante mencionar que la fotodegradación de estos filtros solares también es un factor de suma importancia a considerar en la cuantificación de filtros solares, debido a que, por esta razón, es posible que algunos filtros solares no se hayan cuantificado, o se hayan cuantificado, pero en concentraciones mínimas, tal es el caso de la avobenzona y el octilmetoxicinamato ó etilhexilmetoxicinamato (OMC ó EHMC), que según lo reportado por Urs, Beat, Urs, & Christopher, 2004., el butilmetoxidibenzoilmetano ó avobenzona (BMDBM o AVO) y los cinamatos, específicamente, el metoxicinamato de octilo ó etilhexilmetoxicinamato (OMC ó EHMC) y el metoxicinamato de isoamilo (IMC) son los filtros solares más fotoreactivos, reportando que estos filtros solares se degradan hasta 40% bajo irradiación. Las concentraciones determinadas de estos filtros solares fueron de 9.86-40.0 μg AVO/kg y 5.21-18.26 μg OMC/kg en hortalizas. Por otro lado, en agua, solo se cuantificó avobenzona en 41.52 $\mu\text{g/L}$.

Al comparar los resultados obtenidos mediante CLAR con los resultados obtenidos mediante CL-EMAR, la principal y más importante diferencia radica en que, al realizar un segundo análisis por CL-EMAR nos ayuda a descartar falsos positivos y negativos. Los resultados positivos por medio de CLAR, pero negativos por medio de CL-EMAR, indican que en las muestras de agua de Cholul y Montes Amé hay presencia de algún compuesto con polaridad similar a la de los filtros solares, pero no existe presencia de los filtros solares en estudio.

Etapa IV. Análisis ecotoxicológico en pez cebra (*Danio rerio*).

Ante la evidencia de la migración de filtros solares (BP3, OCT, AVO y OMC) en hortalizas cultivadas con agua de riego del Estado de Yucatán, ya que tanto en agua de riego como en hortalizas se cuantificaron estos filtros solares, se diseñó una estrategia para evaluar los efectos toxicológicos de las concentraciones determinadas.

El bioensayo se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Rodríguez Fuentes (Rodríguez, y otros, 2015). Para ello, se evaluó la letalidad en el modelo de pez cebra (*Danio rerio*), se tomaron fotos de cada biotratamiento, cada día, y al final de 5 días, se contabilizaron los organismos muertos y se determinó la DL50 utilizando el programa PROBIT de la EPA.

Debido a que las concentraciones determinadas en las muestras fueron de 0.007 µg/mL hasta 0.042 µg/mL (7.00-41.52 µg/L) en agua de riego y de 0.01 µg/mg hasta 0.056 µg/mg (9.27-55.61 µg/kg) en hortalizas, las concentraciones evaluadas en este bioensayo fueron 0.01 µg/mL, 10 µg/mL, y 100 µg/mL (de BP3, OCT, AVO y OMC), lo cual se debe a que, con este bioensayo de toxicidad se pretende alcanzar dos objetivos.

1) Observar el efecto de las concentraciones determinadas en agua de riego y hortalizas (concentraciones nominales), suponiendo una exposición por consumo tanto de agua como de hortalizas, considerando así, la última dilución evaluada en el bioensayo, de 0.01 µg/mL.

2) Evaluar concentraciones mayores, suponiendo una exposición directa en peces de cenote, debido a que la biota presente en estos cuerpos de agua, esta directamente expuesta a estos compuestos químicos, por lo tanto, se planteó una evaluación de concentraciones mayores, las cuales fueron de 10 y 100 µg/mL.

Además, se realizó un tratamiento control de metanol y agua de garrafón, con la finalidad de asegurar que los efectos determinados se deben únicamente a los filtros solares y no por metabolitos tóxicos generados de la metabolización del metanol.

En la figura 32, 33, 34, 35 y 36 se muestran los resultados al inicio del estudio, a las 24 horas, a las 48 horas, 72 horas y a los 5 días, respectivamente, en la cual hubo un desarrollo normal de los embriones (Kimmel *et al.*, 1995), excepto para los embriones con concentración de 100 µg/mL, en los cuales se observó precipitación de los compuestos a las 48 horas de iniciado el bioensayo.

Por lo anterior, al parecer los filtros solares no causaron ningún efecto aparente en los embriones de pez cebra. Sin embargo, al ser compuestos que se bioamplifican, será importante realizar estudios crónicos para determinar su efecto a largo plazo.

Etapas V. Análisis no dirigido para la determinación de otros contaminantes en hortalizas cultivadas en la península de Yucatán.

Considerando que la metodología de preparación de las muestras de hortalizas (QuEChERS) para determinar filtros solares es la misma que se utiliza para la identificación de 535 pesticidas por LC-EMAR [Hoja de aplicación Phenomenex No. 20035], se decidió determinar si en las muestras tratadas había presencia de algún pesticida, primeramente, porque las muestras recolectadas provienen de invernaderos orgánicos, libres de uso de pesticidas, por lo tanto, se espera que no haya presencia de ningún pesticida. Por lo que, para el ámbito regulatorio, esta parte es fundamental, para verificar que efectivamente, estos tres sitios muestreados, no utilizan ningún pesticida durante la siembra y cosecha de sus hortalizas. Además, se ha reportado que varios pesticidas forman parte del grupo denominado "Contaminantes

Emergentes” (Deblondea, Cossu-Leguilleb, & Hartemann, 2011), los cuales tienen un riesgo a nivel endócrino, por lo tanto, la determinación de pesticidas, al igual que filtros solares en las hortalizas es importante debido al riesgo que alimentario que pueden generar. Para ello, se implementó la metodología (Columna, reactivos grado LC-MS, condiciones del analizador de masas) tomando como base, lo reportado en la hoja de aplicación 20035 (vida supra, pag. 61). Posteriormente, se extrajo el reporte de análisis de cada muestra.

Del reporte de análisis se obtuvo el cromatograma ESI+ TIC (fig 37), el cual se somete a la rutina de extracción generadora de estructuras (MGF, Masshunter), la cual mediante las relaciones isotópicas del M+, [M+1] y [M+2] determina la fórmula molecular y la masa molecular de cada señal del cromatograma generado. Luego compara la masa molecular, el tiempo de retención y la relación masa carga (m/z) con alguna base de datos; en este caso se utilizó la base de datos generada con el programa PCLD de los 535 pesticidas; para identificar a los componentes de la muestra inyectada. En la fig 38 se muestra el reporte del primer compuesto encontrado en la muestra de arúgula de Montes Amé

De manera análoga, en la muestra de arúgula de este sitio se encontraron 27 compuestos químicos, los cuales se presentan en la tabla 26.

Tabla 26. Compuestos encontrados en arúgula (Montes Amé)

	RT (min)	Mass	[M+H] ⁺	MFG Formula	MGF Diff (ppm)
1	1.026	147.0156	148.0229	C ₈ H ₅ NS	-8.86
2	10.553	358.1962	359.2034	C ₁₄ H ₂₆ N ₆ O ₅	0.78
3	10.851	191.1313	192.1386	C ₁₂ H ₁₇ NO	-1.53
4	12.707	245.2356	246.2429	C ₁₄ H ₃₁ NO ₂	-0.6
5	13.69	271.2515	272.2588	C ₁₆ H ₃₃ NO ₂	-1.5
6	14.482	317.2751	318.2823	C ₁₈ H ₃₉ NOS	0.35
7	14.482	273.2676	274.2749	C ₁₆ H ₃₅ NO ₂	-2.89

8	14.634	229.2408	230.2481	C ₁₄ H ₃₁ NO	-1.06
9	14.647	120.0219	121.0291	C ₇ H ₄ O ₂	-6.09
10	14.65	278.1517	279.1592	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	0.26
11	14.652	148.0163	149.0236	C ₈ H ₄ O ₃	-1.52
12	15.022	287.2848	288.2921	C ₁₇ H ₃₇ NO ₂	-8.19
13	15.078	299.2835	300.2908	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	-3.61
14	15.177	287.2842	288.2914	C ₁₇ H ₃₇ NO ₂	-6.03
15	15.295	198.1634	199.1707	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	-7.11
16	15.484	229.2419	230.2492	C ₁₄ H ₃₁ NO	-5.67
17	15.75	291.1996	292.2069	C ₂₁ H ₂₅ N	-3.18
18	16.273	315.3149	316.3222	C ₁₉ H ₄₁ NO ₂	-3.76
19	16.284	249.0798	250.0871	C ₁₆ H ₁₁ NO ₂	-3.33
20	16.284	378.2315	379.2388	C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O ₂	-2.16
21	16.354	294.2572	295.2643	C ₁₉ H ₃₄ O ₂	-4.47
22	17.741	278.152	279.1592	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	-0.57
23	17.742	390.2774	391.2845	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	-0.98
24	17.742	166.0269	149.0236	C ₈ H ₆ O ₄	-2
25	17.769	370.3086	371.3159	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	-0.77
26	18.312	337.3366	338.3439	C ₂₂ H ₄₃ NO	-6.28
27	19.183	426.3723	427.3796	C ₂₇ H ₄₆ N ₄	-0.2

Al realizar la búsqueda de los compuestos encontrados en la base de datos, no se encontró ningún pesticida en la muestra, sin embargo, con el interés de saber cuáles fueron los compuestos encontrados, se realizó una búsqueda en la base de datos T3DB (The Toxin and Toxin Target Database, TMIC, 2019 (Wichart, y otros, 2015) (Lim, y otros, 2010), con cerca de 3000 mil compuestos identificados por CL-EMAR. En la fig 39, se muestra la pantalla principal de búsqueda donde se colocaron la relación masa carga encontrada del cromatograma, es decir, las masas de los iones [M+H]⁺ y los valores empleados para la búsqueda.

Para identificar los compuestos, se buscó que tanto la fórmula molecular, el ión $[M+H]^+$ y la masa monoisotópica coincidieran con el obtenido en el reporte de análisis de la muestra, además, la tolerancia de las masas moleculares fue de 0.01 Da (ppm).

En la fig 40 se muestra la manera en la que se identificaron los compuestos presentes en la muestra de arúgula del "Colectivo Milpa" en donde se demuestra la presencia de dietiltoluamida (DEET).

La búsqueda de todas las masas obtenidas del análisis por CL-EMAR, llevo a la identificación de tres compuestos más en la muestra de Arúgula de Montes Amé, los cuales se enlistan en la tabla 27.

Tabla 27. Compuestos identificados en el análisis no dirigido en arúgula cultivada en el invernadero "Colectivo Milpa".

	RT (min)	Mass	$[M+H]^+$	MFG Formula	Nombre
3	10.851	191.1313	192.1386	$C_{12}H_{17}NO$	Dietiltoluamida
10	14.65	278.1517	279.1592	$C_{16}H_{22}O_4$	Dibutilftalato
21	16.354	294.2572	295.2643	$C_{19}H_{34}O_2$	Metil linoleato
23	17.742	390.2774	391.2845	$C_{24}H_{38}O_4$	Di (2-etilhexil)ftalato

De la misma manera, para las demás hortalizas muestreadas, se siguió el mismo procedimiento para identificar cada compuesto encontrado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28. Compuestos encontrados en las muestras de hortalizas por medio del análisis no dirigido.

Muestra	DEET	DBP	DEHP	Metil linoleato	L-Valina
Arúgula Montes Amé	x	x	x	x	
Espinaca Montes Amé		x	x	x	x
Cebollín Montes Amé			x		
Arúgula Cholul		x	x	x	

Cebollín Timucuy			x		
Arúgula Timucuy	x	x	x	x	
Pepino Timucuy (sin cascara)	x	x	x	x	
Pepino Timucuy (con cascara)		x	x	x	
Blanco (agua)		x	x	x	

En todas las hortalizas analizadas en modo positivo, se encontró el compuesto di (2-etilhexil) ftalato (DEHP), incluso en los controles. Por otro lado, dibutilftalato (DBP) y metil linoleato se encontraron en todas las hortalizas de los invernaderos ubicados en Yucatán, excepto en la muestra de cebollín de Montes Ame y cebollín de Timucuy.

Los ésteres de ftalato encontrados: di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) y el dibutil ftalato (DBP), son utilizados frecuentemente en materiales poliméricos como poliacetato de vinilo y cloruro de polivinilo (PVC) y comúnmente se agregan para hacerlos flexibles. También se usan como aditivos para adhesivos o tintas de impresión, sin embargo, ya que estos compuestos no están ligados químicamente al material polimérico, estos compuestos pueden migrar hacia el agua y los alimentos, o matrices que estén en contacto con estos materiales. La exposición al DEHP es generalmente baja y no dañina, pero el aumento de las exposiciones resultantes de los líquidos intravenosos administrados a través de tubos de plástico o la ingestión de alimentos o agua contaminados pueden tener efectos tóxicos. (Leo, M. L. Nollet, 2004)

Por otro lado, el dibutil ftalato (DBP) fue agregado a la lista de la Proposición 65 de California (1986) de teratógenos sospechosos en noviembre de 2006. Se sospecha que es un disruptor endocrino. Fue utilizado en algunos esmaltes de uñas; Todos los principales productores comenzaron a eliminar esta sustancia química de los esmaltes de uñas en el otoño de 2006.

A pesar de tener conocimiento de la capacidad xeno-estrogénica de estos dos compuestos, el hecho de haberlos encontrado en todas las muestras

analizadas, incluso en los controles de agua, habla de una migración de estos compuestos desde los materiales utilizados durante el análisis. La técnica de CL-EMAR es muy sensible y permite detectar compuestos a nivel traza, como es el caso de los plastificantes que son extraídos de los tubos de centrífuga (QuEACHERs), viales Eppendorf, puntas para micropipeta, entre otros. Debido principalmente a que se realiza la extracción de los compuestos de interés con una mezcla de acetato de etilo/ metanol (70:30), por lo que estos compuestos pueden ser extraídos con estos disolventes, aunque según lo reportado por (Vázquez, M, y otros, 2017), la extracción de ftalatos, generalmente se realiza con *n*-hexano pero es posible que estos compuestos logren ser extraídos con la mezcla de disolventes utilizada, de polaridad intermedia, y finalmente determinados por CL-EMAR.

En las muestras vegetales se encontró un derivado del ácido linoleico, el metil linoleato o linoleato de metilo. El ácido linoleico ($\omega 6$), junto con el ácido linolénico ($\omega 3$), y otros ácidos grasos insaturados, son los principales compuestos liposolubles presentes en vegetales. La razón de haber encontrado un derivado y no el ácido linoleico como ácido graso libre radica en la reacción de oxidación que sufre el ácido linoleico con los dobles enlaces carbono-carbono presentes en la molécula. Se forman diferentes tipos de productos oxigenados (hidroperóxidos, ozónidos y aldehídos), entre ellos, el linoleato de metilo. (Badui Dergal, S. 2013).

En la muestra de espinaca de Montes Amé se determinó la presencia de L-Valina, la cual se ha demostrado que forma parte de los aminoácidos libres presentes en la arúgula y espinaca, aunque en pequeñas cantidades. Además, según lo reportado por (Nishimura & Kato, 1988; Solms, 1969), la L-Valina es un aminoácido libre responsable del sabor amargo en este tipo de hortalizas.

Por otro lado, en la muestra de arugula de Montes Amé, arugula y pepino sin cáscara de Timucuy se encontró a la dietiltoluamida, abreviado DEET, es un

aceite ligeramente amarillo. Es el ingrediente activo más común en los repelentes de insectos. Está destinado a aplicarse sobre la piel o la ropa, y brinda protección contra mosquitos, garrapatas, pulgas, niguas, entre otros. Hasta la fecha no se ha reportado como agente toxicológico. Pertenece a la clase de compuestos orgánicos conocidos como *n, n*-dialquil-*m*-toluamidas. Estos son aromáticos que contienen una *m*-toluamida, donde el grupo carboxamida está *N*-sustituido con dos cadenas de alquilo.

6. Conclusiones

Después de realizar el trabajo experimental se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Se logró la validación de los métodos de análisis propuestos. Para el método desarrollado en CLAR, se obtuvo un LOD y un LOQ (sensibilidad del método) de 0.5 ug/mL, además, se demostró la especificidad del método analítico. Se determinó la presencia de BP3, OCT y AVO en agua de riego de la península de Yucatán, por medio de CLAR. Por otro lado, en CL-EMAR, se desarrollaron dos métodos por ionización Electrospray (ESI), uno llevado a cabo en modo positivo (ESI+) y otro en modo negativo (ESI-), para la confirmación y cuantificación de seis filtros solares (BP3, OCT, AVO, OMC, OTS y HMS) en muestras de agua de riego y hortalizas de la península de Yucatán.
2. Se confirmó la presencia de filtros solares en agua de riego y pepino con cáscara de Timucuy y en espinaca de Montes Amé, por medio de un análisis dirigido en CL-EMAR.
3. Se cuantificaron tres filtros solares no ácidos, BP3, OCT y AVO, en agua de riego del sitio ubicado en Timucuy. Las concentraciones determinadas fueron de 7.00 µg/mL, 11.97 µg/mL y 41.52 µg/mL, respectivamente. Por otro lado, se comprobó la migración de los filtros solares del agua

de riego a las hortalizas, determinando concentraciones de 9.27-55.61 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de hortaliza (espinaca de Montes Amé y pepino con cáscara de Timucuy) de filtros solares no ácidos (BP3, AVO, OTC y OMC).

4. Se evaluaron concentraciones nominales de 0.01, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BP3, OCT, AVO y OMC, en embriones de pez cebra. El bioensayo no presentó efectos toxicológicos, por lo tanto, no se demostró un riesgo alimentario por migración de filtros solares en alimentos. Al no observar efectos adversos en los embriones de pez cebra, tampoco se demostró un riesgo ambiental para la biota de los cenotes (generalmente peces bagres).
5. Por medio del análisis no dirigido, se comprobó que los invernaderos muestreados no utilizan pesticidas para la siembra y cosecha de sus hortalizas, puesto que no se encontró ningún pesticida en ninguna hortaliza. Por otro lado, si se identificó un contaminante emergente, un repelente, dietiltoluamida (DEET) en arúgula de Montes Amé y arúgula y pepino sin cáscara de Timucuy.

7. Perspectivas

1. Realizar un estudio toxicológico que determine el efecto de la bioacumulación a largo plazo, debido a que si se cuantificaron filtros solares en agua de riego y hortalizas.
2. Validar una metodología para determinar y cuantificar filtros solares de empaques en alimentos, para demostrar un riesgo alimentario, por filtros solares presentes en empaques.

