



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Determinación de filtros UV y almizcles en tilapia mediante Dispersión de Matriz en Fase Sólida seguida por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

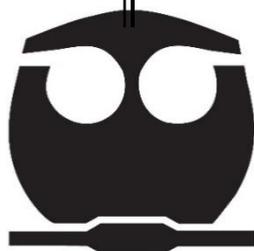
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA

PRESENTA:

NATALIA FERNANDA ROSAS ORTIZ



CDMX

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: **ARACELI PATRICIA PEÑA ÁLVAREZ**

VOCAL: **SILVIA CITLALLI GAMA GONZÁLEZ**

SECRETARIO: **LUIS ALEJANDRO DÍAZ FLORES**

1er. SUPLENTE: **TANIA ROJO PORTILLO**

2do. SUPLENTE: **IRAN OCAÑA RÍOS**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 101, Departamento de Química Analítica, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM

ASESORA DEL TEMA:

Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez

SUPERVISORA TÉCNICA:

Dra. Iran Ocaña Ríos

SUSTENTANTE:

Natalia Fernanda Rosas Ortiz

戴きます

(itadakimasu)

Agradecimientos

- › A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación y los recursos que me ha brindado para lograr cumplir mis metas y aportar a la sociedad mexicana.
- › A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por la beca otorgada del proyecto PAPIIT: IN214418 y a la Facultad de Química por el apoyo PAIP: 5000-9026
- › A la Mtra. María Elena Loeza Fuentes y al Dr. José de Jesús Olmos Espejel por proporcionar las muestras de tilapia para la realización del proyecto
- › Al Q. Ignacio Zúñiga Pérez de Perkin Elmer de México S.A. por el apoyo en el desarrollo de este proyecto
- › A la Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez y a la Dra. Iran Ocaña Ríos, por su apoyo y orientación en la realización y presentación de este trabajo.
- › A la Mtra. Silvia Citlalli Gama González y al Dr. Luis Alejandro Díaz Flores por sus aportaciones al presente escrito.

ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
JUSTIFICACIÓN	10
OBJETIVOS.....	10
Objetivo general.....	10
Objetivos particulares.....	11
a. INTRODUCCIÓN	12
b. ANTECEDENTES.....	15
b.1. Contaminación emergente	15
b.2. Productos de cuidado personal.....	17
b.2.1. Almizcles	19
b.2.2. Filtros UV.....	22
b.3. Bioacumulación	26
b.3.1. Monitoreo ambiental	27
b.3.1.1. Tilapia mojarra (<i>Oreochromis urolepis hornorum</i>).....	29
b.4. Preparación de muestra.....	32
b.4.1. Dispersión de matriz en fase sólida	33
b.4.2. Efecto matriz	36
b.5. Cromatografía.....	38
b.5.1. Cromatografía de gases	38
b.5.1.1. Acoplamiento con espectrometría de masas	44
b.6. Validación de una metodología analítica	47
c. DESARROLLO EXPERIMENTAL	53
c.1. Materiales, reactivos, instrumentos y equipos.....	53
c.2. Lavado de material	54
c.3. Muestras.....	54
c.4. Metodología.....	55
c.4.1. Pre – tratamiento de la muestra.....	55
c.4.2. Determinación del contenido de grasa y humedad en músculo de tilapia... ..	56
c.4.3. Preparación de las disoluciones	56
c.4.4. Fortificación de muestras.....	56

c.4.5.	Desarrollo de MSPD para tilapia mojarra.....	57
c.4.6.	Metodología MSPD para tilapia mojarra	58
c.4.7.	Efecto matriz	58
c.4.8.	Análisis cromatográfico.....	60
c.4.9.	Validación del método.....	60
c.4.10.	Obtención de muestras dopadas	61
d.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
d.1.	Desarrollo de la metodología	65
d.1.1.	Fase dispersante	65
d.1.2.	Uso de co-columna.....	65
d.1.3.	Relación muestra:dispersante	65
d.2.	Efecto matriz.....	66
d.3.	Validación del método MSPD-PSSI-GC-MS para tilapia mojarra	67
d.3.1.	Precisión y veracidad	67
d.3.2.	Linealidad	68
d.3.3.	Límites de detección y cuantificación.....	69
d.4.	Contenido de grasa y humedad en muestras de tilapia mojarra	69
d.5.	Aplicación del método MSPD-PSSI-GC-MS en muestras de tilapia	70
d.5.1.	Muestras dopadas	70
d.5.2.	Muestras ambientales	72
d.5.3.	Muestra comercial	73
e.	CONCLUSIONES	74
f.	REFERENCIAS	76
g.	ANEXOS.....	81
g.1.	<i>Curvas de calibración por analito – Linealidad.....</i>	81
g.2.	<i>Gráficos de residuales asociadas a la prueba de linealidad por analito ..</i>	83

LISTADO DE ABREVIATURAS

PCPs: Productos de cuidado personal	CI: Ionización química positiva
2-EHMC: 2-etilhexil-4-metoxicinamato	NCI: Ionización química negativa
BP-3: Oxibenzona	FAB: Bombardeo de átomos rápidos
4 – MBC: 3-(4-metilbenciliden) alcanfor	PSSI: Inyector programable
OC: Octocrileno	Split/Splitless
O-PABA: Padimato – O	LD: Límite de detección
AHTN: Tonalida	LC: Límite de cuantificación
HHCB: Galaxolida	S/N: Relación señal/ruido
B[a]A: Benzo [a] antraceno	SIR: Registro selectivo de iones
PDMS: Polidimetilsiloxano	US EPA: Agencia de Protección Ambiental estadounidense
AcOEt: Acetato de etilo	IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
UNODC: Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito	UV: Ultravioleta
DER: Desviación estándar relativa	AAP: Almizcles aromáticos policíclicos
EI: Estándar interno	HAP: Hidrocarburos aromáticos policíclicos
GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	PTAR: Planta de tratamiento de aguas residuales
MSPD: Dispersion de matriz en fase sólida	

RESUMEN

El desarrollo de técnicas analíticas más sensibles ha permitido detectar e identificar compuestos a nivel de trazas en diversas matrices. Debido a que los contaminantes emergentes provienen de una variedad de aplicaciones en muchos aspectos del desarrollo humano, fácilmente estos pueden llegar a agua superficial y a suelos con efectos negativos a corto y largo alcance. Puesto que la existencia de contaminantes emergentes en el ambiente no es una situación reciente, pero si su detección, estos compuestos no han sido cuantificados ni estudiados, por lo que no existen normas sanitarias que regulen su presencia en el ambiente. De aquí, la necesidad de caracterizar este tipo de contaminación en matrices ambientales ya que se desconoce el posible efecto que pueda tener en la salud humana. Se sabe que estos contaminantes pueden alterar ciclos fisiológicos en organismos acuáticos y presentar un efecto sinérgico con los hidrocarburos aromáticos policíclicos, ya presentes en el ambiente. El empleo de técnicas de preparación de muestra; aunado al análisis instrumental, cada vez más sensible, brinda nuevas alternativas para el monitoreo ambiental. En el presente trabajo, se realizó la optimización, validación y aplicación de un método que consiste en dispersión de matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés) como preparación de muestra; seguido del análisis por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC – MS, por sus siglas en inglés) con un Inyector Programable Split/Splitless (PSSI); para la determinación de dos grupos de contaminantes emergentes: almizcles aromáticos policíclicos (galaxolida, tonalida) y filtros UV (oxibenzona, padimato – O, 3-(4-metilbenciliden) alcanfor, 2 – etilhexil 4 – metoxicinamato, octocrileno) en Tilapia mojarra (*Oreochromis urolepis hornorum*). En la validación, para la repetibilidad