8. Referencias bibliográficas

1. Alcocer, J; Lugo, A; Marín L. E. & Escobar, E. 1998. Hydro-chemistry of waters from five cenotes and evaluation of their suitability for drinking-water supplies, northeastern Yucatan, México. *Hydrogeol*, J. 6. 293-301
2. Allen, J. Septiembre 2001. Ultraviolet Radiation: How it affects life on earth. Earth Observatory. NASA, USA.
3. Alonso M. B; Feo M. L; Corcellas C; Gago-Ferrero P, Bertozzi C. P, Marigo J; Flach L; Meirelles A. C, Carvalho V. L, Azevedo A. F; Torres J. P; Lailson-Brito J, Malm O, Diaz-Cruz M. S, Eljarrat E; Barcelo D. 2015. Toxic heritage: maternal transfer of pyrethroid insecticides and sunscreen agents in dolphins from Brazil. *Environ Pollut*, 207, 391402.
4. Alsev, B., Korsgaard, B., Bjerregaard, P. 2005. Estrogenicity of butylparaben in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed via food and water. *Aquatic Toxicology*, 72, 295-304.
5. Alzieu, C. 1991. Environmental problems caused by TBT in France: Assessment regulations, and prospects. *Marine Environmental Research*. 32, 7-18.
6. Alzieu, C. 2000. Impact of tributyltin on marine invertebrates. *Ecotoxicology*. 9, 71-76.
7. Alzieu, C; Sanjuan, J; Deltreil, J.P; Bovel, M. 1986. Tin contamination in Arcachon Bay: Effects on oyster shell abnormalities. *Marine Pollution Bulletin*. 20, 22-26.
8. Anastasiades, M., Lehotay, S.J., Stajnbaher, D., Schenck, F.J. 2003. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce". *Journal of AOAC*

International, 86(2):412-430

9. Ankush, S. A; Goutam, B; Rahul, J. A; Kisan, T. D. 2013. Zebra fish, the reliable vertebrate model organism-a review. DCSI. 9 (1). 172-182
10. Atlas, E; Giam, C.S. 1981. Global transport of organic pollutants: Ambient concentrations in the remote marine atmosphere. Science. 211, 163-165.
11. Auriol M, filali-Meknassi Y, Adams CD, Tyagi RD, Noguerol TN, Piña B. Removal of estrogenic activity of natural and synthetic hormones from a municipal wastewater: efficiency of horseradish peroxidase and laccase from *Trametes versicolor*, Chemosphere 2008;70:445-52
12. Avias, J; Dubertret, L. 1975. Phenomenes karstiques dans les roches non carbonatées en Hydrogeology of karstic terrains. A. I. H. 31-40.
13. Bachelot, M; Li, Z; Munaron, D; Poiger, T; 2005. Occurrence of some organic UV filter concentrations in marine mussels from French coastal regions. Sci. Technol, 39, 953-962.
14. Bachelot M., Li Z., Munaron D., Le Gall P., Casellas C., Fenet H. and Gomez E. 2012. Organic UV filter concentrations in marine mussels from French coastal regions. Science of the Total Environment, 420, 273-279.
15. Badui Dergal, S. 2013. Química de los alimentos. 5ª edición. Pearson educación. México. 223-452.
16. Balmer, M.E., Buser, H.R., Müller, M.D., Poiger, T. 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

17. Buser, H, R., Balmer, M. E., Schmid, P., and Kohler, M. 2006. Occurrence of UV filters 4-methylbenzylidene camphor and octocrylene in fish from various Swiss rivers with inputs from wastewater treatment plants. *Environmental Science and Technology*, 40, 1427-1431.
18. Blázquez P, Casas N, Font X, Gabarrell X, Sarrà M, Caminal G. Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *J Environ Mang* 2012;104:114-20
19. Blüthgen, N., Zucchi, S., Fent, K. 2012. Effects of the UV filter benzophenone-3 (oxybenzone) at low concentrations in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and applied pharmacology*, 263 (2), 184-194
20. Bokyoung K., Barcum, K., Sol, J., Pan-Gyi K., Kyunghee J. 2016. Major benzophenone concentrations and influence of food consumption among the general population in Korea, and the association with oxidative stress biomarker. *Sci. Total Envi*, 565, 649-655.
21. Brian, J. V; Harris, C.A; Scholze, M; Backhaus, T; Boody, P; Lamoree, M; Pojyna, G; Jonkers, N; Runnalls, T; Bonfa, A; Marcomini, A; Sumpter, J. P. 2005. *Environ Health Perspect* 113:721-728
22. Bryan, G.W; Gibbs, P.E; Hummerstone, L.G; Burt, G.R. 1986. The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around southwest England: Evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *Journal of Marine Biological Association of UK*. 66, 611-640.
23. Chen, J., Ahn, K.C., Gee, N.A., Ahmed, M.I., Duleba, A.J., Zhao, L., Gee, S.J., Hammock, B.D., Lasley, B.L. 2008. Triclocarban enhances testosterone action: A new type of endocrine disruptor? *Endocrinology* 149 (3), 1173-1179.
24. Colborn, T., Dumanoski, D, Myers, J. P. 1996. *Our stolen future*. Ed. Dutton, Penguin Books NY. ISBN 0-525-93982-2.

25. Coronado, M; De Haro, H; Deng, X; Rempel, M. A; Lavado, R. D; Schlenk, S. 2008. *Aquatic Toxicol* 90:182–187.
26. Cosmetics Europe. 2004. Council Directive 76/768/EEC of 27 July 1976 and its successive amendments.
27. Damstra, T; Barlow, S; Bergman, A; Kavlock, R; Van Der Kraak, G. 2002. Global Assessment of the State of the Science of Endocrine Disruptors. International Programme on Chemical Safety, World Health Organization. Disponible en: www.who.int/pcs. [Ultimo acceso el 21 de marzo de 2019].
28. Darbre, P.D. 2006. Environmental estrogens, cosmetics and breast cancer. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 20 (1), 121-143.
29. Dawson, A. 2000. Mechanisms of endocrine disruption with particular reference to occurrence in avian wildlife: A review. *Ecotoxicology* 9, 59-69
30. Deblondea, T., Cossu-Leguilleb, C. and Hartemann, P. Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214 (2011) 442–448
31. Díaz-Cruz; Barceló, D. 2009. Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV absorbing compounds in aquatic ecosystems. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(6), 708-717.
32. Diario Oficial de la Federación (DOF). Secretaria de Salud. 21 de mayo del 2010. Acuerdo por el que se determinan las sustancias prohibidas y restringidas en la elaboración de productos de perfumería y belleza. 2ª sección. Apartado QUINTO. 18, 43-46.

33. Driever, W; Stemple, D; Schier, A; Solnica-Krezel, L. 1994. Zebrafish: genetic tools for studying vertebrate development. *Trends Genet.* 10, 152-9.
34. Ek, C. 1968. La tener en $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ et en CO_2 des eaux des grandes belges. Act IV. Congr. Int. Espel., Ljubljana. 75-77.
35. FAO. 2004. Carbon sequestration in dryland soils. *World Soils Resources Reports*. No. 102. FAO. Rome. (Actualizado al 2004). Disponible en: www.fao.org/docrep/007/y5738e/y5738e00.htm. [Ultimo acceso el 21 de marzo de 2019].
36. Fent, K; Zenker, A; Rapp, M. 2010. Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. *Environmental Pollution* 158. 1817– 1824.
37. Fent, K; Kunz, P.Y; Gomez, E. 2008. UV Filters in the Aquatic Environment Induce Hormonal Effects and Affect Fertility and Reproduction in Fish. *Chimia* 62:368–375
38. Ferrer, A. 2005. Epidemiología de las intoxicaciones por metanol. Interés de la Toxicovigilancia. *Rev Toxicol* 22:84.
39. Flügel, H. W. 1968 Some notes on the insoluble residues in Limestones en Müller y Friedman. *Recent Developments in Carbonate Sedimentology in Central Europe*. Springer, New York. 46-54.
40. Foster, W. G. 2001. Endocrine disruption and human reproductive effects. An overview. *Water Quality Research Journal of Canada*. 36(2), 253-271.
41. Fundación Española de la Nutrición. 2013. Espinacas. [En línea] (Actualizado al 2013). Disponible en:

<http://www.fen.org.es/mercadoFen/pdfs/espinacas.pdf> [Ultimo acceso el 19 de noviembre de 2018]

42. Gago Ferrero, P. 2013. Estudio de la presencia, destino y degradación de filtros solares orgánicos en el ecosistema acuático. Universitat de Barcelona.
43. Gago Ferrero, P; Díaz Cruz, M. S; Barceló, D; 2012. An overview of UV-absorbing compounds (organic UV filters) in aquatic biota. *Anal. Bioanal. Chem*, 404, 2597-2610.
44. Gago-Ferrero, P; Díaz-Cruz, M. S; Barceló, D. 2013. Multiresidue 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* 1286 93–101,
45. Gago-Ferrero, P; B. Alonso, M; P. Bertozzi, C; Marigo, J; Barbosa, L; Cremer, M; R. Secchi, E; Azevedo, A; Lailson, J; PM. Torres, Joao; Malm, O; Eljarrat, E; Díaz-Cruz, S; Barceló, D. 2013. First Determination of UV Filters in Marine Mammals. Octocrylene Levels in Franciscana Dolphins. *Environmental Science & Technology*.
46. Gaona-Vizcayno, S. T. Gordillo de Anda & M. Villasuso-Pino, 1980. Cenotes, karst característico: mecanismo de formación. *Inst. Geol. Rev.* 4: 32–36.
47. Gibbs, P.E; Pascoe, P.L; Burt, G.R. 1988. Sex change in the female dog-whelk *Nucella lapillus*, induced by tributyltin from antifouling paints. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 68, 715-731.
48. Guillette, L.J., Arnold, S.F., and McLachlan, J.A. 1996. Ecoestrogens and embryos-is there a scientific basis for concern? *Animal Reproduction Science* 42, 13-24

49. Guillette, L.J; Crain, D.A; Gunderson, M.P; Kools, S.A; Milnes, M.R; Orlando, E.F; Rooney, A.A; Woodward, A.R. 2000. Alligators and endocrine disrupting contaminants: A current perspective. *American Zoology* 40, 438-452.
50. Hayden, C. G; Roberts, M. S; Benson, H. A. Septiembre 1997. Systemic absorption of sunscreen after topical application. *Revista The Lancet*. 350. 9081.
51. Hernández-Leal L., Temmink H., Zeeman G. and Buisman C.J.N. 2011. Removal of micropollutants from aerobically treated grey water via ozone and activated carbon. *Water Research*, 45, 2887-2896.
52. INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 1983. Carta geológica 1:250 000. Secretaría de Programación y Presupuesto. CDMX.
53. INEGI. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 2016. Anuario de la península de Yucatán
54. IEH. Institute for Environment and Health. 1995. Environmental oestrogens: Consequences to human and wildlife. Assessment AI. Institute for Environmental and Health; Leicester, United Kingdom.
55. Jacobson, J.L.; Jacobson, S.W. 1996. Intellectual impairment in children exposed to polychlorinated biphenyls in utero. *The New England Journal of Medicine*. 335, 783-789.
56. Jeon H.K., Chung Y. and Ryu J.C. 2006. Simultaneous determination of benzophenone-type UV filters in water and soil by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1131, 192-202
57. Jobling, S; Reynolds, T; White, R; Parker, M.G; Sumpter, J.P. 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some

phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environmental Health Perspectives* 103, 582-587.

58. Juliana S. Munaretto, Marília M. May, Nathália Saibt, Renato Zanella, 2016. Liquid chromatography with high resolution mass spectrometry for identification of organic contaminants in fish fillet: screening and quantification assessment using two scan modes for data acquisition. *Journal of Chromatography A*, 1456, 205–216
59. Jurado, A; Gago-Ferrero, P; Vázquez-Suñé, Enric; M.Silvia; Díaz-Cruz. 2014. Urban groundwater contamination by residues of UV filters. *Journal of hazardous Materials*. 271;141-149.
60. Kaiser, D.; Sieratowicz, A.; Zielke, H.; Oetken, M.; Hollert, H.; Oehlmann, J. 2012. Ecotoxicological effect characterisation of widely used organic UV filters. *Environmental Pollution (Oxford, United Kingdom)*, 163, 84-90.
61. Kaiser, D., Wappelhorst, O., Oetken, M., Oehlmann, J. 2012. Occurrence of widely used organic UV filters in lake and river sediments. *Environ. Chem.* 9, 139-147
62. Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale R.M. and Guwy A.J. 2008. Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography- electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391, 1293-1308
63. Kimmel, C. B; Ballard, W. W; Kimmel, S. R; Ullmann, B; Schilling, T. F. 1995. Stages of embryonic development of the zebra fish. *Dev. Dyn.* 203, 253-310.

64. Köhnlein M.. 2000. Untersuchungen zum photochemischen Verhalten des UV-B-Filters Octyl- methoxycinnamat in Modellsystemen, Sonnenschutzmitteln sowie auf der Haut. Berichte aus der Chemie. Shaker Verlag, Aachen.
65. Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B., and Buxton, H.T. 2002. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance. *Environmental Science and Technology* 36, 1202-1211.
66. Kruve, A; Rebane, R; Kipper, K; Oldekop, M; Evard, H; Herodes, K; Ravio, P; Leito, I. 2015. Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part II. *Analytica Chimica Acta*, 870 (2015) 8-28.
67. Kunz PY, Fent K. 2006. Estrogenic activity of UV filter mixtures. *Toxicol Appl Pharmacol* 217 (1):86–99
68. Kunz PY, Fent K. 2009. Estrogenic activity of ternary UV filter mixures in fish (*Pimephales promelas*)- an analysis with nonlinear isobolograms, *Aquat. Toxicol Appl Pharmacol* 234:77–88
69. Kunz PY, Gries T, Fent K. 2006. The ultraviolet filter 3-benzylidene camphor adversely affects reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol Sci* 93:311–321
70. LeDoux, M. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1021–1036
71. Leo, M. L. Nollet. 2004. Handbook of Food Analysis: Residues and other food component analysis. Marcel, Dekker, Inc. New York, Basel. 2ND ed. 2. 1319-1329

72. Leo, M. L. Nollet. 2011. Analysis of Endocrine Disrupting Compounds in Food. Blackwell Publishing, Ltd. 3-9, 85-101, 413-427.
73. Liber, K; Knuth, M.L; Stay, F.S. 1999. An integrated evaluation of the persistence and effects of 4-nonylphenol in an experimental littoral ecosystem. Environmental Toxicology and Chemistry. 18, 357-362
74. Lim, E; Pon, A; Djoumbou, Y; Knox, C; Shrivastava, S; Guo, A. C; Neveu, V; Wishart, D. S. 2010. T3DB: a comprehensively annotated database of common toxins and their targets. Nucleic Acids Res. Jan 38 (Database issue): D781-6.
75. Llopis, N. 1970. Fundamentos de hidrogeología carstica (Introducción a la geoespeleología). Blume. Madrid, España. 3-100.
76. L. Brown.T., H. Eugene L., Jr., E. Bursten B., R. Burdge J. 2004. Química, La ciencia central. 9. México. Pearson Educación
77. Lister, A.L. and Van Der Kraak, G.J. 2001. Endocrine disruption: Why is it to complicated? Water Quality Research Journal of Canada 36 (2), 175-190.
78. Lugo, J; García, M. 1999. El relieve de la Península de Yucatán. En: García FA, Córdoba OJ, Chico PLP (Eds). Atlas de procesos territoriales en Yucatán. Universidad Autonoma de Yucatán. Mérida, Yucatán México. 159-162
79. Maraboto, G. A. 2011. Análisis de bloqueadores solares. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México-Dirección General de Bibliotecas. Tesis Digitales.
80. Marchis, D., Ferro, G.L., Brizio, P., Squadrone, S., and Abete, M.C. 2012. Detection of pesticides in crops: A modified QuEChERS approach. Food Control 25, 270-273

81. Marín, L. E, 1990. Field investigations and numerical simulation of ground-water flow in the karstic aquifer of northwestern. Yucatan, México. PhD thesis, Dept. of Geol; North Ill, Univ; USA.
82. Marín, L.E; Steinich, B; Pacheco, J; Escolero, O.A. 2000. Hydrogeology of a contaminated sole-source karst aquifer, Mérida, Yucatán, México. *Geof. Int.* 39(4), 359-365.
83. Marín, D; Del Pozo, A. octubre 2005. Filtros solares. Características, tipos y requerimientos. Unidad de Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. OFFARM. Vol. 24
84. Marín García, I. 2016. Degradación de filtros solares UV mediante infiltración suelo-acuífero con simulación en columna. Barcelona
85. Martincigh B.S., Kowlaser K. and Raynor M.W. 1999. Photoproducts of 2-Ethylhexyl-para- Methoxycinnamate. 27th annual meeting of the american society for photobiology, Washington).
86. Millennium Ecosystem Assessment. 2005. Ecosystems and Human Well-being: Current State and Trends. MEA. Island Press. Washington, D.C.
87. Mohammad, M. M; Aziza, E. B; Mohamed, A. R. 2017. Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies. *Journal of Chromatography B.* 1043: 3-11
88. Molina, M. & Rowland, F.S. 1974. Stratospheric sink for chlorofluoromethanes: chlorine atomcatalysed destruction of ozone. *Nature*, 249, 810-812.

89. Montoriol, P. J. 1954. La hidrogeología kárstica del Plá de les Basses y sus relaciones con la de otras zonas del macizo de Garraf (Barcelona). *Speleon*, V. 55-104, 11 figs., 2 lams.
90. Munaretto, J. S; May, M. M; Saibt, M & Zanella, R. 2016. Liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry for identification of organic contaminants in fish fillet: screening and quantification assessment using two scan modes for data acquisition. *Journal of Chromatography A*, 1456: 205-2016.
91. Navarro-Mendoza, M., 1988. Inventario íctico y estudios ecológicos preliminares en los cuerpos de agua continentales en la reserva de la biósfera de Sian Ka'an y áreas circunvecinas en Quintana Roo, México. Tech. Rept., CIQRO/CONACYT/USFWS, Chetumal.
92. Negreira N., Rodríguez I., Ramil M., Rubí E. and Cela R. 2009. Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of hydroxylated benzophenone UV absorbers in environmental water samples. *Analytica Chimica Acta*, 654, 162-170.
93. Nishimura, T., & Kato, H. 1988. Taste of free amino acids and peptides. *Food Reviews International*, 4(2), 175-194.
94. Osorio Leon, Elsa, 2017. Determinación de bloqueadores solares en cenotes impactados por el turismo en Yucatán: posibles implicaciones en el nivel residual en alimentos, Tesis de Licenciatura en proceso, Lic. en Química de alimentos, Facultad de Química, UNAM
95. Palanza, P., Morellini, F., Parmigiani, S., and vom Saal, F.S. 1999. Prenatal exposure to endocrine disrupting chemicals: Effects on behavioural development. *Neuroscience and Biobehavioural Reviews* 23, 1011-1027.