intra-día e inter día se obtuvieron DER < 20%, lo cual es aceptable de acuerdo a lo que establece la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC, por sus siglas en inglés), para la cuantificación a nivel de trazas en especímenes biológicos. Por otra parte, en la exactitud se obtuvieron recobros del 70-135%. Asimismo, se evaluó la linealidad del sistema obteniendo $R^2 > 0.98$ para los almizcles, mientras que para los filtros UV fue $R^2 > 0.99$. Los límites de detección se obtuvieron en el orden de ng/g (base seca), siendo el menor para galaxolida y 2 - EHMC (50 ng/g) y el mayor para 4 - MBC (500 ng/g). El límite de cuantificación más bajo fue 75 ng/g para 2 - EHMC, el más alto corresponde a oxibenzona y 4 - MBC (750 ng/g). Posteriormente, se aplicó el método en el análisis de muestras provenientes de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, el estado de Morelos y la alcaldía de Xochimilco. En la muestra de Morelos, se obtuvo oxibenzona (5.44 $\mu\text{g/g}$) y se identificó octocrileno. Por otra parte, en la muestra de Xochimilco se obtuvo galaxolida (0.22-0.66 $\mu\text{g/g}$) y se detectaron 2-EHMC y octocrileno. En la aplicación de esta metodología se utilizaron muestras dopadas provenientes de un ensayo de exposición con tilapias juveniles. En este, se observó que los compuestos más absorbidos por la tilapia fueron galaxolida y tonalida (almizcles) en concentraciones de 0.22-1.88 $\mu\text{g/g}$ y 0.69-3.29 $\mu\text{g/g}$ (base seca), respectivamente. Por otra parte, oxibenzona, 2-EHMC y octocrileno (filtros UV) fueron cuantificados en 2.23-6.54, 0.22-0.55 y 0.46-2.71 $\mu\text{g/g}$, respectivamente. Padimato-O y 4-MBC no fueron detectados. En el análisis de la muestra de Walmart, se identificaron los almizcles, los cuales se detectaron previamente en un blanco de reactivos debido a su ubicuidad, más no así para los filtros UV.

JUSTIFICACIÓN

Actividades de higiene personal y de recreación requieren del uso de ciertos productos cuyos ingredientes activos, al desecharse no son completamente eliminados en las plantas de tratamiento de agua por lo que, pueden afectar a los organismos acuáticos. Estos posibles efectos, eventualmente podrían alcanzar recursos agropecuarios consumidos por humanos, afectando posiblemente su salud. Muchos de estos compuestos, conocidos como contaminantes emergentes, se han detectado en el ambiente a nivel de trazas. Debido a esto, es necesario el desarrollo y la implementación de metodologías analíticas sensibles, reproducibles y sencillas para el monitoreo ambiental y así obtener datos para establecer futuras regulaciones de este tipo de contaminantes.

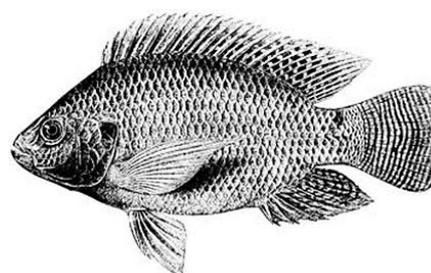
OBJETIVOS

Objetivo general

- * Desarrollar y validar una metodología para la determinación de filtros UV (oxibenzona, padimato – O, 3-(4-metilbenciliden) alcanfor, 2 – etilhexil 4 – metoxicinamato, octocrileno), y almizcles (galaxolida, tonalida) en tilapia mojarra (*Oreochromis urolepis hornorum*) utilizando dispersión de matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés) seguida de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés).

Objetivos particulares

- * Desarrollar y optimizar la metodología para el análisis de almizcles aromáticos policíclicos y filtros UV en tilapia mojarra (*Oreochromis urolepis hornorum*)
- * Validar la metodología para el análisis de los compuestos de interés a nivel de trazas [$\mu\text{g/g}$]
- * Aplicar la metodología propuesta para el análisis de muestras dopadas y muestras de tilapia mojarra provenientes del Estado de Morelos, la alcaldía de Xochimilco (Ciudad de México), la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, y una muestra comercial del supermercado Walmart.



a. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de técnicas analíticas de mayor sensibilidad ha permitido la detección e identificación de nuevos contaminantes en distintos tipos de muestras. Debido a que la mayoría de estos contaminantes se han encontrado en aguas superficiales y subterráneas, es de especial interés conocer su concentración en el medio acuático, ya que se asocian con efectos nocivos a largo plazo en el ambiente, perjudicando a la flora y fauna del lugar con un gran potencial de bioacumulación y biomagnificación.

Se conoce poco sobre la contaminación emergente puesto que su toxicidad y su concentración en el ambiente han sido poco estudiadas. No obstante, la introducción de estos contaminantes al entorno natural no es reciente a diferencia de su detección. Hay bastantes compuestos catalogados como contaminantes emergentes, sin embargo, los más identificados en estudios a nivel mundial son los fármacos y los productos de cuidado personal (PCPs).

Los PCPs comprenden a los ingredientes de cosméticos de uso diario, como jabones, perfumes, cremas, desodorantes, etc. Particularmente, dentro de este grupo están los filtros UV, los cuales son adicionados a los cosméticos para la protección de la piel. Los filtros UV más comunes a nivel industrial son los del tipo orgánico. Estos absorben la radiación ultravioleta gracias a su estructura que contiene grupos aromáticos, metoxilo y carbonilo, por lo que se utilizan en cosméticos y bloqueadores solares.

También en este grupo encontramos a los almizcles, cuyas propiedades aromáticas y su capacidad para reducir la volatilidad de otros compuestos, potencian el aroma por lo que son empleados en cosméticos. Anteriormente, los

nitroalmizcles solían utilizarse a nivel industrial, pero debido a su elevada toxicidad (efectos neurotóxicos, fototóxicos, cancerígenos y estrogénicos) fueron reemplazados por los almizcles aromáticos policíclicos (AAP).

Debido a la aplicación externa de estos productos, estos no son degradados por ningún proceso metabólico por lo cual terminan intactos en las aguas residuales. Aunado a esto, las plantas de tratamiento de agua solo los degradan parcialmente lo que facilita su depósito en los recursos hídricos que son empleados en el sector agrícola.

A pesar de la poca información que se tiene sobre estos contaminantes, se les asocia con afectaciones fisiológicas en organismos acuáticos. Por ejemplo, en peces, los almizcles interfieren en el transporte membranal de metabolitos y xenobióticos, mientras que los filtros UV provocan alteraciones en sus ciclos reproductivos. Por esta razón, instituciones como la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés), recomiendan especies sensibles a la contaminación para el monitoreo ambiental.

No obstante, se estima que los efectos de los contaminantes no regulados pueden extenderse a otros organismos mediante la ingesta de productos afectados, ya sea por suelo o agua contaminados. Así, los contaminantes emergentes pueden dañar la integridad de los alimentos representando así un potencial daño a la salud humana. Debido a esto, se necesita de metodologías analíticas sensibles, reproducibles, sencillas y rápidas que permitan el monitoreo ambiental y proporcionen datos para la futura regulación de dichos contaminantes para garantizar la integridad de los recursos acuáticos.

El análisis de alimentos implica lo que se conoce como matrices complejas pues, al ser matrices biológicas, tienen cientos de componentes que pueden interferir en la determinación del analito. Esto hace necesario un pre – tratamiento como lo puede ser un lavado con disolventes, alguna filtración, entre otras. Las tendencias de preparación de muestra en química analítica apuntan a la reducción de muestra utilizada por análisis, así como de los disolventes empleados. Además, busca mejorar la selectividad en las extracciones aunado a la posibilidad de automatizar dichos procedimientos. Por lo anterior, en este trabajo se seleccionó una técnica de preparación de muestra que facilite el análisis de muestras sólidas y de matrices complejas como la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés). Se trata de una técnica ampliamente utilizada en el análisis ambiental y de alimentos pues permite analizar muestras biológicas, que pueden ser líquidos muy viscosos, sólidos o semisólidos.

Esta preparación de muestra es compatible con cromatografía, la cual es la técnica instrumental más utilizada ya que proporciona diversas ventajas como análisis rápidos, eficiencia, alta precisión, cantidad mínima de muestra y resultados cuantitativos óptimos. Aunado a esto, el acoplamiento con Espectrometría de Masas ofrece gran sensibilidad pues hace posible la identificación inequívoca de compuestos con solo nanogramos de analito.

b. ANTECEDENTES

b.1. Contaminación emergente

El desarrollo antrópico en diversos ámbitos ha mermado la integridad de los recursos naturales pues se sabe que en la actualidad solo el 10% de las muestras de río analizadas se pueden clasificar como limpias en términos de contaminación química.¹ Por lo cual, se han desarrollado procedimientos para minimizar el impacto negativo en el ambiente. Un ejemplo de esto es todo el conocimiento de los contaminantes que hoy en día denominamos *prioritarios*, entre los que destacan los metales pesados. De ellos se conoce sus efectos en la salud, su concentración en el ambiente y de donde provienen, lo cual permite que sean monitoreados rutinariamente en el medio ambiente.