96. Perry, E. C; Marín L. E; McClain J, Velazquez, G. 1995. The ring of cenotes (sinkholes) northwest Yucatan, Mexico: its hydrogeologic characteristics and association with the Chicxulub Impact Crater. *Geology*, 23, 17-20.
97. Peruchi, L. M. & Rath, S. 2012 Development and application of a HPLC method for eight sunscreen agents in sun care products. *Int. J. Cosmet. Sci*, 34, 226-233
98. Phenomenex. 2019. Phenomenex HPLC Applications. Screening of 353 Pesticides by QuEChERS y LC-MS/MS. [En línea] (Actualizado al 11 de agosto del 2019). Disponible en: <https://www.phenomenex.com/Application/Detail/20035?returnURL=/Application/Search&fsr=1#> [Último acceso el 11 de agosto del 2019].
99. Pintado-Herrera M.G., González-Mazo E. and Lara-Martín P.A. 2013. Environmentally friendly analysis of emerging contaminants by pressurized hot water extraction-stir bar sorptive extraction-derivatization and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 401-411
100. Pulido, A. 2007. Nociones de hidrogeología para ambientólogos. Almeria: Universidad de Almería. 492 p.
101. Purdom, C.E; Hardiman, P.A; Bye, V.J; Eno, N.C; Tyler, C.R; Sumpter, J.P. 1994. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment Works. *Chemical Ecology* 8, 274-285.
102. Ramos, S; Homem, V; Alves, A. & Santos, L. 2015. Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment- A review. *Science of the Total Environment*. 526:278-311.
103. Raymond Chang y Kenneth A. Goldsby. 2013. Química. 11ª ed. China: Mc Graw Hill Education 275-280, 902-927

104. Regional Activity Centre for Sustainable Consumption and Production. 2008 Sol y protectores solares. [En línea] (Actualizado al 2008) Disponible en: <http://www.cprac.org/consumpediamed/sites/all/documents/26protectores.pdf> [Ultimo acceso el 19 de Agosto de 2018]
105. Ribera Pibernat M, Paradelo García C. El sol y la piel: fotoprotección y filtros solares. *Medicina Integral* 1997; 30: 64-71, Cancer Research UK, About melanoma skin cancer- A quick guide. UK. 2011
106. Ricking M., Schwarzbauer J. and Franke S., 2003. Molecular markers of anthropogenic activity in sediments of the Havel and Spree Rivers (Germany). *Water Research*, 37, 2607-2617
107. Rodil R. and Moeder M., 2008. Development of a simultaneous pressurised-liquid extraction and clean-up procedure for the determination of UV filters in sediments. *Analytica Chimica Acta*, 612, 152-159
108. Rodil R. and Moeder M., 2008. Development of a method for the determination of UV filters in water samples using stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1179, 81-88
109. Rodil R, Moeder M, Altenburger R, Schmitt-Jansen M. 2009. Photostability and phytotoxicity of selected sunscreen agents and their degradation mixtures in water. *Anal Bioanal Chem*;395:1513-24.
110. Rodríguez Fuentes, G. Sandoval Gío, J.J; Arroyo Silva, A; Noreña Barroso, E; Escalante Herrera, K.S; Olvera Espinosa, F. 2015 Evaluation of the estrogenic and oxidative stress effects of the UV filter 3-benzophenone in zebrafish (*Danio rerio*) eleuthero-embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115,14-18

111. Routledge, E.J; Sheahan, D; Desbrow, C; Brighty, G; Waldock, M; Sumpter, J.P. 1998. Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach. *Environmental Science and Technology* 32, 1559-1565.
112. Rojas-Muñoz, A; Bernad-Miana, A; Izpisúa-Belmonte, J. C. 2007. El pez cebra, versatilidad al servicio de la biomedicina. *Investigación y Ciencia*. 62-69.
113. Salazar, M.H; Salazar, S.M. 1991. Assessing site specific effects of TBT contamination with mussel growth rates. *Marine Environmental Research*. 32, 131-150.
114. Sánchez Brunete C., Miguel E., Tadeo J. L. 2011. Analysis of salicylate and benzophenone type UV filters in soils and sediments by simultaneous extraction cleanup and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, 1218 (28) 4291-8.
115. Santana, S; Rico, E. P & Burgos, J. S. 2012. Can zebrafish be used as animal model to study Alzheimer`s disease? *American Journal of Neurodegenerative Disease* 1(1): 32-48 (Review)
116. Schlumpf, M., Durrer, S., Faass, O., Ehnes, C., Fuetsch, M., Gaille, C., Henseler, M., Hofkamp, L., Maerkel, K., Reolon, S., Timms, B., Tresguerres, J.A.F., Lichtensteiger, W. 2008a. Developmental toxicity of UV filters and environmental exposure: A review. *International Journal of Andrology* 31, 144-151.
117. Schmitt, E. A; Dowling, J. E. 1994. Early eye morphogenesis in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *J. Comp. Neurol.* 344, 532-42.
118. Schmitter, J. J; Comín, F. A; Escobar-Briones, E; Herrera-Silveira, J; Alcocer, J; Suárez-Morales, E; Elías-Gutiérrez, M; Díaz-Arce, V; Marín, L. E; Steinich, B. 2002. Hydrogeochemical and biological characteristics

- of cenotes in the Yucatan Peninsula (SE Mexico). *Hydrobiologia* 267, 215-228.
119. SEMARNAT y CP. 2003. Evaluación de la degradación del suelo causada por el hombre en la República Mexicana, escala 1: 250 000. [En línea] (Actualizado al 2003) Disponible en: https://apps1.semarnat.gob.mx:445/dgeia/informe_resumen14/03_suelos/3_2.html [Ultimo acceso el 17 de Febrero de 2019]
120. Sharpton, V. L., K. Burke, A. Camargo, S. A. Hall, L. E. Marín, G. Suárez, J. M. Quezada, P. D. Spudis & J. Urrutia Fucugauchi, 1993, The gravity expression of the Chicxulub multiring impact basin: size, morphology and basement characteristics. *Science* 261: 1564–1567.
121. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC). 2000. Endocrine disruptors and modulators. SETAC Technical Issue Paper. Pensacola, FL.
122. Solms, J. 1969. Taste of amino acids, peptides, and proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 17(4), 686–688.
123. Sonnenschein C; Soto A. M. 1998. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 65, 143-150.
124. Sprague, J; Bayraktaroglu, L; Bradford, Y; Conlin, T;Dunn, N; Fashena, D; Frazer, K; Haeden, M; Howe, D.G; Knight, J; Mani, P; Moxon, S.A; Pich, C; Ramachandran, S; Schaper, K; Segerdell, E; Shao, X; Singer, A; Song, P; Sprunger, B; Van Slyke, C. E; Westerfield, M. 2008. The Zebrafish Information Network: the zebrafish model organism database provides expanded support for genotypes and phenotypes. *Nucleic Acids Res.* 36 (Database issue): D768-72.

125. Stainier, D; Fishman, M. C. 1994. The zebrafish as a model system to study cardiovascular development. *Trend Cardiovasc. Med.* 4, 207-212.
126. Steinich, B; Marín, L. E. 1996. Hydrogeological investigations in northwestern Yucatan, Mexico, using resistivity surveys. *Ground Water* 34 (4), 640-646.
127. Streisinger, G; Walker, C; Dower, N; Knauber, D; Singer, F. 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). *Nature* 291, 293-296.
128. Tarazona I., Chisvert A., León Z. and Salvador A. 2010. Determination of hydroxylated benzophenone UV filters in sea water samples by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 4771-4778
129. The Metabolomics Innovation Centre (TMIC). 2019. T3DB: the toxin and toxin target database. [En línea] (Actualizado al 11 de agosto del 2019). Disponible en: <http://www.t3db.ca/spectra/ms/search> [Último acceso el 11 de agosto del 2019].
130. Theodore L. Brown; 2009, Química la Ciencia Central
131. United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA). 1997. Special report on environmental endocrine disruption: An effects assessment and analysis. EPA/630/R-96/012. February, 1997. U.S. Environmental Protection Agency; Washington, DC.
132. Urs Hauri, Beat Lütolf, Urs Schlegel and Christopher Hohl, Kantonales Laboratorium Basel-Stadt, Basel. 2004. Determination of

- photodegradation of UV filters in sunscreens by HPLC/DAD and HPLC/MS. *Mitt. Lebensm. Hyg.* 95, 147-161
133. Vanquerp V, Rodriguez C, Coiffard C, Coiffard L, Roeck-Holtzhauer Y. 1999. High- performance liquid chromatographic method for the comparison of the photostability of five sunscreen agents. *J Chromatogr.* 832:273-7
134. Vázquez, M; Gutierrez, R; Pérez, J. J; Escobar, A; Rivera, J. G.; Vega, S. 2017. Presencia de ftalatos en agua embotellada comercializada en la Ciudad de México y su migración durante el almacenamiento a diferentes temperaturas. *Tecnología y Ciencias de Agua.* 8: 91-103.
135. Villegas del Ojo, J; Moreno Millán, E; Cid, C. M; Alonso López, J; Prieto Valderrey, F. 2011. Coma y acidosis metabólica: Intoxicación por metanol. *Rev. Toxicol.* 28: 174-176.
136. Walter W. M; Epley, D. G; McFeeters, R. F. 1990. Effect of water stress on stored pickling cucumbers. *J. Agric. Food Chem,* 38, 2185-2191.
137. Wang, L., Zhang, X., Wang, Y., Wang W. 2006. Simultaneous determination of preservatives in soft drinks, yogurts and sauces by a novel solid-phase extraction element and thermal desorption-gas chromatography. *Analytica Chimica Acta,* 577, 62-67
138. Weisbrod, C. J; Kunz, P. Y; Zenker, A. K; Fent, K. 2007. *Toxicol Appl Pharmacol* 225(3):255–266
139. Wilkinson, J. B; Moore, R. J. 1982. *Harry`s cosmetology.* Longman Singapore Publishers. 7 ed. Itd. 222-258.
140. Wichart, D; Arndt, D; Pon, A; Sajed, T; Guo, A. C; Djoumbou, Y; Knox, C; Wilson, M; Liang, Y; Grant, J; Liu, Y; Goldansaz, S. A;

- Rappaport, S. M. 2015. T3DB: the toxic exposome database. *Nucleic Acids Res.* Jan; 43 (Database issue): D928-34.
141. Yang, L.H., Ying, G.G., Su, H.C., Stauber, J.L., Adams, M.S., Binet, M.T. 2008. Growth-inhibiting effects of 12 antibacterial agents and their mixtures on the freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27, 1201-1208.
142. Ying, G.G., Kookana, R.S. 2007. Triclosan in wastewaters and biosolids from Australian wastewater treatment plants. *Environment International*, 33, 199-205.
143. Zenker, A; Schmutz, H; Fent, K. 2008. Simultaneous trace determination of nine organic UV-absorbing compounds (UV filters) in environmental samples. *Journal of Chromatography A*. 1202:64-74.
144. Zhang Z., Ren N., Li Y.F., Kunisue T., Gao D. and Kannan K., 2011. Determination of benzotriazole and benzophenone UV filters in sediment and sewage sludge. *Environmental Science and Technology*, 45, 3909-391

9. Anexo I

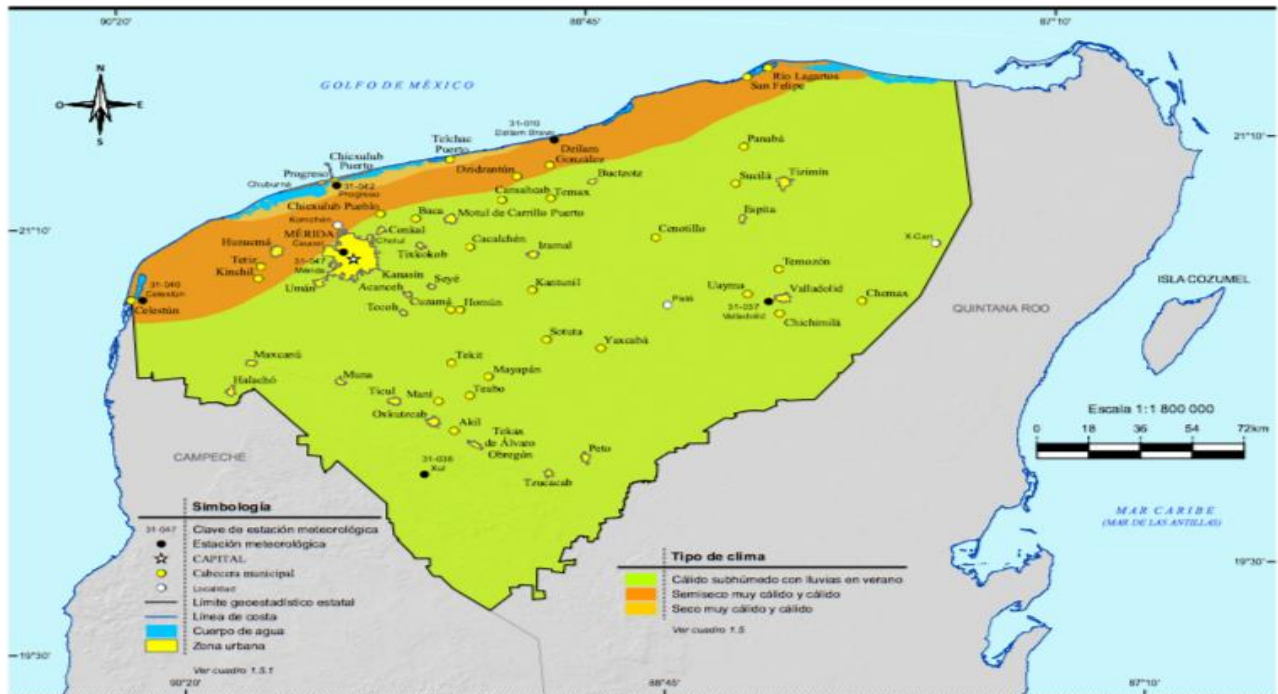


Fig 1. Tipos de clima en las diferentes regiones de la península de Yucatán, 2015. (INEGI, 2016)

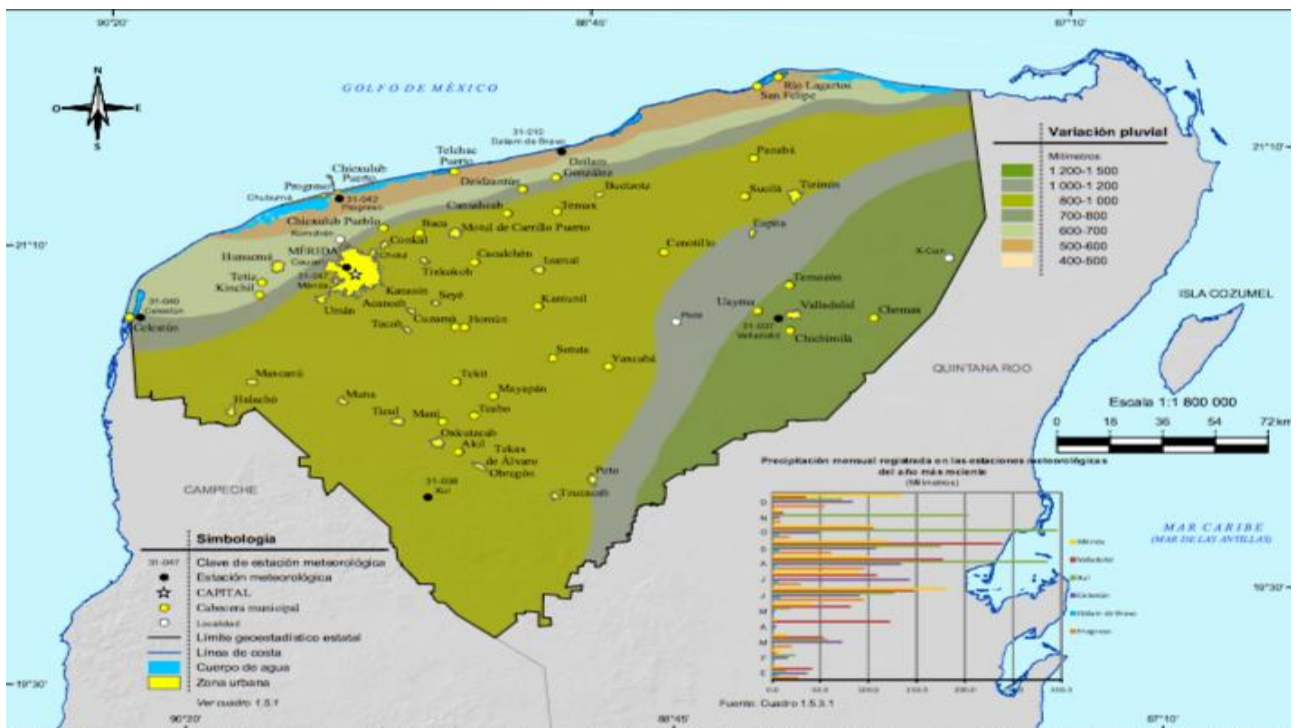


Fig 2. Variación pluvial en las diferentes regiones de la Península de Yucatán, 2015. (INEGI, 2016)

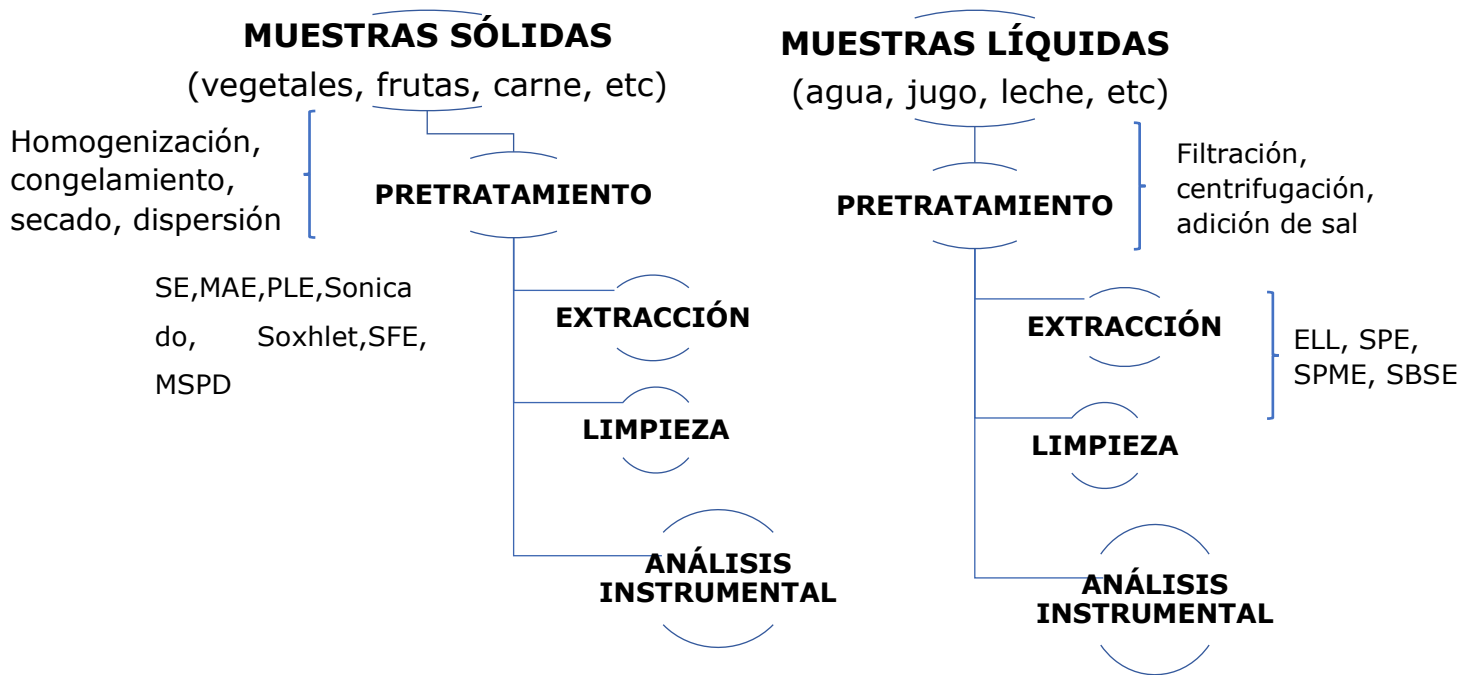


Fig 3. Diagrama del proceso de análisis de muestras alimenticias (sólidas y líquidas). Donde los métodos de extracción mencionados son: SE (Extracción con Solventes), MAE (Extracción asistida con microondas), PLE (Extracción de líquido presurizado ó ASE- Extracción de solventes acelerados), Sonication (Sonicación), Soxhlet, SFE (Extracción de fluido supercrítico) y MSPD (Dispersión matricial en Fase Sólida). ELL (Extracción líquido-líquido), SPE (Extracción en Fase Sólida), SPME (Micro extracción en Fase Sólida) y SBSE (Stir-bar sorptive extraction).

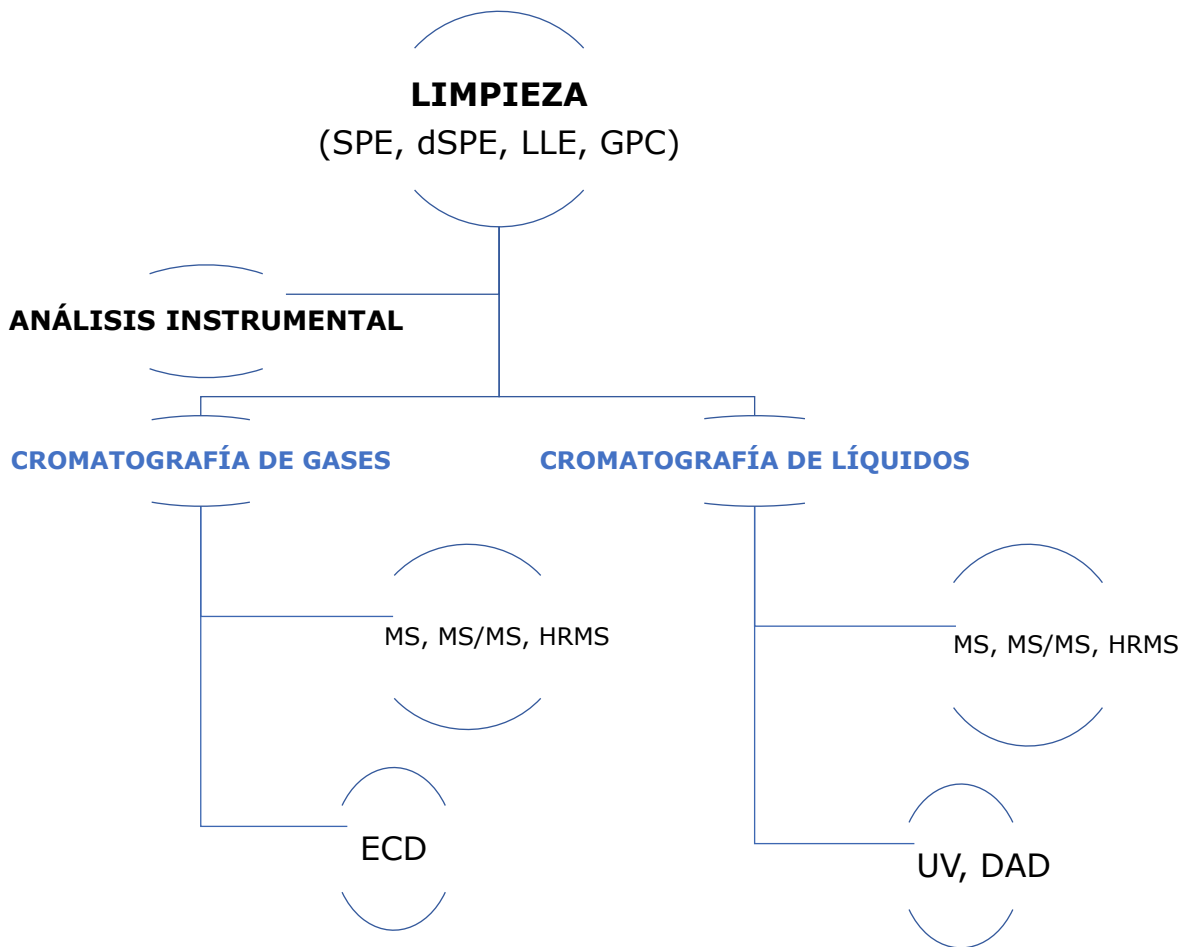


Fig 4. Diagrama de las formas básicas de limpieza y análisis instrumental para la determinación de contaminantes en muestras sólidas y líquidas, dónde los métodos de limpieza son: SPE (Solid Phase Extraction), dSPE (Extracción dispersiva en fase solida), LLE (Extracción líquido-líquido) y GPC (Cromatografía en gel permeable). ECD: Detector de Captura de Electrones, DAD: detector de arreglo de diodos . (Leo Nollet, 2011).

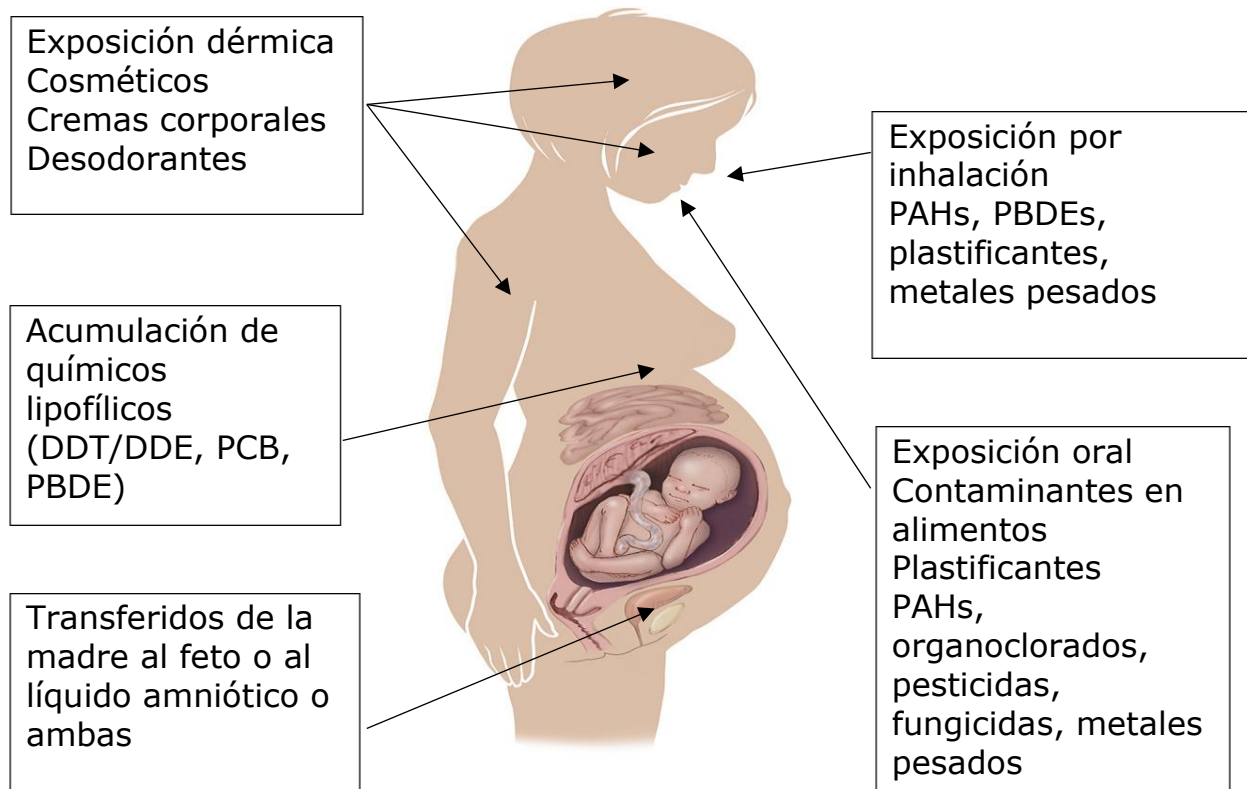


Fig 5. Vías de ingreso de contaminantes al cuerpo humano. De manera muy particular, en el caso de la población de la península de Yucatán, muchos de estos compuestos entran en contacto con la población, por medio del agua, debido a la dinámica del acuífero de la península. (Leo Nollet, 2011)

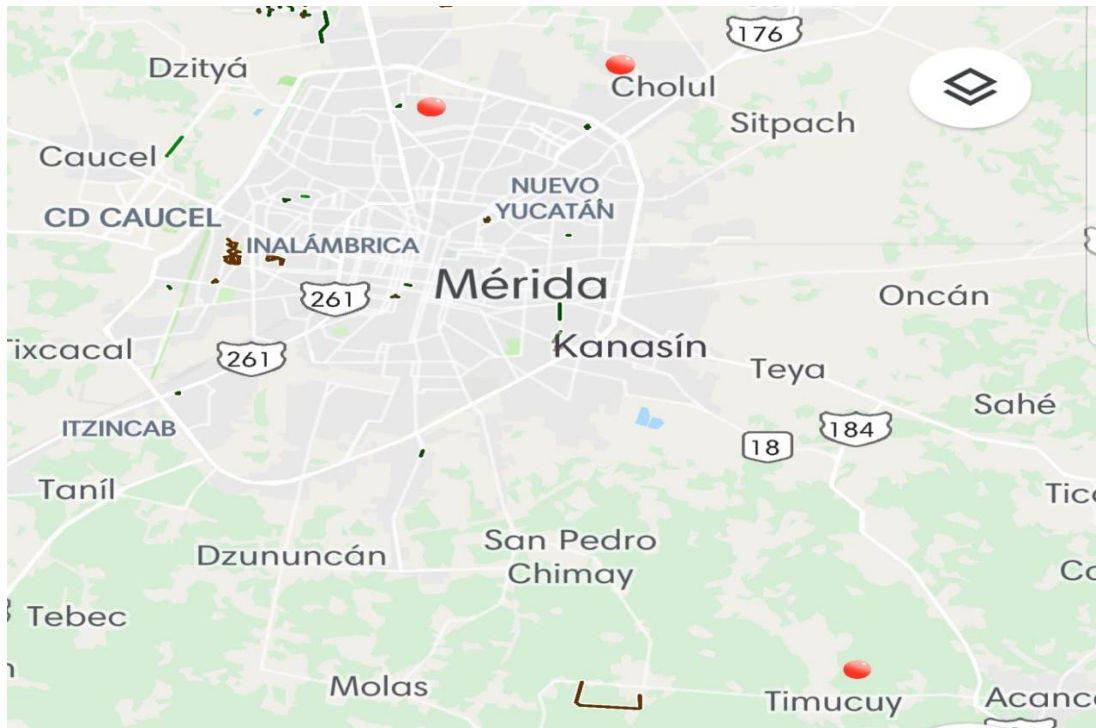


Fig 6. Ubicación georreferenciada de las zonas muestreadas: Cholul, Montes Amé y Timucuy (puntos en rojo).



Fig 7. Invernadero Colectivo Milpa, Col. Montes de Amé (en la Cd. de Mérida).



Fig 8. Enriquecimiento en SPE, con cartuchos Strata C18-U Phenomenex de 8 L de agua de cada pozo muestreado.

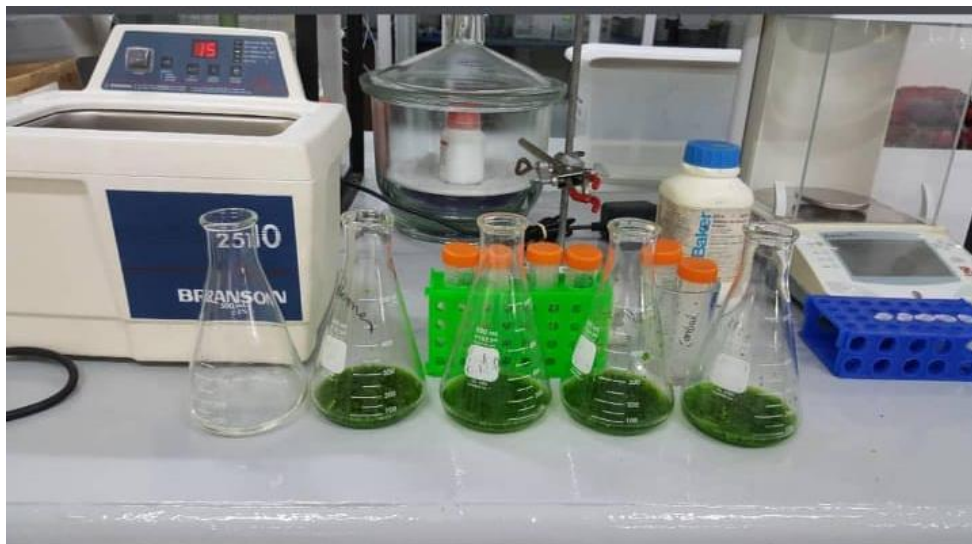


Fig 9. Elaboración de extractos.



Fig 10. Limpieza de las muestras de arúgula con la técnica de QuEChERS (Quick Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe, tubo de centrifuga de 15 mL).



Fig 11. Rotavapor Buchi R-215

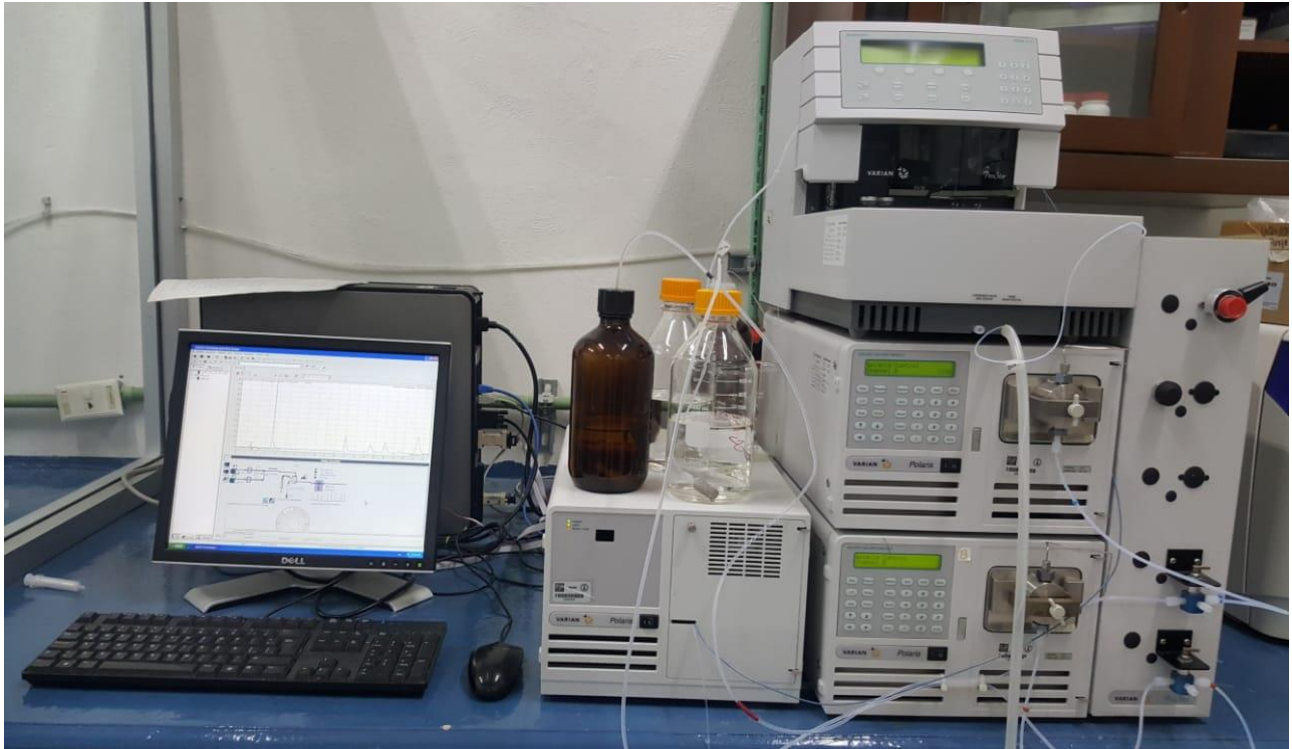


Fig 12. Sistema CLAR Polaris 211 de Varian, empleado para la determinación de los filtros solares en agua de riego y hortalizas

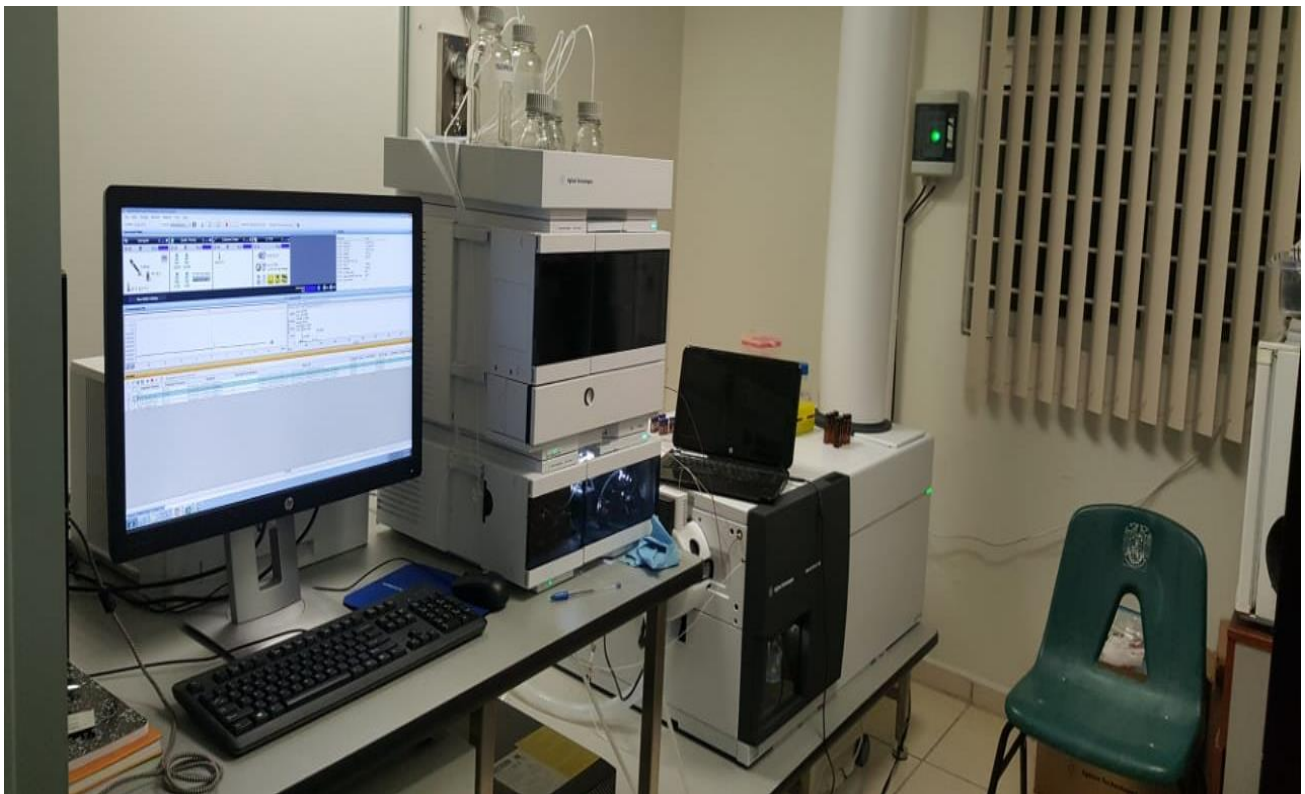


Fig 13. Equipo Agilent 6545 QToF de CL-EMAR (UJAT-C.I.C.T.A.T)



Fig 14. Las etapas del desarrollo embrionario suceden rápidamente; se dan en horas pasada la fecundación (hpf) o días pasada la fecundación (dpf). (Rojas, Bernad & Izpisua, 2007).