Los contaminantes emergentes pueden definirse como *cualquier químico sintético o natural o microorganismo que no es normalmente monitoreado en el ambiente pero que tiene el potencial de introducirse y causar efectos adversos conocidos o sospechados al bienestar humano y ecológico.*² Estos compuestos son liberados al ambiente desde diversas fuentes. En muchos casos, la liberación de estos contaminantes ha ocurrido desde hace mucho tiempo, sin embargo, no habían sido detectados hasta el desarrollo de técnicas instrumentales más sensibles. En otros casos, la síntesis y aplicación de nuevos compuestos, así como el cambio en el uso de los ya existentes suponen nuevas fuentes de introducción al ambiente.

Algunos de estos contaminantes emergentes se han detectado en los efluentes de plantas de tratamiento de agua residual (PTAR) y en instalaciones ganaderas y agrícolas, lo que lo hace una de las fuentes más importantes de

introducción de compuestos químicos al medio acuático.¹ (Figura no. 1) No obstante, estos compuestos no llegan al ambiente debido a un uso indebido o exagerado, sino al uso cotidiano pues, su variedad de aplicaciones, la inadecuada eliminación de estos y su pobre degradación en las plantas de tratamiento de agua, contribuyen a la contaminación de aguas superficiales y subterráneas.³ Lo anterior hace que este tipo de contaminación sea característica pues, no necesita ser persistente en el ambiente para afectarlo, ya que su tasa de transformación o remoción se compensa por un flujo de entrada constante.⁴

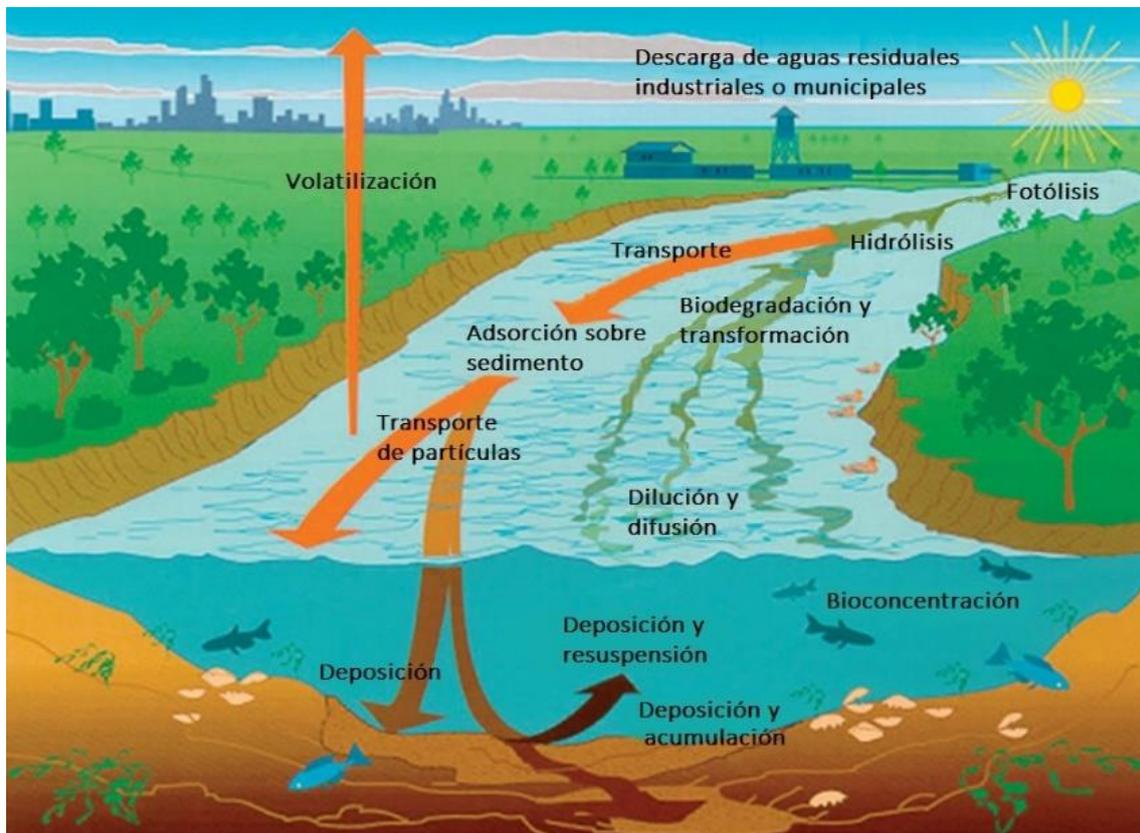


Figura no. 1. Contaminantes en el medio acuático (Adaptado de referencia 1)

Aunado a esto, dado que el procesamiento avanzado y exhaustivo de los efluentes de las plantas de tratamiento de agua aún no está disponible ni es económicamente sostenible a nivel mundial, estos químicos, sus metabolitos y

sus productos de transformación no son eliminados en estas plantas y pueden entrar en el ambiente acuático para eventualmente alcanzar el agua potable.¹

Se sabe que algunos de estos compuestos pueden fungir como disruptores endócrinos, estos interfirieren en el transporte membranar de agentes xenobióticosⁱ; además de afectar los ciclos reproductivos de organismos acuáticos con un potencial efecto a largo plazo en la salud humana pues los contaminantes emergentes, al existir en una mezcla compleja de componentes, posibilita un incremento en la toxicidad de los mismos por un efecto sinérgico o un fenómeno antagonista.³

Hasta ahora se han identificado diversos compuestos ya catalogados como contaminantes emergentes. Sin embargo, estas sustancias provienen de diferentes usos, en lo cual se fundamenta su clasificación como productos de cuidado personal, fármacos, esteroides y hormonas, nanopartículas, retardantes de llama, detergentes, así como aditivos industriales y de gasolina, entre otros. No obstante, en estudios a nivel mundial, los compuestos con mayor incidencia en agua superficial y subterránea fueron productos de cuidado personal y fármacos.⁵

b.2.Productos de cuidado personal

El cuidado personal es un tópico que varía en las diferentes culturas alrededor del mundo. Sin embargo, aunque no lo parezca, este aspecto al igual que el industrial, asocia un potencial daño al ambiente. Los productos de cuidado personal son compuestos orgánicos ingredientes de diversos productos ampliamente utilizados en la vida cotidiana, cosméticos de uso diario como los

ⁱ Compuestos químicos que no pertenecen a la composición natural de los organismos vivientes.

desodorantes, maquillajes, pastas de dientes, cremas corporales y faciales, entre otros. De los cuales, es conocido que algunos productos como champús y lociones de lavado pueden contener hasta 20 ingredientes.¹

Estos productos suelen aplicarse de manera externa sobre la piel por lo que después de su uso, pueden ser absorbidos por el cuerpo, excretados por la orina o lavados después de su aplicación. Sin embargo, si son enjuagados del cuerpo estos no son degradados pues no se involucran en ningún proceso metabólico. De esto que, la probabilidad de su depósito en aguas superficiales sea mayor pues llegan a las PTAR donde son parcialmente eliminados del influente durante el tratamiento, por lo que muchos de estos compuestos permanecen en los lodos de alcantarillado o en los efluentes. Debido a que los efluentes son descargados en depósitos de agua superficial, los PCPs llegan al ambiente.⁶ En estudios previos a nivel mundial, se han analizado aguas superficiales en busca de PCPs y se han cuantificado en concentraciones a niveles de ng/L - µg/L.⁶

Se trata de un grupo especialmente preocupante debido a sus efectos tóxicos en organismos acuáticos, pues en varios estudios se demostró que muchos de estos contaminantes son persistentes, bioactivos, con gran potencial de bioacumulación en organismos acuáticos. Además de la capacidad de actuar como disruptores endócrinos.⁵

Así mismo, el destino de estos activos en el ambiente depende de sus propiedades fisicoquímicas puesto que condicionan su biodisponibilidad; parámetros como la solubilidad en agua, el comportamiento de adsorción, la volatilidad y la degradabilidad; la cual es llevada a cabo por microorganismos (degradación biótica) presente en las PTAR, superficies, suelos y aguas. Estos

compuestos pueden clasificarse según estas mismas propiedades fisicoquímicas; sin embargo, se emplea una clasificación de acuerdo a su función en: desinfectantes, filtros UV, conservadores, fragancias y repelentes de insectos.⁵

b.2.1. Almizcles

El almizcle se dio a conocer como una secreción del ciervo almizclero macho y se empleó industrialmente durante mucho tiempo. Hoy en día, los *almizcles* abarcan una gran variedad de compuestos cuya propiedad común es poseer un olor peculiar. Debido a esta propiedad, se le ha empleado en la industria cosmética como aditivo para la potenciación y fijación de los aromas debido a su semivolatilidad. Por lo que también suelen usarse en aromatizantes de ambientes, agentes limpiadores, detergentes, jabón e incluso en alimentos y cigarros.