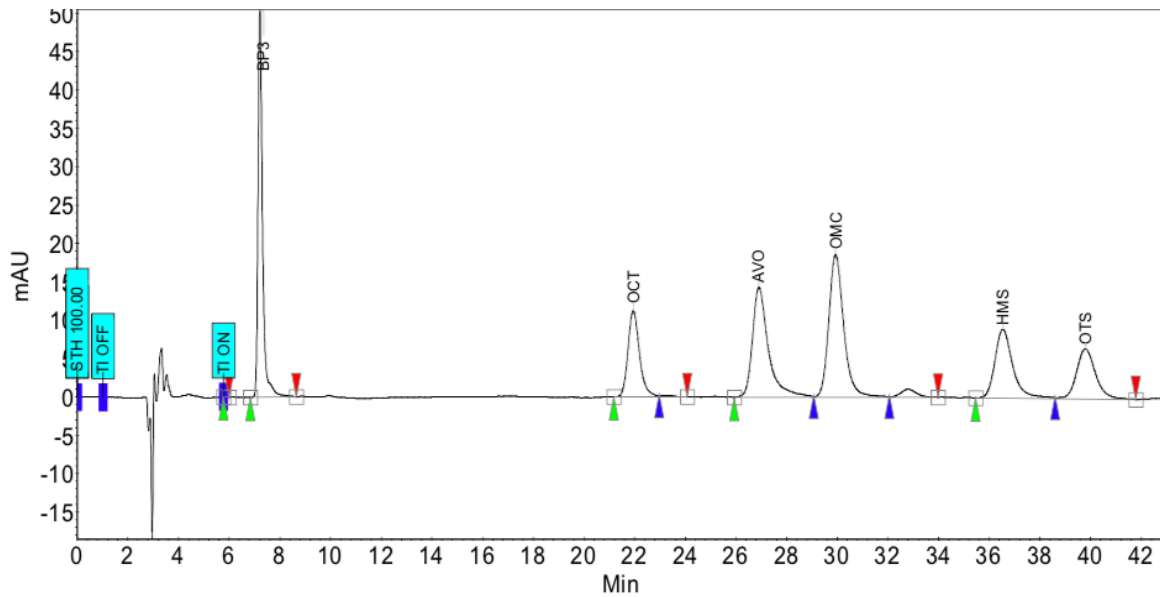
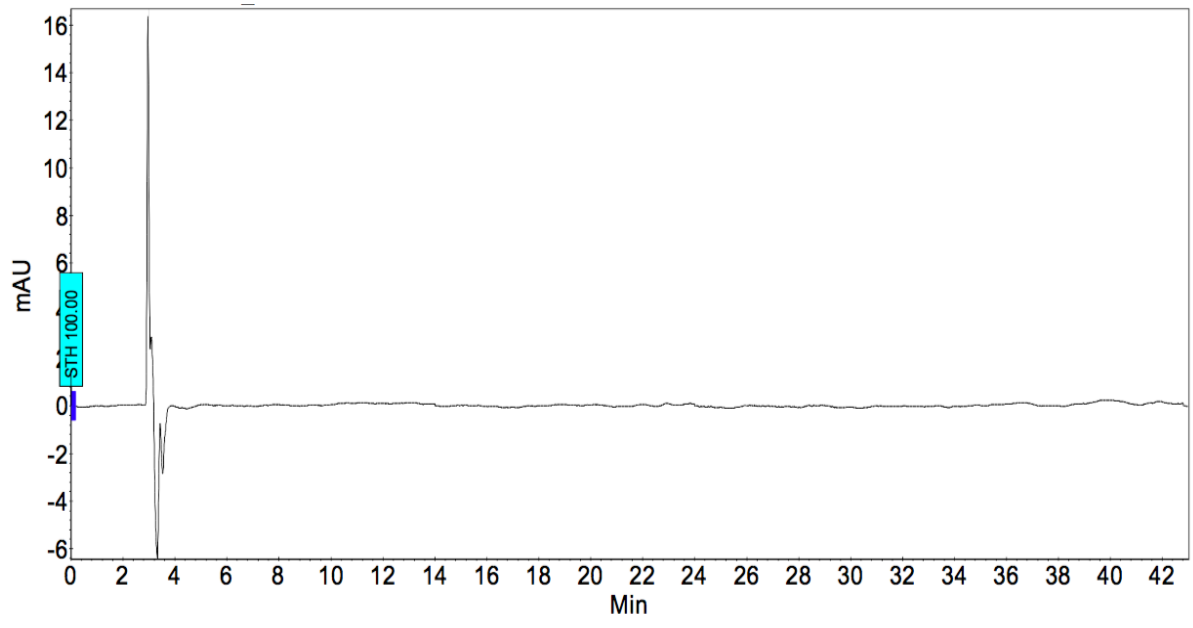


Fig 15. Cromatograma de la solución estándar con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cada filtro solar.



Fig

16. Cromatograma de la solución blanco.

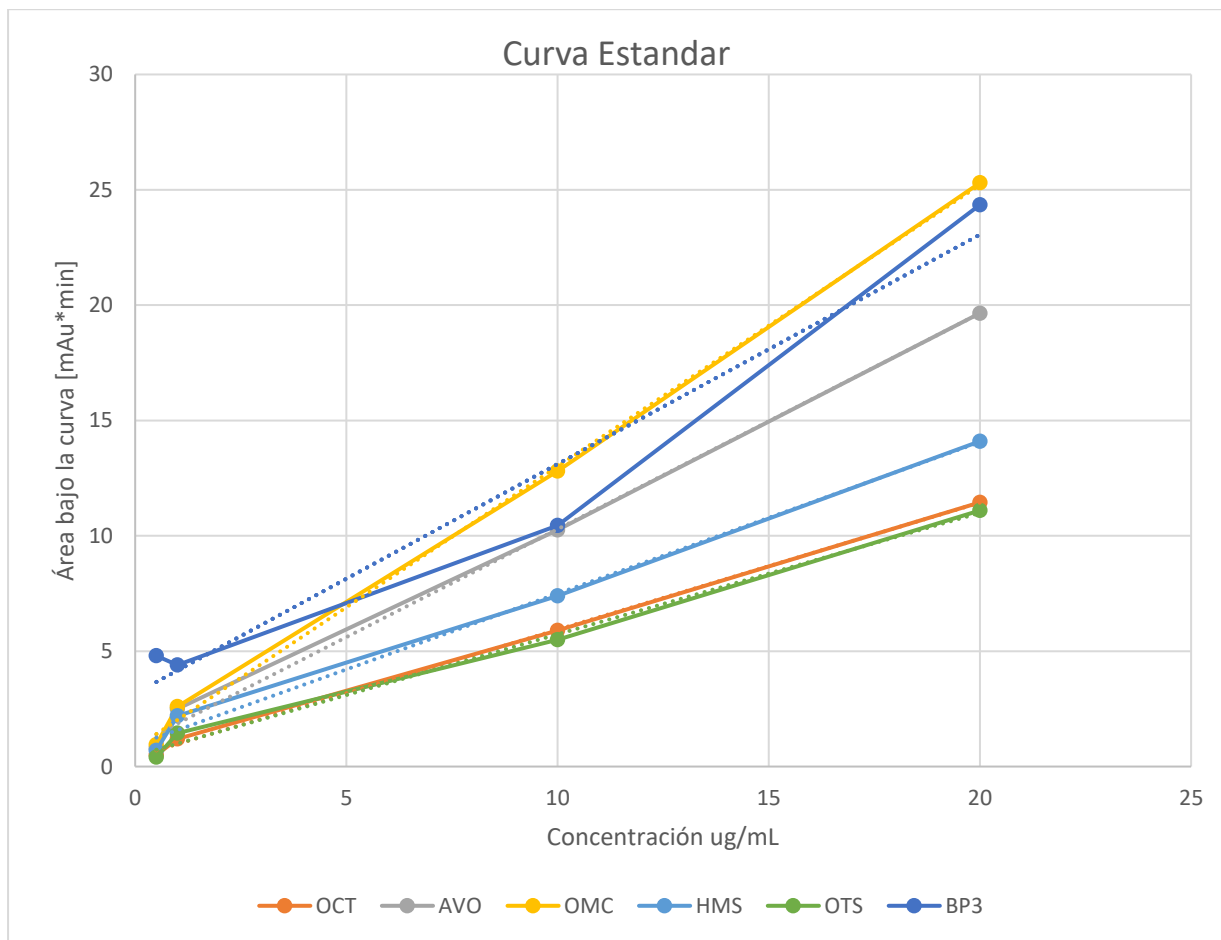


Fig 17. Curva estándar determinada para los 6 filtros solares a diferentes concentraciones.

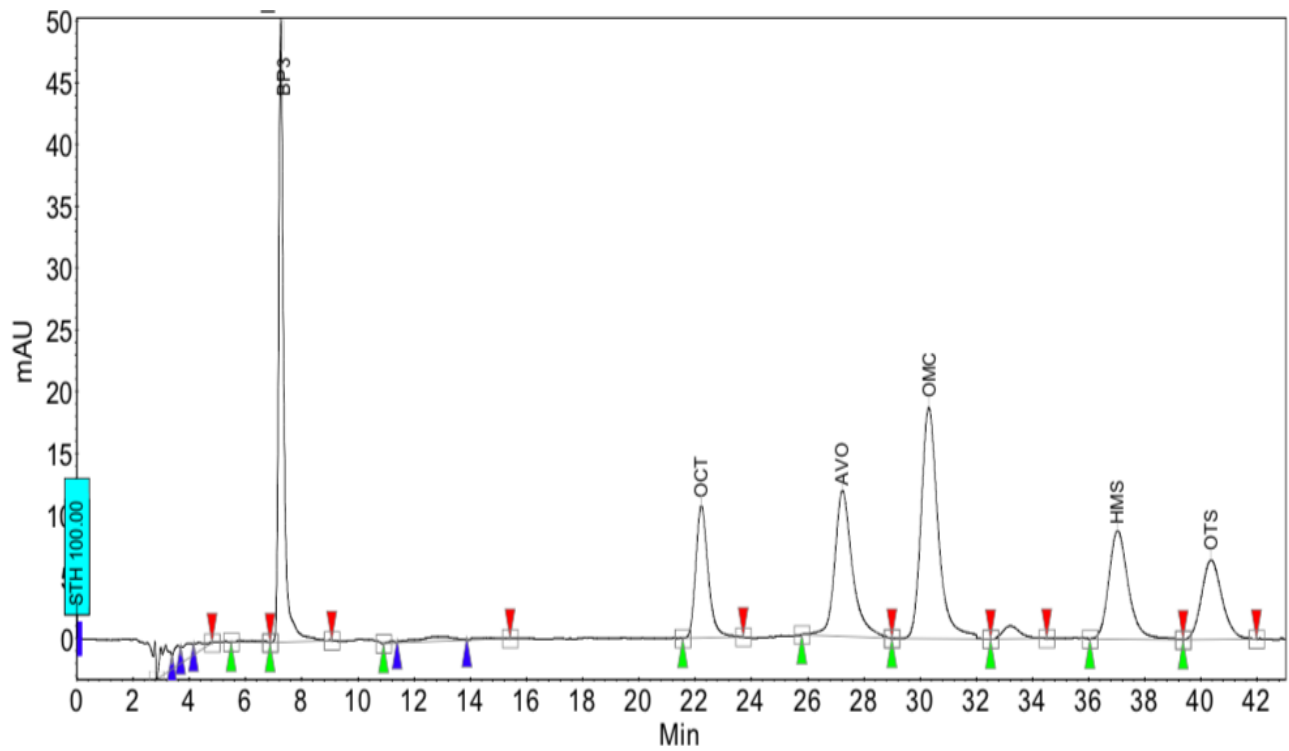


Fig 18. Cromatograma del recobro de la solución estándar de 20 µg/mL con diclorometano/MeOH (1:1).

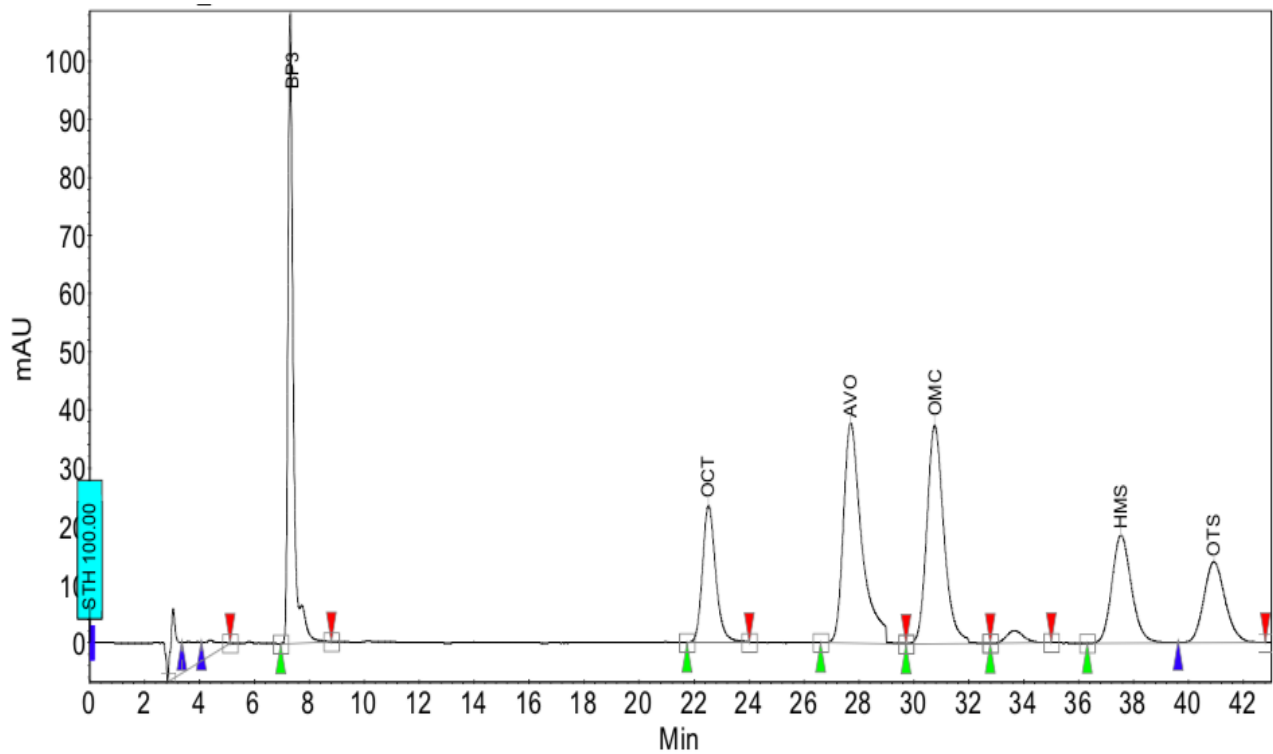


Fig 19. Cromatograma del recobro de la solución estándar de 100 µg/mL con diclorometano/MeOH (1:1).

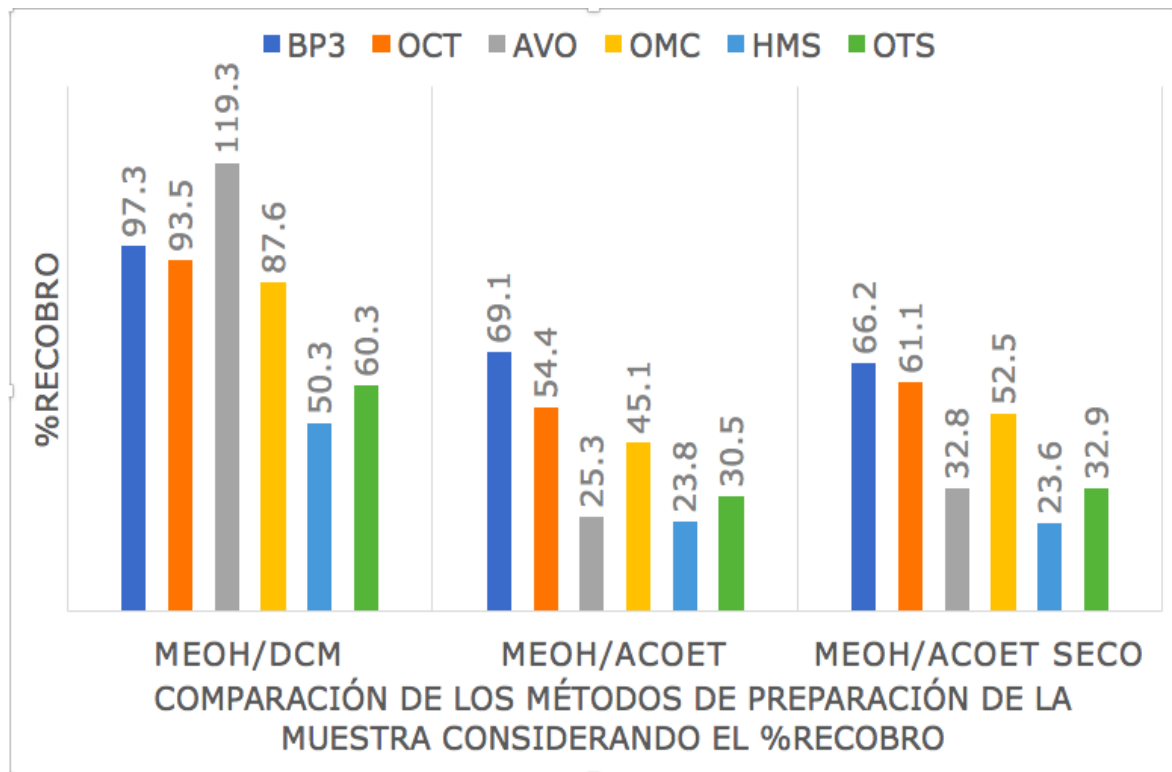
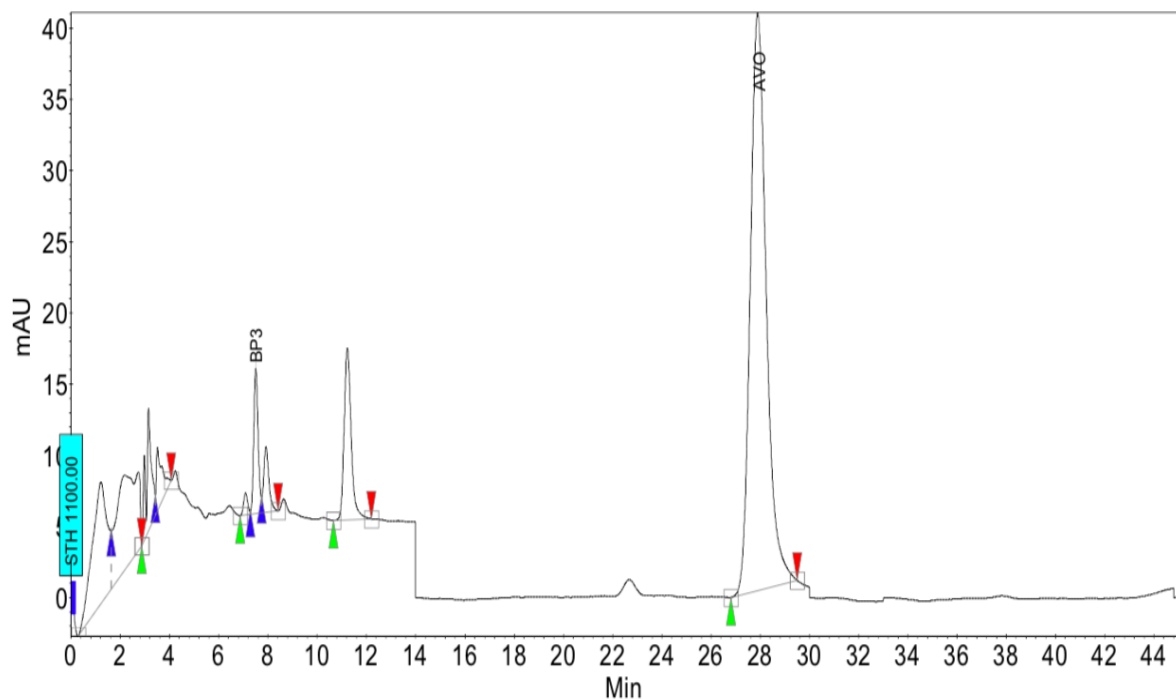


Fig.