Dada la baja disponibilidad y los altos costos de extracción del almizcle del ciervo almizclero, se optó por compuestos sintetizados en laboratorio que fuesen una alternativa viable. Actualmente, se conocen tres tipos de almizcles clasificados según su estructura química como *nitroalmizcles*, *almizcles aromáticos policíclicos* y *almizcles macrocíclicos* (Figura no. 2).

Los nitroalmizcles son compuestos derivados del benceno sustituidos con grupos nitro, alquilo, metoxilo o carbonilos. Estos compuestos fueron las primeras fragancias en la industria, su uso se extendió debido a sus bajos costos de producción, sin embargo, se les asocia diversos efectos negativos en la salud. Uno de los más relevantes es su asociación al cáncer; además, estudios previos sugieren que niveles altos de este tipo de compuestos están vinculados con

problemas de fertilidad en mujeres. Incluso producen sensibilización e irritación de la piel. Aunado a esto, en diversos estudios se han detectado estos compuestos en sangre, así como en leche materna²; por lo cual se reemplazaron por los almizcles aromáticos policíclicos. Dichos compuestos son derivados de tetralina o indano poli- sustituidos, principalmente por grupos alquilo. Este grupo

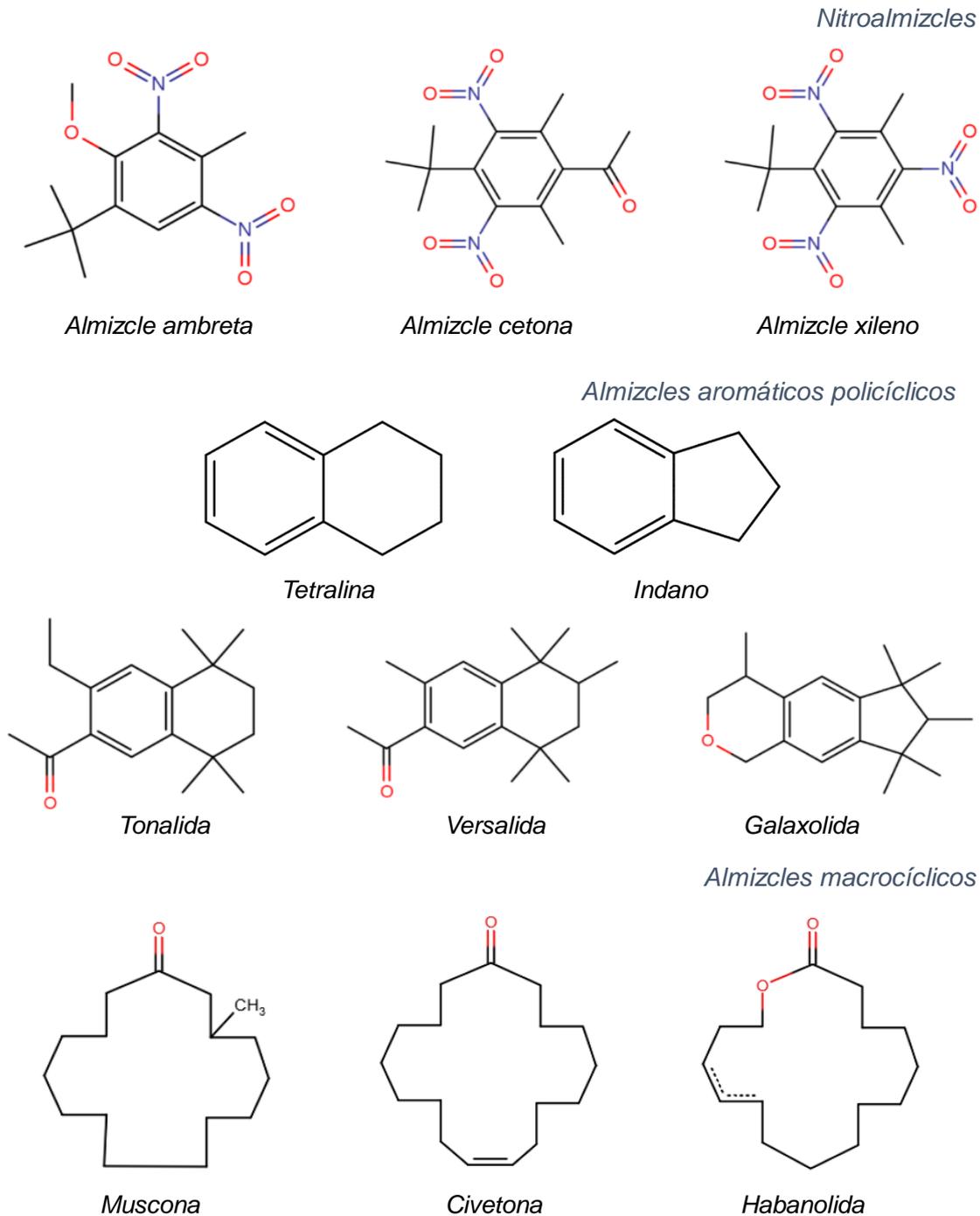


Figura no. 2. Almizcles representativos por categoría

sustituyó a los nitroalmizcles por ser más económicos, en este grupo destacan Galaxolida (HHCB) y tonalida (AHTN), los cuales son los compuestos más importantes de esta categoría pues abarcan el 95% de la industria cosmética.¹⁰ Sin embargo, estos últimos suelen emplearse en mayores cantidades que sus predecesores por lo que son objeto de diversos estudios. Incluso, se les ha encontrado en lagos de Estados Unidos y Europa,² por esto HHCB y AHTN están entre los compuestos más investigados en peces y mejillones a nivel mundial pues se determinan en el orden de ng/g.⁶

Los nitroalmizcles y los almizcles policíclicos son solubles en agua, pero sus coeficientes de reparto octanol – agua ($\log K_{ow}$ = 3.8 y 5.4-5.9, respectivamente) les asocia un carácter lipofílico, lo que evidencia su potencial de bioconcentración.⁶ En adición, ambos tipos de almizcles pueden alterar los ciclos hormonales de organismos acuáticos como los peces. Se ha comprobado que estos almizcles actúan como inhibidores de la resistencia multixenobiótica celular, mediada por proteínas de transporte específicas en moluscos acuáticos.²

Por otra parte, los almizcles macrocíclicos son anillos alifáticos de 15 a 17 átomos de carbono. El olor del compuesto se relaciona directamente con el tamaño del anillo pues los que poseen 14 átomos de carbono son las esencias más ligeras. En un principio eran extraídos de animales y plantas, de aquí que, al ser caracterizados, se descubriera que los almizcles de origen animal eran cetonas, mientras que los de origen vegetal eran lactonas.¹³ Después de su elucidación estructural, se propusieron métodos de síntesis para su producción.

Debido a su alta estabilidad en la luz y condiciones alcalinas, fijación y aroma de alta calidad, son altamente valorados en la industria cosmética. Actualmente, se busca que su producción sea más económica, eficiente y ecológica.

b.2.2. Filtros UV

Estos compuestos son empleados como protectores solares debido a sus propiedades pues se trata de compuestos con absorciones nulas en la región del espectro visible, pero con grandes absorciones en el intervalo UVA (320 – 400nm) y UVB (280 – 320 nm). Los filtros UV se catalogan en orgánicos e inorgánicos, con base en el mecanismo de acción que presentan.

Los filtros UV inorgánicos, anteriormente denominados como bloqueadores físicos, dispersan y reflejan la radiación UV, pues sirven como una barrera física. Entre los más utilizados se encuentran los óxidos metálicos como el óxido de zinc y el óxido de titanio pues son fotoestables y requieren de la aplicación de una capa delgada para lograr una adecuada reflexión. El óxido de zinc ofrece una protección de amplio espectro mientras que el óxido de titanio es mejor en el intervalo UVB (320 – 290 nm).

Por otra parte, los filtros UV orgánicos, conocidos como absorbentes químicos, pueden absorber la radiación UV que les provee la energía necesaria para tautomerizaciones o isomerizaciones foto-inducidas. Después, el compuesto regresa a su estado inicial liberando la energía en forma de calor o en una longitud de onda más larga, de baja energía en el espectro visible.¹⁴ Generalmente son compuestos aromáticos sustituidos con grupos carbonilo y con cadenas laterales con diferentes grados de insaturación. Existen tres tipos de filtros UV, según el intervalo de protección: UVA (400-320 nm), UVB (320-290

nm) y los de amplio espectro (400-290 nm). Estos compuestos no provienen de una misma familia, los filtros UV orgánicos se clasifican de acuerdo con su estructura como derivados de los siguientes compuestos, (Figura no. 3).

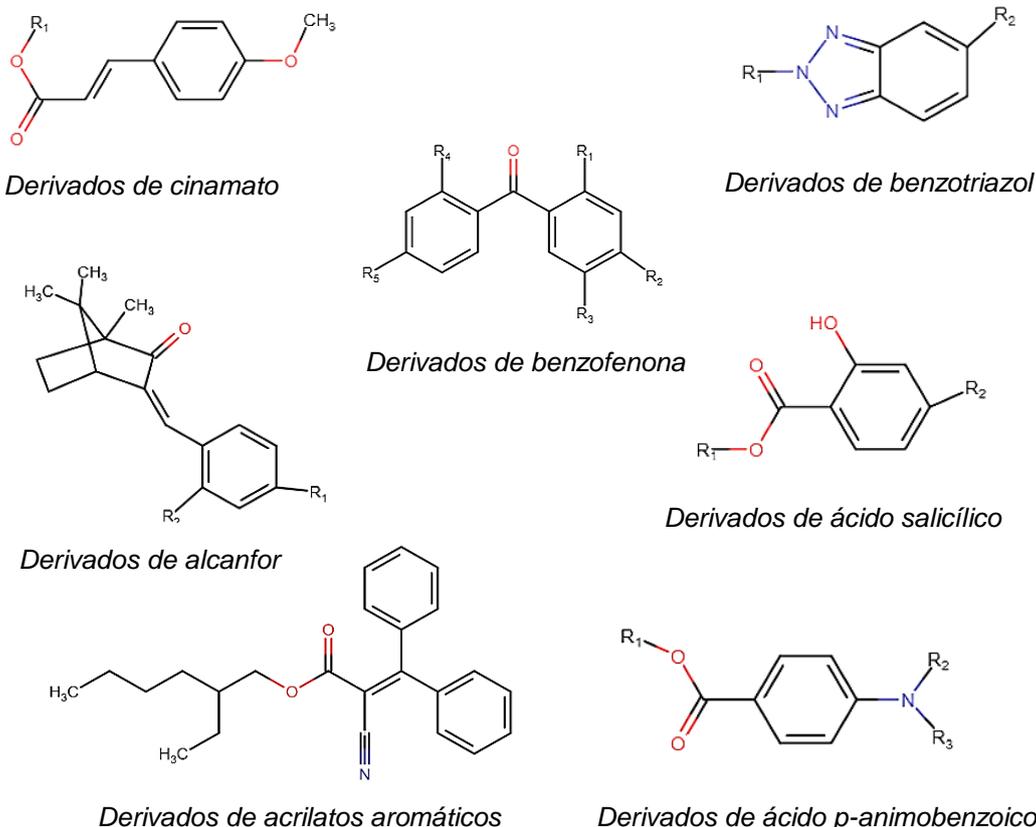


Figura no. 3. Ejemplos de filtros UV clasificados de acuerdo con su estructura

a. Cinamatos

Este tipo de compuestos poseen un alto grado de insaturación que facilita la deslocalización electrónica, pues posee un ácido carboxílico, una cadena con diferentes grados de insaturación y un éster aromático. La longitud de onda de la energía radiante que permite la transición electrónica corresponde a 305 nm y tiene además un alto coeficiente de extinción molar (>23,000). Estos son los agentes protectores más empleados en la industria junto con los salicilatos y se reportan como fotoestables puesto que solo el 4.5% tuvo una transformación

irreversible. Además, su baja solubilidad en agua los hace ideales para formulaciones en base acuosa. Actualmente, el 2-etilhexil p-metoxicinamato es de los más usados para la protección en el intervalo UVB.

b. Ácido p - amino benzoico

Se compone de un anillo de benceno sustituido con un grupo amino (donador de electrones) y un grupo carboxilo (aceptor de electrones) en posición para. Dicha disposición estructural permite la deslocalización electrónica cuyas transiciones ocurren en la región UVB. Eran ampliamente utilizados en los protectores solares, sin embargo, provocan algunas reacciones adversas como la fotoalergia, por lo que su uso actual es ocasional.¹⁴

c. Salicilatos

Son compuestos aromáticos di-sustituidos en posición orto, lo que permite la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares, permitiéndole absorber radiación entre 270 y 300 nm. Fueron los primeros filtros UV en ser empleados en protectores solares, sin embargo, son los agentes UVB orgánicos más débiles en cuanto a protección solar. Estos compuestos tienen un perfil de seguridad, por lo que se adicionan a los protectores solares en altas concentraciones para potenciar la protección.

d. Alcanfor

Son compuestos, en su mayoría sólidos, con bicíclicos que absorben en el intervalo UVB de 290 – 300 nm. Estos compuestos presentan fotoabsorción debido a su resonancia. Se ha reportado que gracias a la fotoestabilidad, los derivados del alcanfor son sumamente estables a la fotodegradación con

pérdidas alrededor de 2.5; además, de no tener ninguna reacción de irritabilidad cutánea asociada.

e. Benzofenonas

Son la única clase de filtros UV que contiene una cetona aromática lo cual les confiere una gran deslocalización electrónica. Usualmente, se usan como absorbentes en la región UVB. Se ha reportado que tienen efectos de disrupción endócrina en estudios *in vitro* y en animales; sin embargo, se emplean dado que estudios clínicos no han demostrado alteraciones hormonales por aplicación tópica. En particular, la oxibenzona ha reportado alta incidencia fotoalérgica.¹⁴

f. Misceláneos

Entre estos encontramos compuestos diversos como el octocrileno, el cual es un acrilato aromático que es fotoestable, absorbente de amplio espectro y empleado para estabilizar la avobenzona en formulaciones; además de los derivados de triazina, benzimidazol, benzotriazol, entre otros.¹⁷

Estos compuestos se adicionan a plásticos, textiles, embalaje de alimentos y productos del cuidado personal como protección solar. Sin embargo, el estudio de estos contaminantes concierne al depósito en agua originado por actividades antrópicas como el cuidado personal o la recreación, pues es importante mencionar, que la concientización acerca de los efectos de la radiación UV en la piel ha provocado un incremento en el consumo de protectores solares. Se sabe que estos compuestos constituyen al menos un 10% de la masa de productos del cuidado de la piel.¹⁸ Aunado a esto, se ha observado una alta variabilidad espacial y estacional en organismos marinos como consecuencia del impacto de

la actividad turística y de las actividades acuáticas recreativas. Por esto, los valores más altos de concentración fueron obtenidos en la temporada turística.⁶