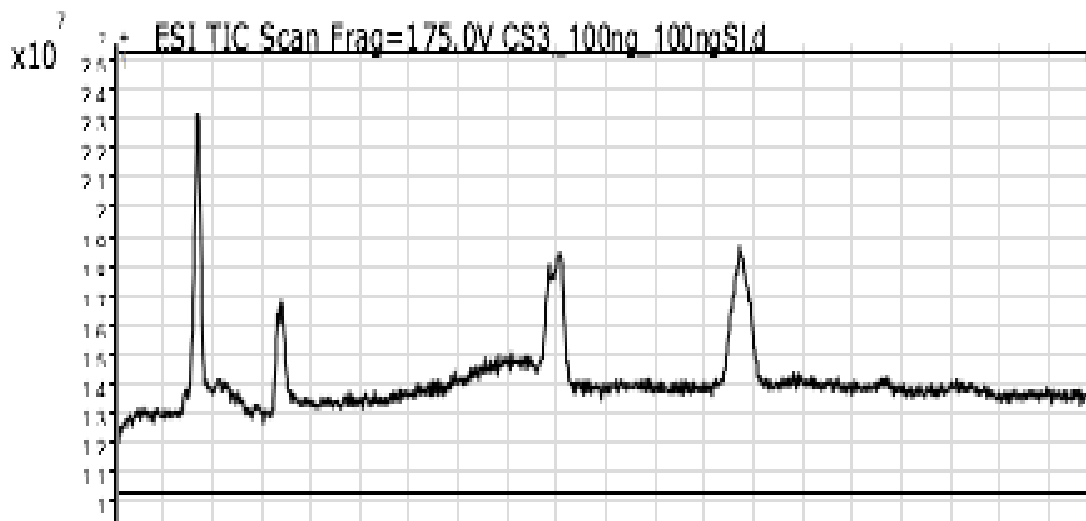
20. Comparación de los métodos de preparación de la muestra considerando la recuperación y los resultados de la RSD.



Fig

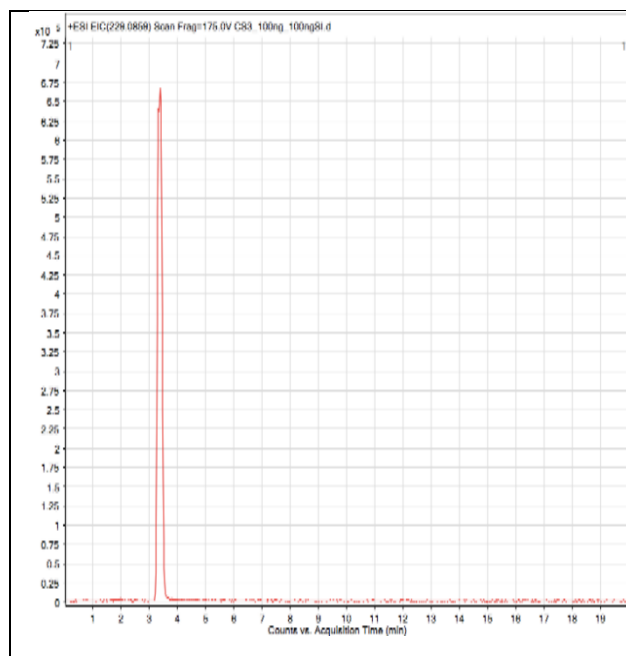
21. Cromatograma de una de las muestras de agua (Montes Amé) por CLAR. La disminución en la absorbancia en el cromatograma en 14 min es debido al

cambio de la longitud de onda para cuantificar cada analito, en este caso AVO (306 nm).

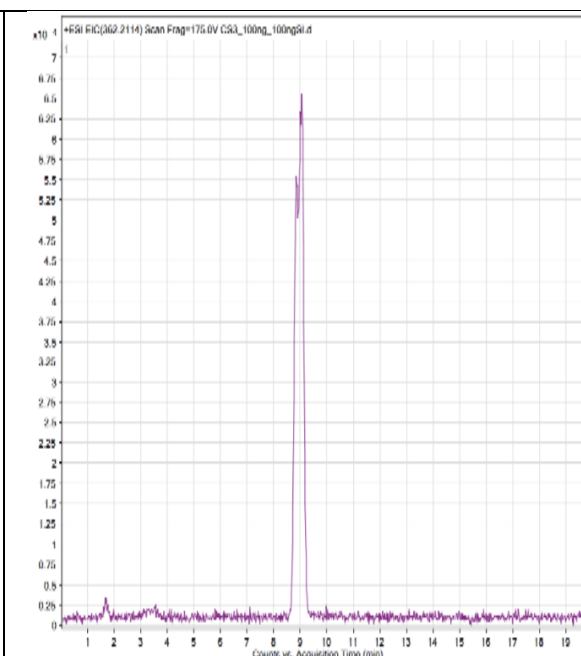


Fig

22. Cromatograma (TIC) de los estándares no ácidos (BP3, AVO, OMC y OCT)



BP3; PM [M+H]⁺ = 229.0859,
tr = 3.42 min



OCT; PM [M+H]⁺ = 362.2114,
tr = 8.97 min

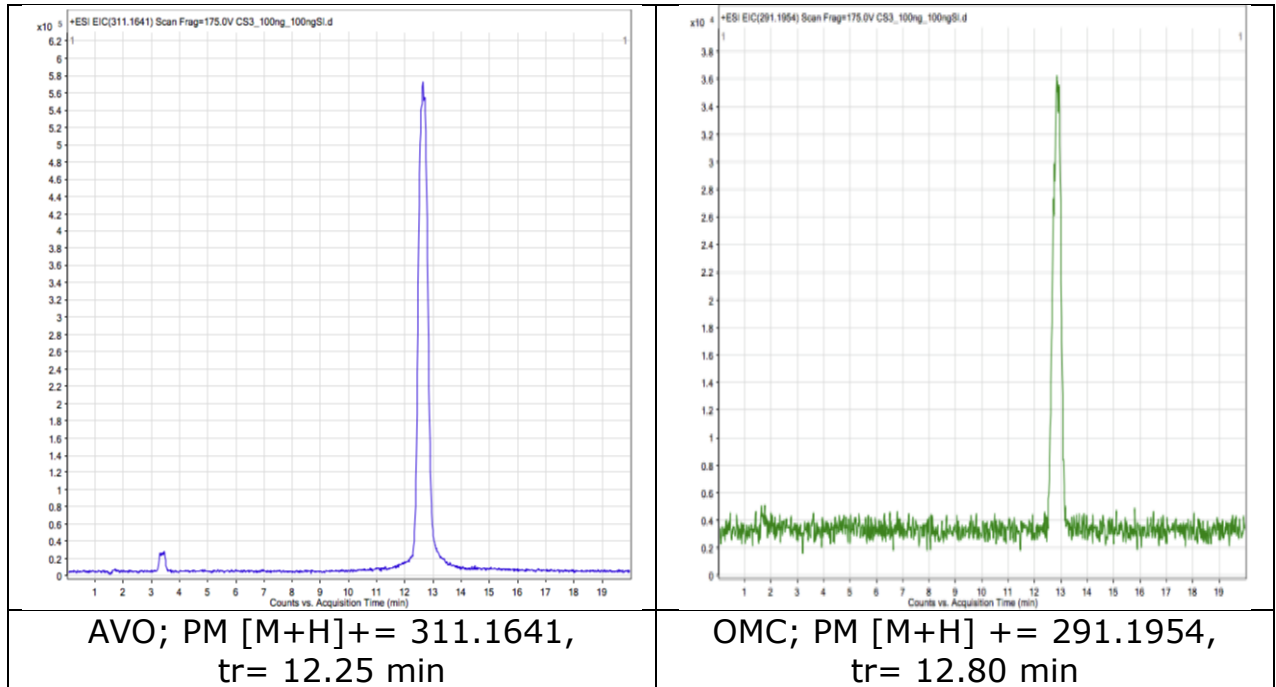


Fig 23. Extracción (EIC) del cromatograma de los pesos moleculares de cada uno de los filtros solares no ácidos en CL-EMAR

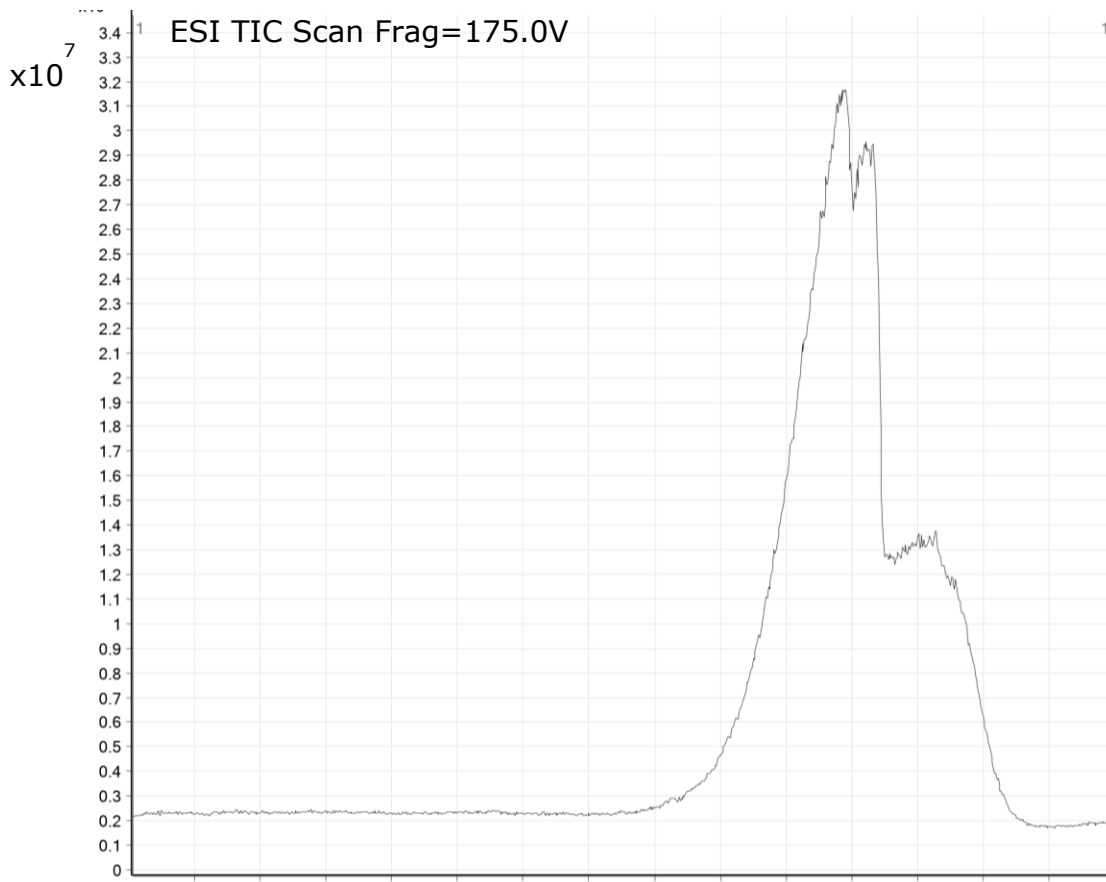


Fig 24. Cromatograma (TIC) de los estándares ácidos (OTS y HMS)

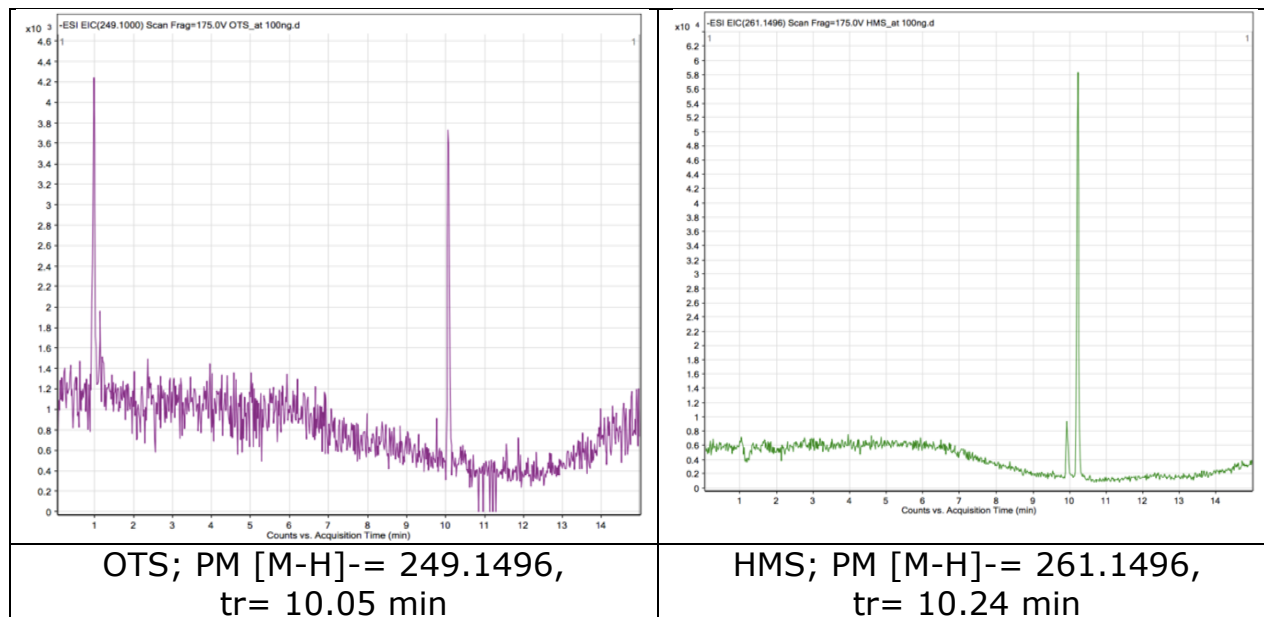


Fig 25. Extracción (EIC) del cromatograma de los pesos moleculares de cada uno de los filtros solares ácidos en CL-EMAR

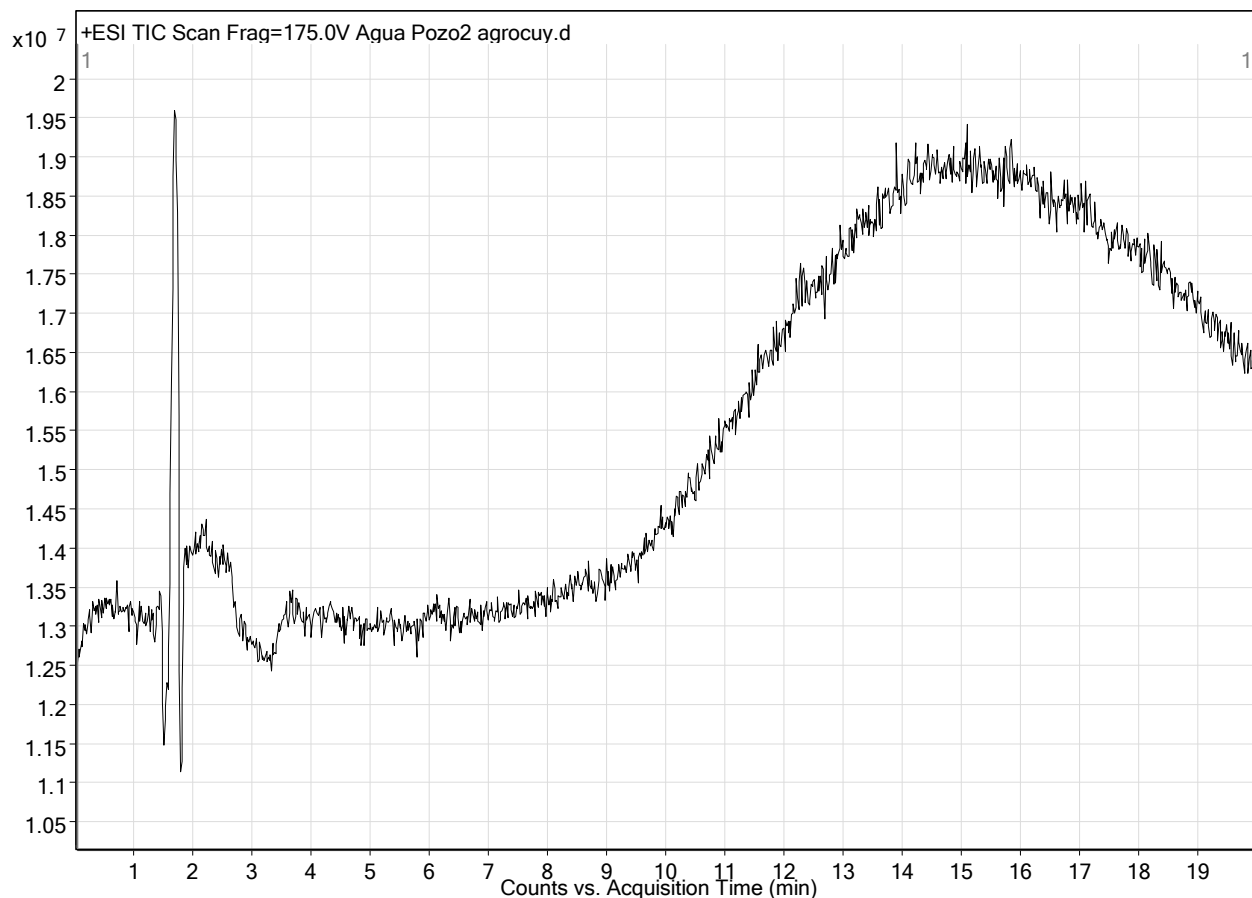


Fig 26. Cromatograma (TIC) muestra de agua de pozo de Timucuy en modo positivo.

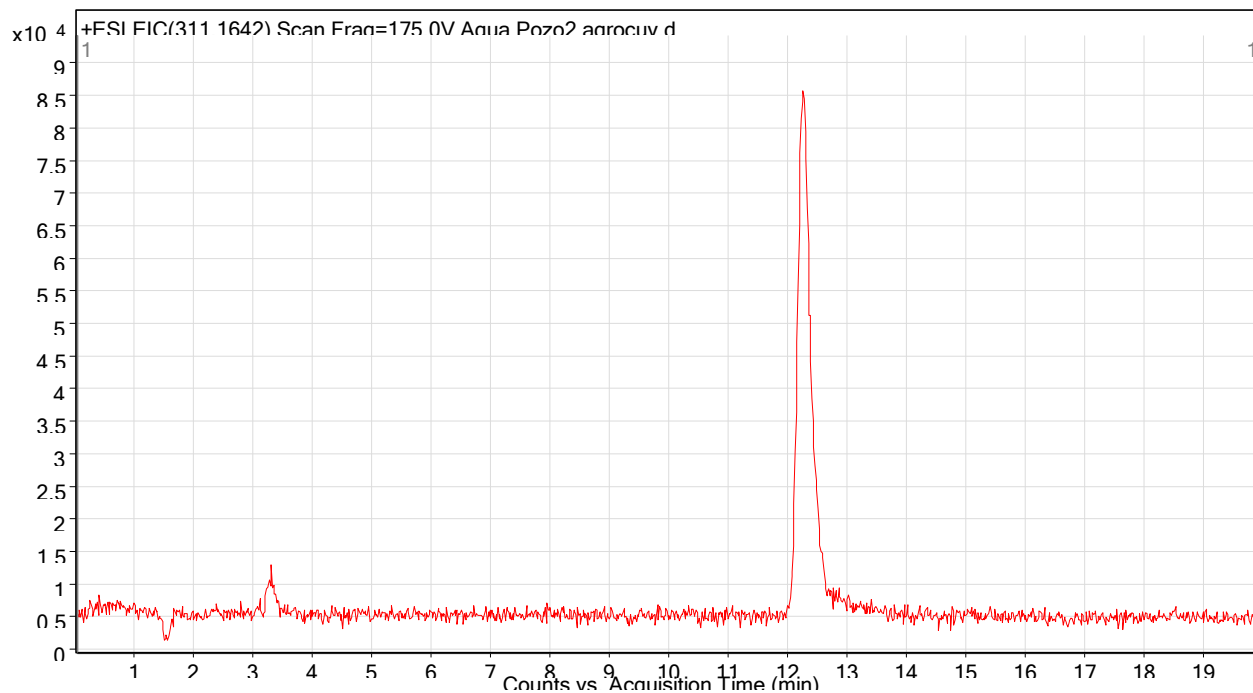


Fig 27. Extracción (EIC) del cromatograma de la muestra de agua de Timucuy para determinación de avobenzona.

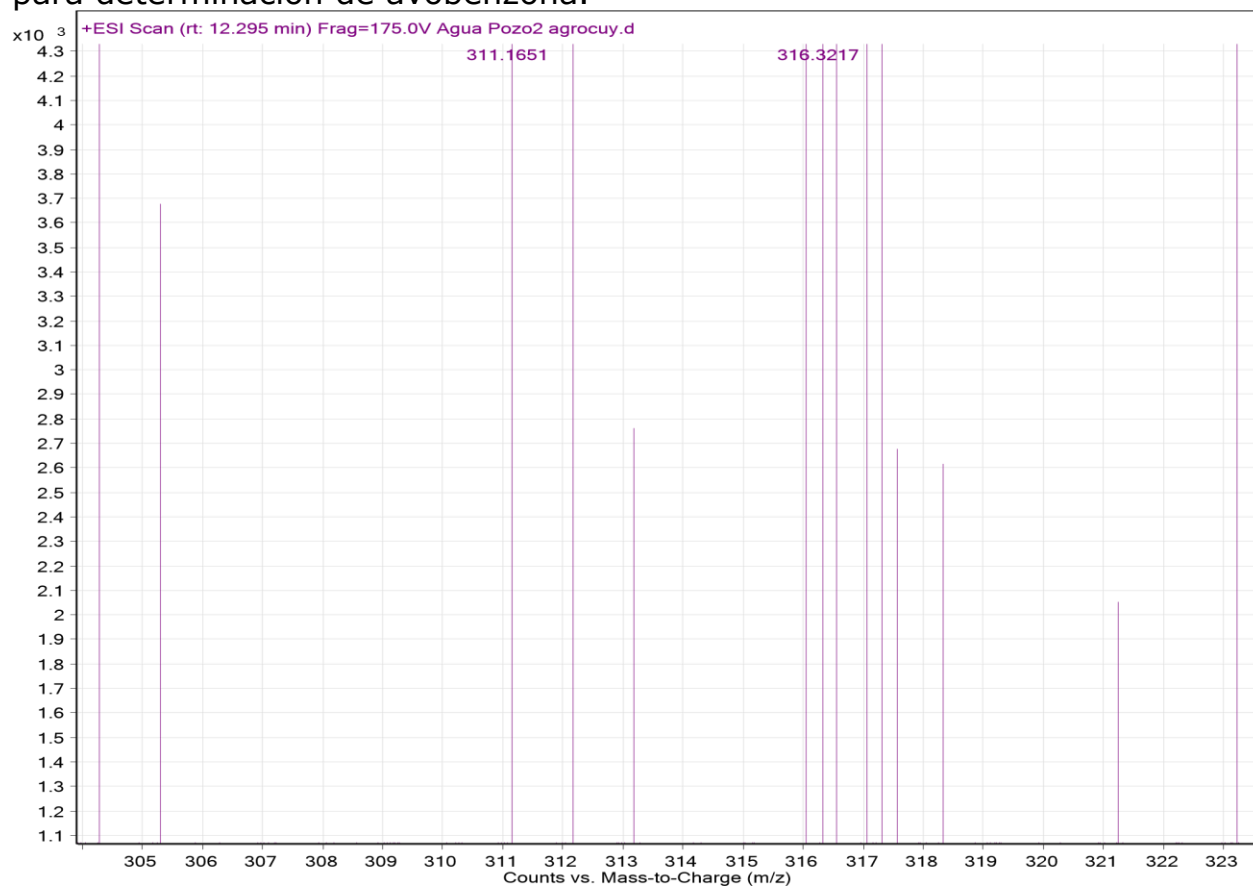


Fig 28. Espectro de masas del pico extraído para determinación de avobenzona.

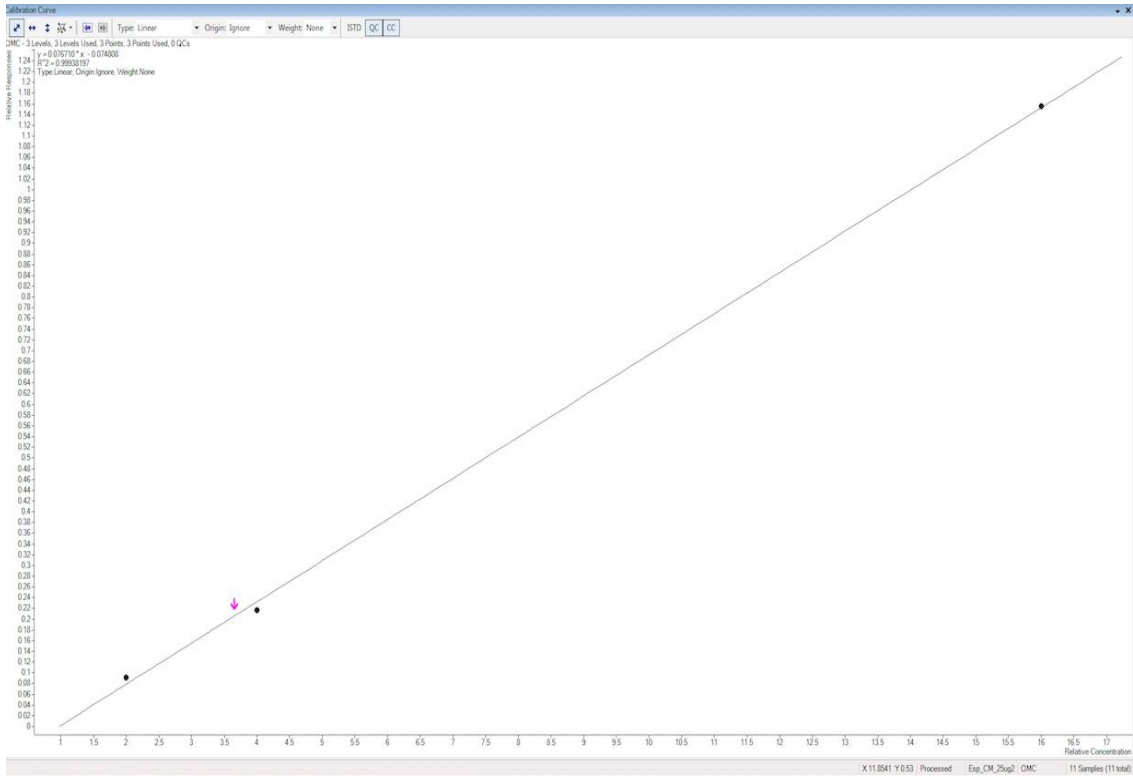


Fig 29. Curva de calibración del filtro solar OMC en CL-EMAR.

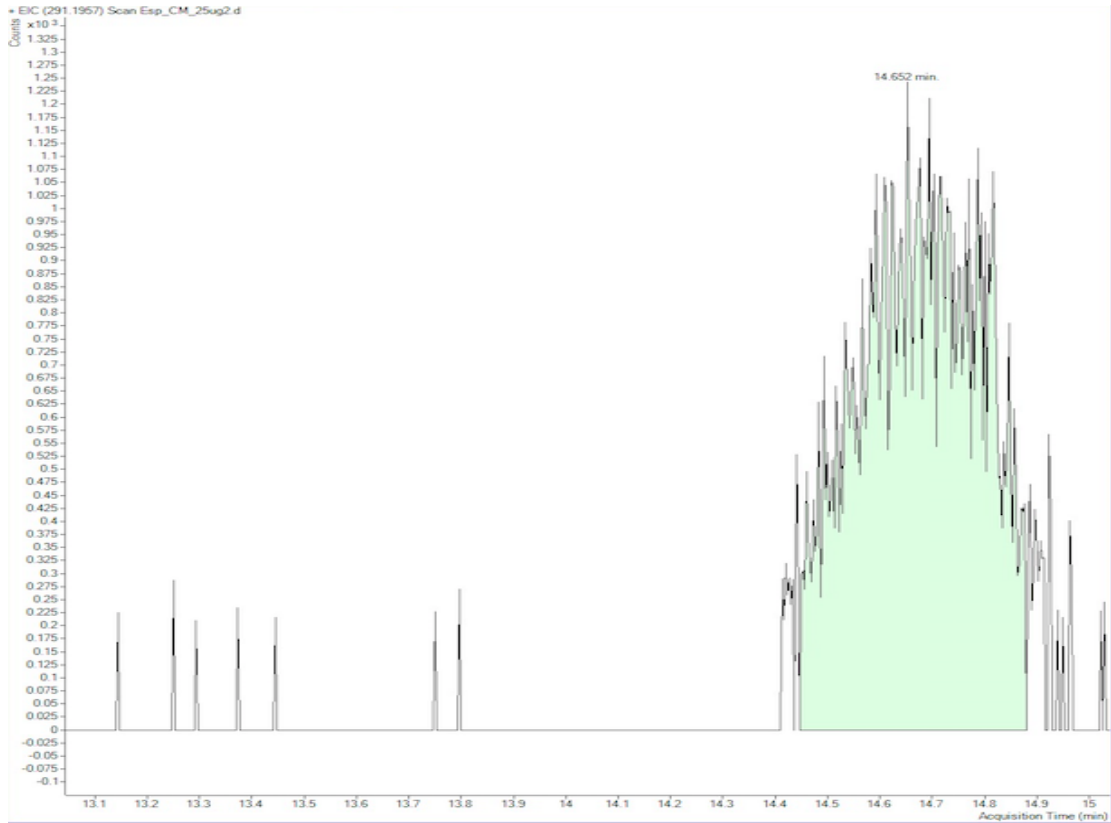


Fig 30. Cromatograma EIC de la muestra de espinaca del invernadero ubicado en Montes Amé (Colectivo Milpa).

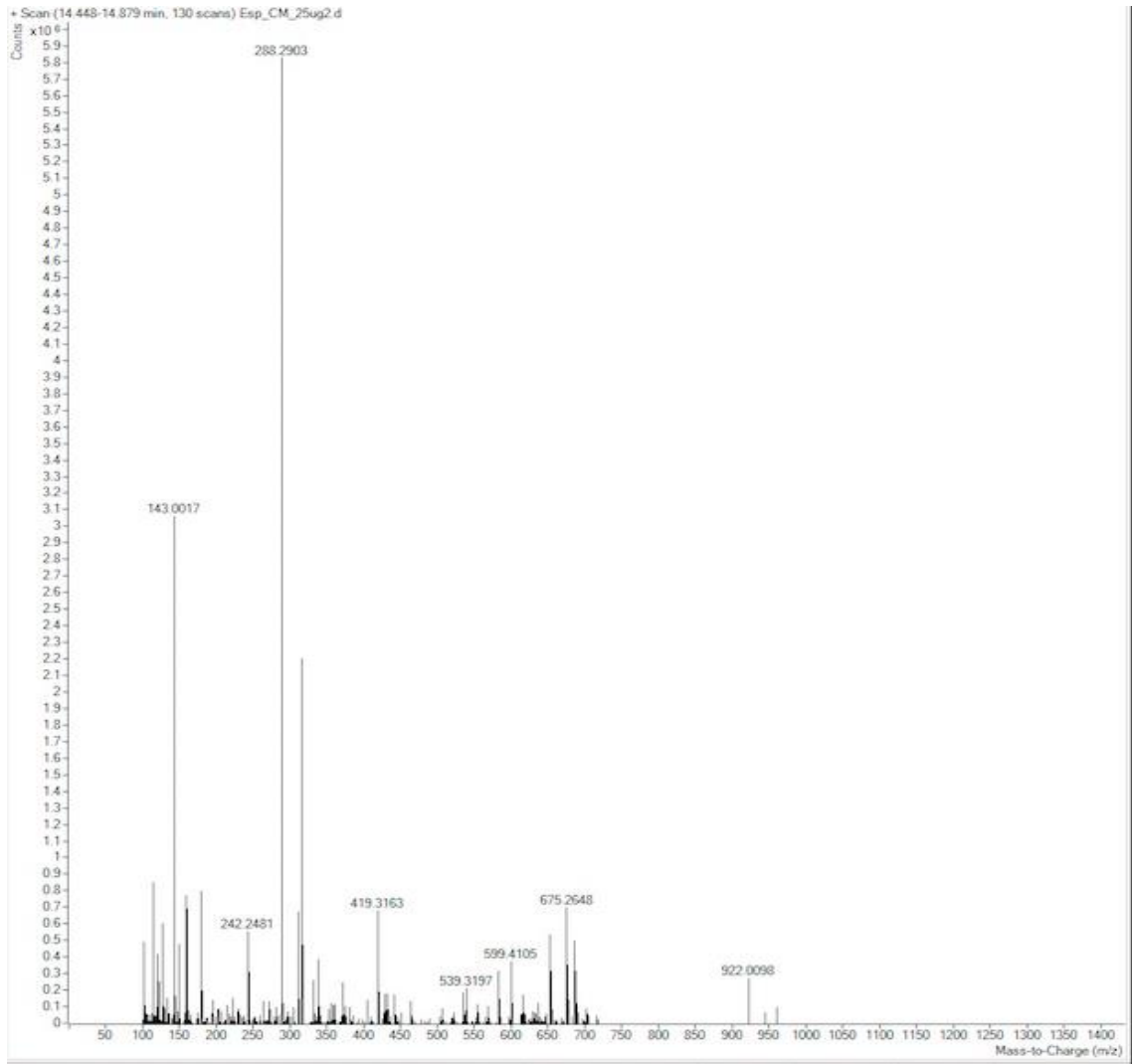
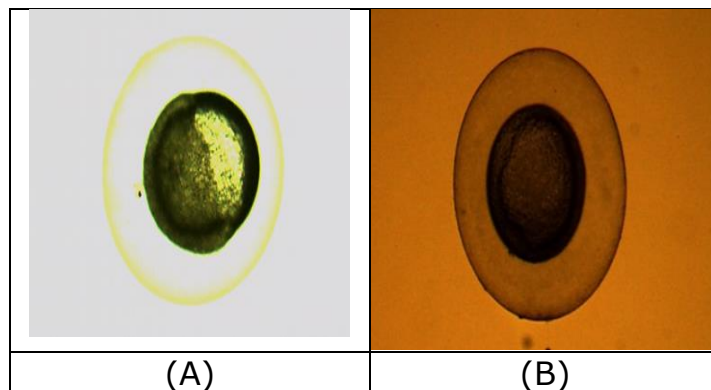


Fig 31. Espectro de masas de la muestra de espinaca de Montes Amé.



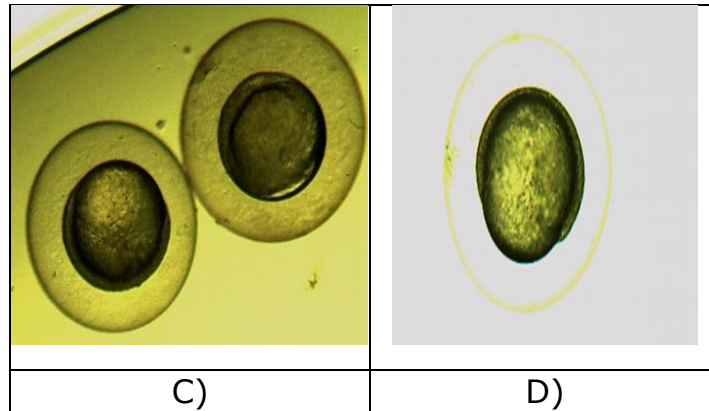


Figura 32. Efecto de los filtros solares seleccionados (AVO, BP3, OMC y OTC) sobre embriones de pez cebra al inicio del estudio (4 hpf). A) Control, agua de garrafón, a B) 100; C) 10; D) 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Objetivo: 4X en microscopio de contraste de fase invertido Primo Vert (Carl Zeiss). Se observa un desarrollo normal en los cuatro tratamientos.

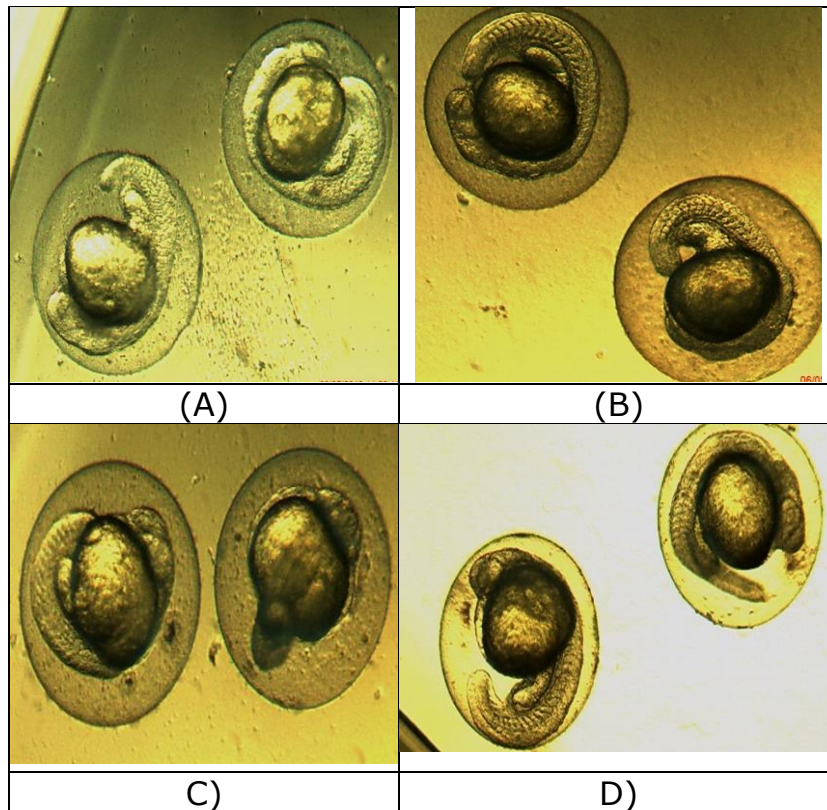


Figura 33. Efecto de los filtros solares seleccionados (AVO, BP3, OMC y OTC) sobre embriones de pez cebra (24 hpf). A) Control, agua de garrafón, a B) 100; C) 10; D) 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Objetivo: 4X en microscopio de contraste de fase invertido Primo Vert (Carl Zeiss). Se observa un desarrollo normal en los cuatro tratamientos.