El destino de estos compuestos puede predecirse con base en sus propiedades fisicoquímicas, tales como $\log K_{ow}$ entre 4 y 8 que demuestra su lipofilicidad. Así como su estabilidad frente a la degradación biótica pues manifiesta su potencial de bioacumulación en organismos acuáticos. En estudios previos se ha encontrado que los filtros UV pueden afectar funciones endócrinas y reproductivas en varias especies como ratas, ranas y peces, aunque en concentraciones mayores a las presentes actualmente.⁶ Además, se ha reportado que dichas alteraciones son comparables a las provocadas por estrogénicos como el estradiol.²⁰

b.3. Bioacumulación

Comprende procesos como la bioconcentración, definida como *la acumulación de contaminantes, presentes en el agua, por una ruta no necesariamente alimentaria*;²¹ y la biomagnificación cuya definición es *la acumulación de ciertos compuestos debido a la ingesta de alimentos contaminados*.²¹

La concentración de estos compuestos en los tejidos del organismo expuesto depende del consumo, almacenamiento y excreción de estos. En peces, la entrada de los contaminantes ocurre directamente del agua o a través de alimento contaminado; dependiendo también de la dieta, tamaño y composición del organismo en cuestión. Los compuestos lipofílicos, son almacenados en la grasa incluyendo membranas biológicas y tejido muscular, de aquí el riesgo toxicológico por la ingesta de estos recursos a la salud humana.²¹

b.3.1. Monitoreo ambiental

Uno de los ecosistemas más afectados por la contaminación es el acuático, pues la actividad humana ha alterado procesos físicos, químicos y biológicos de los cuerpos de agua, influyendo así en la fauna residente del lugar. Debido a esta problemática, se tiene la necesidad de monitorear diversos organismos con el fin de estimar las repercusiones de la presencia de los contaminantes en el bienestar del ecosistema.

Para esto se requiere de parámetros susceptibles de medición que ayuden a describir el ambiente natural para estimar el impacto antrópico y evaluar medidas de remediación. Por lo cual es importante definir un bioindicador; se trata de *un organismo (o parte de un organismo o de una comunidad de organismos) que contiene información de la calidad del ambiente en el que se desarrolla.*²¹

Los bioindicadores son requeridos en tres situaciones:

- i. el factor ambiental no puede ser medido;
- ii. el factor ambiental es difícil de medir;
- iii. el factor ambiental es fácil de medir, pero complejo de interpretar.

En el caso de los ecosistemas acuáticos, los peces han sido los indicadores más aptos debido a todo el conocimiento que se tiene acerca de las necesidades ecológicas de diversas especies, ya sea del hábitat o alimentaria, del tamaño y etapa de crecimiento del espécimen. Estos organismos al tener cierta longevidad son sensibles al impacto de mezclas complejas de químicos en un ecosistema acuático específico. Los contaminantes causan una variedad de efectos en los

organismos desde el nivel celular hasta el bioquímico afectando su comportamiento, crecimiento y reproducción.²¹ Debido a esto, es importante conocer más acerca de la biodisponibilidad de los contaminantes y por ello, es necesario estudiar la acumulación y su influencia en el ecosistema, pues esto facilita la regulación de contaminantes emergentes.

Los estudios realizados a los organismos bioindicadores tienen objetivos como:

- la investigación de la contaminación de los ríos;
- la determinación (en el laboratorio) de los efectos tóxicos de sistemas contaminados;
- la proyección de diversos compuestos para desempeñar alguna función en la agricultura, industrial o doméstico.

Los peces son muy importantes en el monitoreo ambiental ya que, en la etapa adulta se desarrollan prácticamente en el mismo ecosistema en el que crecieron, pues muchas especies son *no migratorias*, lo cual permite la descripción del ambiente en el que se desarrollan de manera confiable, haciéndolos sensibles a cambios en la composición de su ambiente. Además, su dieta abarca una gran variedad de seres vivos, desde algas, microcrustáceos, macroinvertebrados, plantas e incluso otros peces. Debido a esto, pueden alimentarse en la superficie, a la mitad o en el fondo del río o lago, lo cual los hace organismos útiles para el monitoreo pues permiten evaluar el estado y la calidad de los recursos de su hábitat.

Sin embargo, en el desarrollo de metodologías con aplicación en el monitoreo ambiental, se requiere que el organismo este bajo condiciones controladas en las cuales pueda estudiarse. Incluso, al existir variabilidad entre

organismos de la misma especie, se requiere del estudio de un gran número de individuos para reducir la dispersión entre muestras. Para dicho propósito se debe considerar que una población de organismos no se puede expresar completamente bien a menos de que se encuentre en su ambiente natural. Por esto, los ensayos de exposición realizados en laboratorio requieren de un tiempo previo al estudio para que los organismos se aclimaten en el nuevo ambiente, el cual debe asemejarse en condiciones al ambiente natural, por ejemplo, pH, oxígeno disuelto, temperatura e hidrodinámica. Además, los organismos empleados en el estudio deben obtenerse de fuentes no contaminadas y en condiciones que provoquen el mínimo nivel de estrés en los organismos estudiados.²²

b.3.1.1. Tilapia mojarra (*Oreochromis urolepis hornorum*)

Dada su alta resistencia y adaptabilidad se le ha logrado reproducir a nivel mundial, de aquí que su introducción a este continente fuese en 1964. Esta familia de organismos habita en aguas con poco movimiento, suelen buscar lugares con poca iluminación entre las piedras o plantas acuáticas y suelen ser territoriales.



Figura no. 4. Fotografía de *Oreochromis urolepis hornorum*

Se trata de una de las especies con mayor valor económico debido a su adaptabilidad a diferentes sistemas de cultivo como agua dulce y del océano. Presenta crecimiento rápido, resistencia a las enfermedades, consumo de un amplio espectro de comida natural y artificial, tiene la habilidad de sobrevivir con bajas concentraciones de oxígeno en su medio y en diferentes ambientes de salinidad. Debido al aprovechamiento de esta especie, la producción de la misma constituye un 91% de la producción pesquera en México, incluso se cultiva en 31 estados de la República Mexicana, siendo los mayores productores: Chiapas, Tabasco, Guerrero, Estado de México y Veracruz.²³

El consumo de tilapia ha ido en aumento pues se trata de un alimento de gran valor nutrimental (Tabla no. 1). Su contenido de grasa es bajo en comparación con otras especies como salmón pues oscila entre 0.7 a 8.7%.²³

Tabla no. 1. Composición de los filetes de tilapia.²⁴

Componente	% en base húmeda
Humedad	72 – 80
Proteína	13 – 25
Lípidos totales	0.79 – 8.5
Carbohidratos	< 1

Algunas generalidades del espécimen estudiado²³ se muestran en la Tabla siguiente.

Tabla no. 2. Información biológica de la especie Tilapia

Aspecto	Descripción
Distribución geográfica	Se encuentra en América central, sur del Caribe, sur de Norteamérica, sureste asiático, Medio Oriente y África.
Morfología	Cuerpo robusto comprimido y discoidal, raramente alargado. Boca protráctil con labios gruesos; mandíbulas anchas con dientes cónicos y en ocasiones incisivos. Aleta dorsal en forma de cresta con espinas y radios en su parte terminal. Aleta caudal redonda y trunca. El macho tiene dos orificios en la papila genital: ano y orificio urogenital, mientras que la hembra posee tres: ano, poro genital y orificio urinario.
Ciclo de vida	La incubación es bucal y dura de 3 a 6 meses. Los machos maduran de los 4-6 meses; y las hembras de los 3-5 meses.
Hábitat	Ambientes acuáticos dulceacuícolas (ríos, embalses, arroyos y lagos) y salobres (lagunas costeras y estuarios).
Alimentación en medio natural	Omnívoras (fitoplancton, plantas acuáticas, algas, zooplancton, invertebrados, pequeños insectos y organismos bentónicos ⁱⁱ).
Propiedades fisicoquímicas	Temperatura entre 22 y 32 [°C], oxígeno disuelto > 3 mg/L, pH entre 6.5 y 8.5, CO ₂ < 50, amonio < 0.1 mg/L, nitritos < 5 mg/L, salinidad < 20, turbidez < 30.

ⁱⁱ Comunidad de organismos que viven en el fondo de los sistemas acuáticos

b.4. Preparación de muestra

Es incorrecto asumir que de todas las etapas que constituyen un análisis químico (muestreo, preparación de muestra, análisis, obtención y discusión de resultados y conclusiones), la que asocia mayor error al mismo es el análisis químico; pues se ha demostrado que una proporción importante del error en el análisis es atribuible tanto al muestreo como la preparación de muestra. Además, con el desarrollo de técnicas analíticas más sensibles, se ha mostrado que realmente la preparación de muestra constituye alrededor del 60% de todo el trabajo en un análisis.²⁶

Fundamentalmente, el objetivo de este paso es *convertir una matriz real en una matriz adecuada para el análisis, ya sea por separación o cualquier otra técnica analítica.*²⁶ La obtención de un extracto limpio generalmente consiste en la remoción de interferentes de la matriz para incrementar la selectividad, concentrar el analito para mejorar la sensibilidad, además de dar robustez y reproducibilidad al método de análisis, sin importar las variaciones en la matriz de la muestra.

Para esto, durante mucho tiempo se han empleado extracciones exhaustivas que requieren de cantidades grandes de disolventes orgánicos. De esto resultan algunas de las tendencias en la forma actual de hacer química, que buscan reducir el impacto al ambiente como, la reducción del tamaño de muestra y del volumen de disolventes empleado, mayor selectividad y especificidad de la extracción y, de ser posible, la automatización del proceso.²⁶

Así mismo, es importante seleccionar de forma apropiada la preparación de muestra acorde al tipo de matriz que tenemos. Afortunadamente, existe una

amplia variedad de procedimientos, lo que permite elegir la preparación adecuada según las propiedades de la muestra como el estado de agregación, matriz biológica (tejido o fluido), así como la cantidad disponible de la misma.²⁶

b.4.1. Dispersión de matriz en fase sólida

Esta preparación de muestra ha tenido múltiples aplicaciones con una variedad de disolventes y adsorbentes muy amplia. Se ha empleado exitosamente en la extracción de drogas, plaguicidas y productos naturales de matrices biológicas. La dispersión de matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés) se recomienda para procedimientos de preparación, extracción y fraccionamiento de muestras sólidas, semi - sólidas o muy viscosas, pues conjunta principios físicos y químicos que la hacen una técnica muy eficiente para la extracción y limpieza de la muestra.

Básicamente, consiste en la mezcla de la muestra con una fase dispersante, la cual suele ser un material adsorbente. Originalmente, la MSPD se refería al procedimiento cuyo adsorbente era la sílice funcionalizada con C_{18} ²⁷, aunque esto ha cambiado pues ha sido aplicada con otras fases. La dispersión de una muestra con una fase adsorbente implica la aplicación de fuerza mecánica, pues en el procedimiento se mezclan los componentes en un mortero de ágata con pistilo (Figura no. 5) La fase tiene 2 funciones principalmente; en primer lugar, este funge como un abrasivo pues al mezclar los componentes se realiza la disrupción de estructura de la muestra, disgregándola. También actúa como un disolvente, ya que suspende a la muestra, dando lugar a fuerzas intermoleculares hidrofílicas e hidrofóbicas entre los componentes que permiten la adsorción de los compuestos. Una vez que se realizó la dispersión, el

macerado se transfiere al cartucho con un filtro previamente colocado en el fondo, que impide la pérdida de la mezcla. Después de colocar el macerado, se comprime con otro filtro. Posteriormente se eluye con una secuencia de disolventes adecuada para el aislamiento de los analitos.

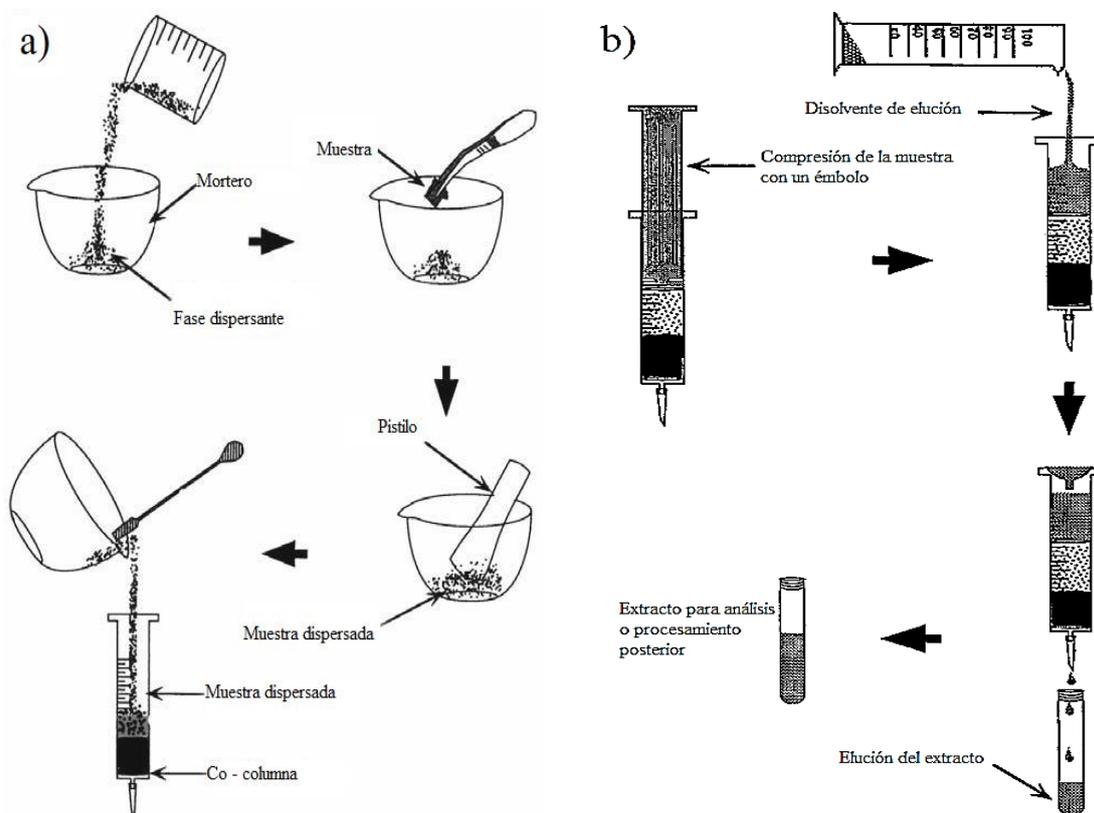


Figura no. 5. Procedimiento típico de una MSPD (Adaptado de referencia 29).
 (a) Maceración de la muestra con el adsorbente y preparación del cartucho.
 (b) Elución del cartucho con disolvente.

La MSPD es una técnica versátil ya que puede emplearse en una variedad de matrices muy amplia. Además, posee parámetros que pueden ajustarse para obtener extracciones más específicas de los compuestos de interés como los que se describen a continuación.

i. Tamaño de partícula

Partículas muy pequeñas pueden aumentar el tiempo de elución y hacer necesaria la presurización para obtener un flujo adecuado.

ii. Características de la fase dispersante

Propiedades químicas como la polaridad, incluso si se trata de materiales funcionalizados, pueden influir en la extracción.

iii. Uso de materiales de base sílice u otros adsorbentes

Los adsorbentes más empleados son de base sílice funcionalizada como C₈ o C₁₈, así como desecantes como NaSO₄ anhidro o silica. También se han empleado materiales poliméricos o minerales como carbón activado.

iv. Proporción muestra:dispersante

La más empleada es 1:4 pero esta depende de la aplicación y debe ser evaluada para la misma.

v. Modificaciones químicas de la matriz

Suele añadirse agentes quelantes, ácidos o bases u otros compuestos que influyen en la distribución y la elución de los analitos.

vi. Selección de disolventes de elución

Depende del propósito deseado, puede usarse para extraer el analito o para realizar una limpieza antes de la elución de los compuestos de interés.

vii. Volumen de elución

Este parámetro también debe ser evaluado ya que varía según la aplicación.

Se ha observado que, para una adición de 8 mL de disolvente, la mayoría de los analitos se extraen en los primeros 4 mL.²⁸

viii. Efecto de la matriz de la muestra.

Al realizar la dispersión, todos los componentes de la muestra se encuentran suspendidos a través de la columna teniendo una nueva fase debido a la

interacción entre la muestra y el dispersante, lo cual influye en la extracción de los analitos.