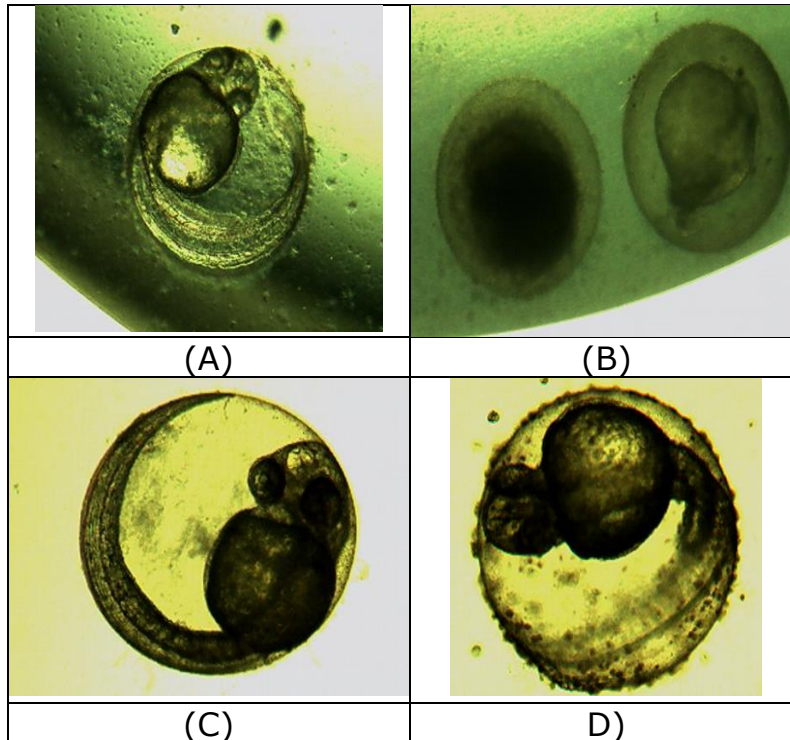
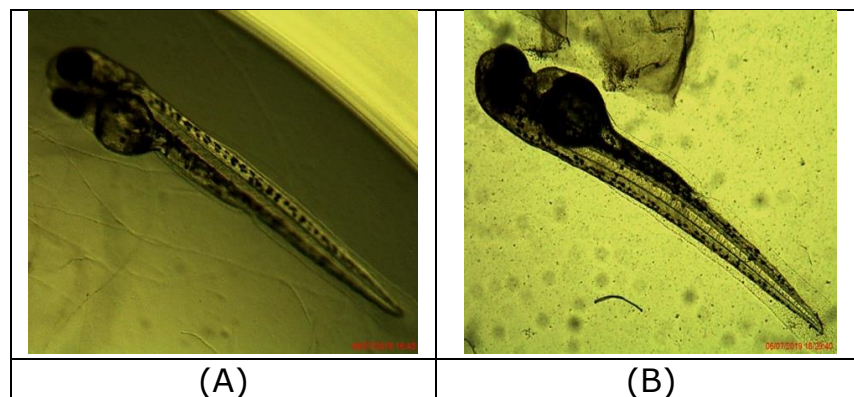


Fig 34. Efecto de los filtros solares seleccionados (AVO, BP3, OMC y OTC) sobre embriones de pez cebra (48 hpf). A) Control, agua de garrafón, a B) 100; C) 10; D) 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Objetivo: 4X en microscopio de contraste de fase invertido Primo Vert (Carl Zeiss). En el tratamiento de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observa precipitación de los compuestos, en el control y el resto de los tratameintos se observa un desarrollo normal de los organismos.



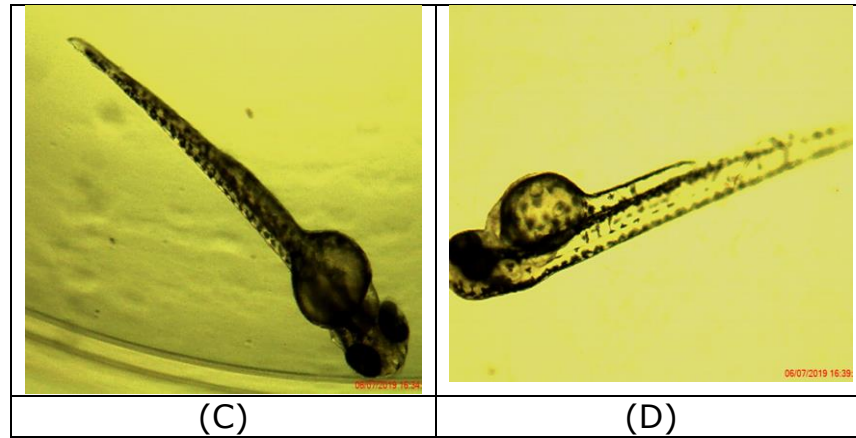


Fig 35. Efecto de los filtros solares seleccionados (AVO, BP3, OMC y OTC) sobre embriones de pez cebra (72 hpf). A) Control, agua de garrafón, a B) 100; C) 10; D) 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Objetivo: 4X en microscopio de contraste de fase invertido Primo Vert (Carl Zeiss). Se observa un desarrollo normal en los cuatro tratamientos.

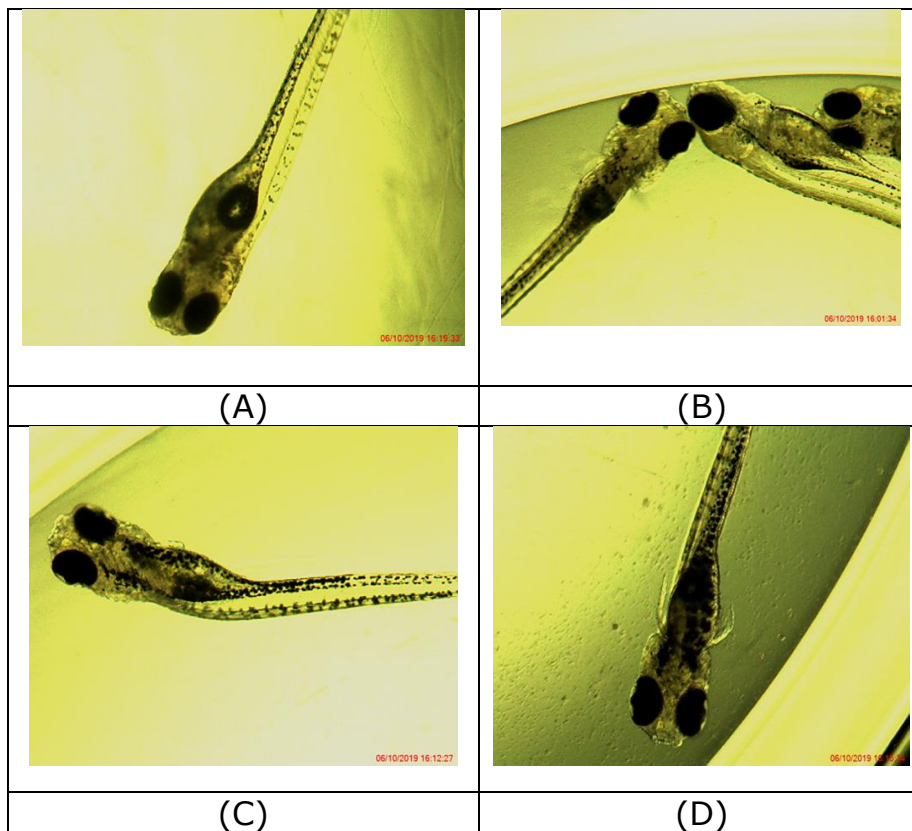
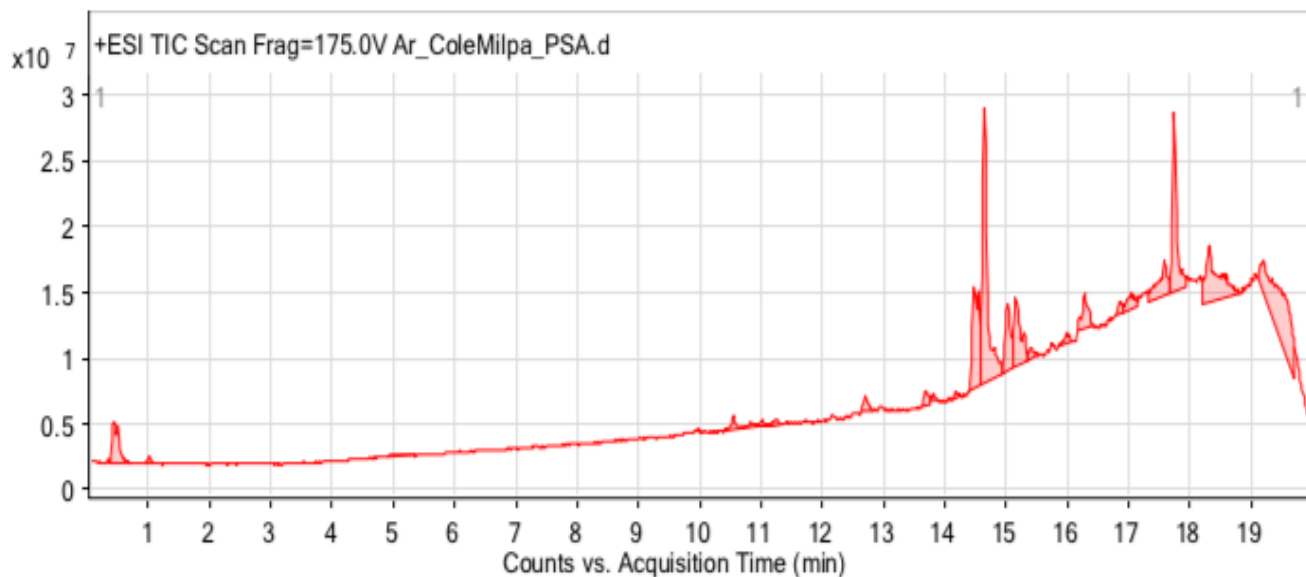


Figura 36. Efecto de los filtros solares seleccionados (AVO, BP3, OMC y OTC) sobre embriones de pez cebra (5 dpf). A) Control, agua de garrafón, B) 100; C) 10; D) 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Objetivo: 4X en microscopio de contraste de fase invertido Primo Vert (Carl Zeiss). Se observa un desarrollo normal en los cuatro tratamientos.

User Chromatograms

Fragmentor Voltage 175 Collision Energy 0 Ionization Mode ESI



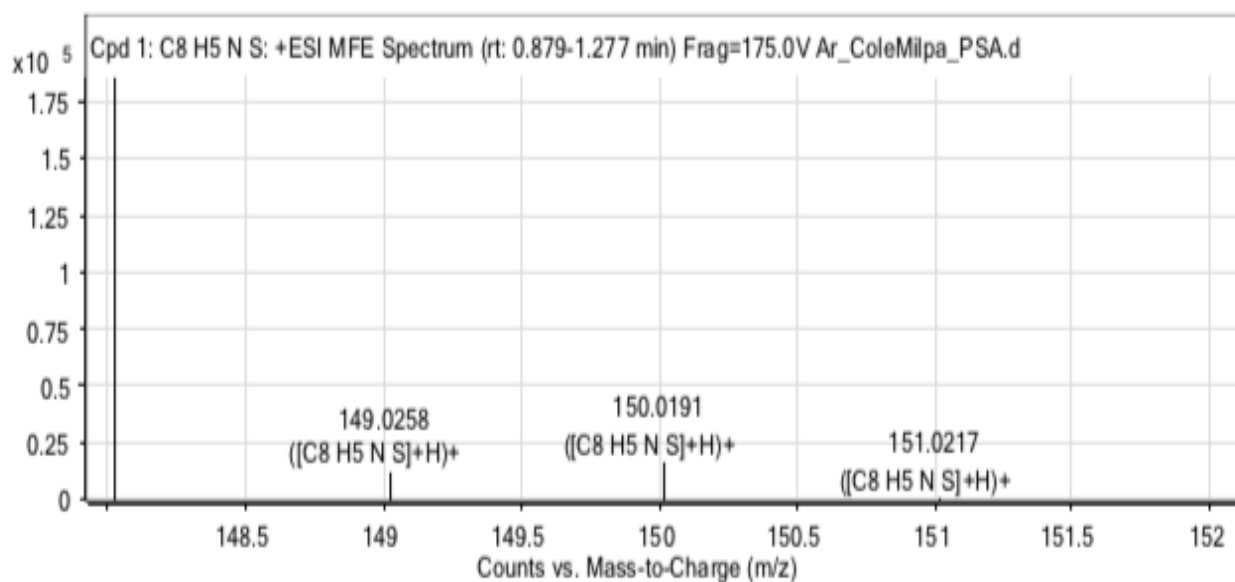
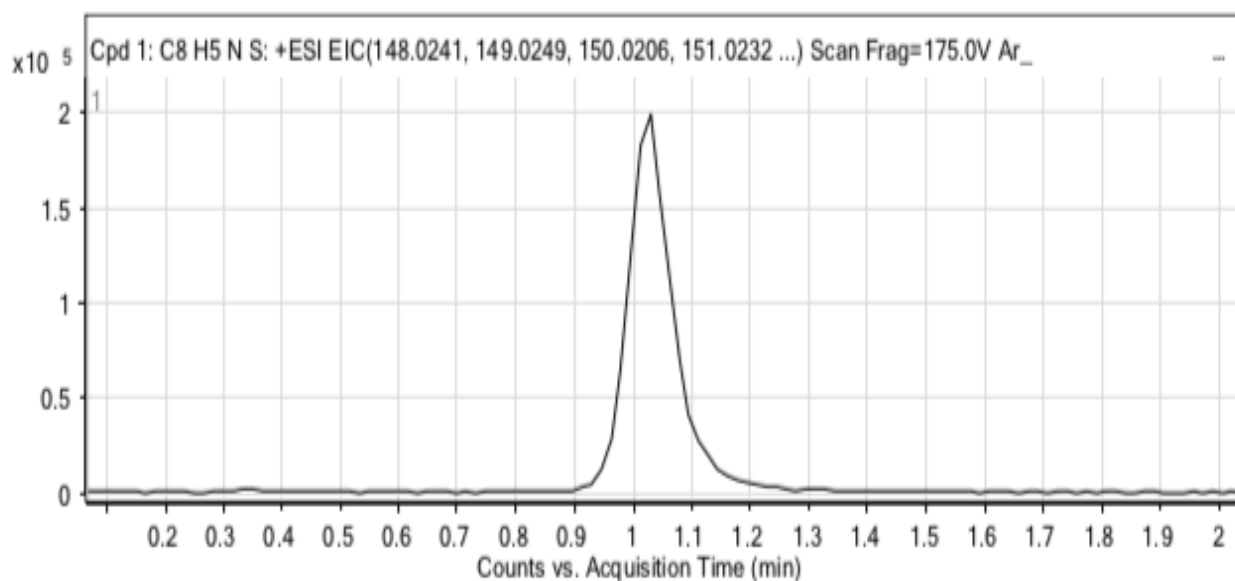
Integration Peak List

Peak	Start	RT	End	Height	Area	Area %
1	0.366	0.449	0.707	3113136.65	23386801.14	20.37
2	14.387	14.479	14.579	7818962.18	57902407.21	50.44
3	14.579	14.645	14.926	20894501.79	114802093.91	100
4	14.926	15.026	15.109	5034743.79	30864225.12	26.88
5	15.109	15.158	15.341	5300972.02	38954826.7	33.93
6	16.164	16.285	16.403	2573242.5	17430123.39	15.18
7	17.312	17.577	17.676	2683434.08	28968014.1	25.23
8	17.676	17.742	17.925	13588422.55	62962791.94	54.84
9	18.206	18.306	18.81	4429125.72	60892401.42	53.04
10	19.101	19.2	19.714	2477212.26	107073228.92	93.27

Fragmentor Voltage 175 Collision Energy 0 Ionization Mode ESI

Fig 37. Cromatograma ESI+ TIC de Arúgula (Montes Amé)

Compounds



Peak List

m/z	z	Abund	Formula	Ion
148.0229	1	185825.5	C8 H5 N S	(M+H)+
149.0258	1	12076.67	C8 H5 N S	(M+H)+
150.0191	1	16433.21	C8 H5 N S	(M+H)+
151.0217	1	1045.35	C8 H5 N S	(M+H)+
152.0155	1	446.44	C8 H5 N S	(M+H)+



Agilent Technologies

Fig 38. Reporte del primer compuesto encontrado en arúgula de Montes Amé

The screenshot shows the T3DB search interface. At the top, there are browser tabs for 'T3DB: Spectra Search Mass Sp...', 'T3DB: Methyl linoleate', 'T3DB: Diethyltoluamide', and 'PubChem'. The address bar shows 't3db.ca/spectra/ms/search'. The main interface has a green header with 'T3DB' and navigation links: 'Browse', 'Search', 'Downloads', 'About', and 'Contact Us'. Below the header, there is a search form with the following sections:

- Query Masses (Da):** A list of mass values: 148.0229, 359.2034, 192.1386, 246.2429, 272.2588, 318.2823, 274.2749, 230.2481, 121.0291, 279.1592, 149.0236, 288.2921, 300.2908, 288.2914, 199.1707.
- Ionization:** A dropdown menu set to 'Positive'.
- Adduct Type:** A dropdown menu with 'M+H' selected. Other options include Unknown, M+H-2H2O, M+H-H2O, M+NH4-H2O, M+Li, M+NH4, and M+Na.
- Molecular Weight Tolerance ±:** A text input field with '0.01' and a unit dropdown set to 'Da'.

On the right side of the form, there is a note: 'Enter one mass per line (multiple masses per request)'.

Fig 39. Búsqueda de compuestos encontrados en arúgula (Montes Amé) en base de datos T3DB.

MS search for 192.1386 m/z Delta = (abs(query mass - adduct mass)/adduct mass)*1000000

Show 10 entries

Search:

Compound	Name	Formula	Monoisotopic Mass	Adduct	Adduct M/Z	Delta (ppm)
T3D3827	Diethyltoluamide	C12H17NO	191.1310	M+H	192.1383	2

[m/z calculator](#)

Fig 40. Captura de pantalla de los resultados obtenidos al realizar la búsqueda de los compuestos presentes en Arúgula (Montes Amé) en base de datos T3DB, señalando la presencia de diethyltoluamide (diethyltoluamida).