La optimización de esta técnica permite una disminución del 95% en el uso de disolventes; además de una disminución del 90% en el tiempo de elaboración, en comparación con las preparaciones clásicas.²⁷ Aunado a su gran utilidad en el análisis de alimentos y muestras ambientales, así como su fácil implementación en el análisis cromatográfico.

b.4.2. Efecto matriz

Como se ha mencionado anteriormente, las muestras biológicas contienen un gran número de componentes, lo cual, asocia mayor complejidad en su análisis. En cierta parte, esta complejidad se debe a compuestos coextraídos con el analito que provocan un fenómeno llamado efecto matriz, el cual se define como *la alteración directa o indirecta de la respuesta analítica debido a la presencia de otros compuestos inherentes a la matriz de trabajo.*³¹

Dicha variación en la respuesta del analito dependerá de las características del mismo y de que interacciones tenga con la composición de la matriz estudiada. Entonces; un analito tiene efecto matriz positivo si hay un aumento en su señal analítica; mientras que, presenta un efecto matriz negativo si existe una atenuación en la misma.

Estudios previos han abordado los posibles mecanismos por lo cuales sucede el efecto matriz en análisis realizados por cromatografía de gases^{30, 31}. En estos se postula que hay participación de la matriz en la transferencia del puerto de inyección a altas temperaturas hacia la columna. La matriz incrementa

la transferencia de los analitos hacia la columna reduciendo el estrés térmicoⁱⁱⁱ experimentado por los compuestos termolábiles durante la vaporización y el enmascaramiento de sitios activos en el inyector, minimizando la adsorción y favoreciendo la lenta liberación de compuestos polares.³⁰ De aquí, se han identificado dos tipos de compuestos susceptibles de presentar efectos de la matriz:

- los compuestos termolábiles a las temperaturas de vaporización; y,
- los compuestos predispuestos a adsorberse en aquellas superficies donde la muestra tenga contacto en su trayecto hacia la columna incluyendo, posiblemente, la misma columna y el detector.

Dichos sitios activos se asocian con grupos silanol o iones metálicos en la superficie de vidrio en contacto con la muestra durante la inyección, separación y detección; o creados por la deposición de compuestos no volátiles y la posible modificación térmica de componentes de la matriz que contaminan el inyector y la columna de muestras anteriores.³⁰ Debido a esto, con el fin de minimizar las variaciones, es importante realizar una limpieza del instrumento a las condiciones normales de trabajo.

Por otra parte, se ha estudiado el efecto de la presencia de mas compuestos de interés en la señal de un analito en específico. Akutsu y colaboradores³¹ han demostrado dicho efecto en pesticidas, en el que la variación de la respuesta también aplica para el estándar interno y los analitos presentes. En el caso del acoplamiento GC-EM (por sus siglas en inglés), el cambio en la respuesta se

ⁱⁱⁱ Disminución de la estabilidad de un compuesto debido a altas temperaturas

debe a la variación en la ionización de la muestra. Sin embargo, el fenómeno de efecto matriz constituye un área de amplia investigación en el futuro.

b.5. Cromatografía

La Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, por sus siglas en inglés) define a la cromatografía como un *método físico de separación donde los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, de las cuales una está fija (fase estacionaria) mientras que la otra (fase móvil) se mueve en una dirección definida.*

La cromatografía tiene diversas vertientes de acuerdo con la naturaleza de las fases móviles y estacionarias que se emplean. Por esto, es una herramienta importante en química que permite la separación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, que de otra forma serían muy difíciles de resolver. En este proyecto se emplea la cromatografía de gases pues es una técnica que ofrece diversas ventajas como rapidez de análisis, alta eficiencia y alta sensibilidad, precisión, asequible y operación sencilla.

b.5.1. Cromatografía de gases

En este proceso se emplea una fase estacionaria líquida (de alta viscosidad) adherida en el interior de una columna, a través de la cual pasa la fase móvil la cual es un gas inerte. En la elución intervienen dos propiedades fisicoquímicas que son la presión de vapor relativa y la afinidad del compuesto por la fase estacionaria, con base en dichas propiedades sucederá la separación.

Un cromatógrafo de gases se compone por 6 partes principalmente: (1) fuente de fase móvil, (2) sistema neumático, (3) sistema de inyección, (4) sistema de separación, (5) sistema de detección y (6) sistema de registro. (Figura no. 6).

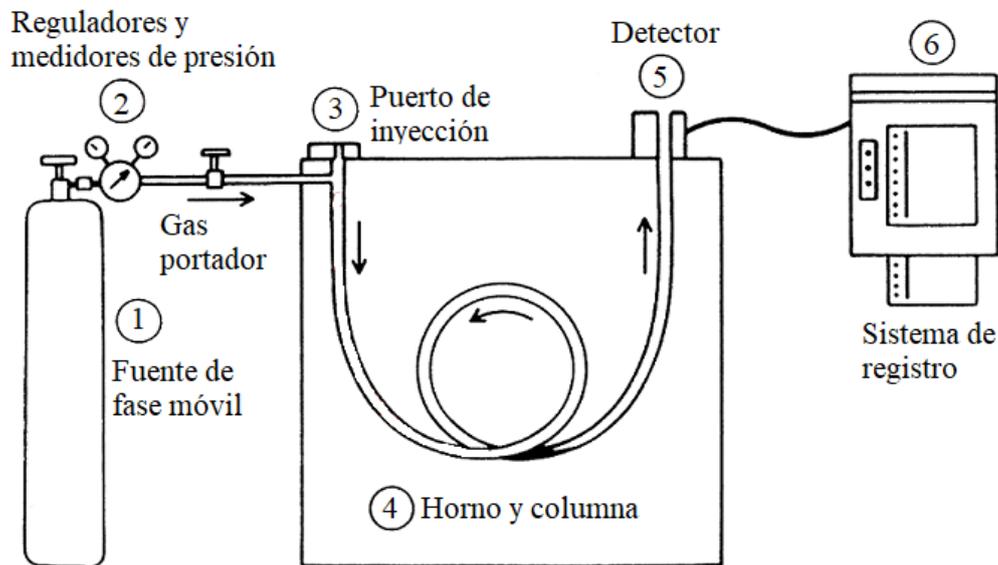


Figura no. 6. Esquema de un cromatógrafo de gases (Adaptado de referencia 34)

La fase móvil, también denominada gas portador o acarreador, debe tener pureza elevada (superior a 99.999%), ya que de tener agua u oxígeno podrían dañar la fase estacionaria. Además, considerando que su propósito principal es llevar la muestra a través de la columna, la fase móvil debe ser inerte y no debe interactuar químicamente con la muestra ni con la fase estacionaria. Algunos gases como H_2 , N_2 y He suelen emplearse como fases móviles, la elección dependerá del detector, la eficiencia y la rapidez del análisis.

El flujo de la fase móvil es esencial para la eficiencia de la columna y el análisis cuantitativo pues se requiere de un flujo constante y reproducible para asegurar que los tiempos de retención sean, a su vez, reproducibles. Generalmente, los sistemas neumáticos se componen por un regulador de dos etapas conectado a los tanques que contienen el gas portador, estos se

encargan de reducir el flujo de la fase móvil pues de 2500 psi llega a un intervalo apto de 20 a 60 psi.

Los volúmenes de inyección que suelen introducirse al sistema cromatográfico generalmente son del orden de microlitros por lo que se requiere del cumplimiento de los siguientes puntos³⁵:

- › la vaporización de la muestra debe ser lo mas rápida posible;
- › el volumen inyectado debe llegar a la cabeza de la columna en forma de una banda estrecha;
- › la vaporización no debe discriminar ningún componente;
- › no debe haber pérdida de muestra.

La introducción de la muestra se realiza en un tubo de vidrio llamado *inserto* o *liner*, que se encuentra en el centro del puerto de inyección. Este se calienta de manera que, al inyectar la muestra, esta se vaporice completamente de forma instantánea disminuyendo así la discriminación de los compuestos menos volátiles. Sin embargo, existen algunos inyectores que son adaptables a la necesidad de un análisis. Por ejemplo, en el inyector con/sin división de flujo, (Figura no. 7-a), también conocido como *split/splitless*; suele emplearse un mismo dispositivo. En ambos modos la muestra se vaporiza, se mezcla y se diluye con el gas portador, pero cuando hay división de flujo, solo una fracción de la muestra, (definida por la relación de división), pasa hacia la columna mientras que el resto se desecha a través de la línea de purga. En cambio, al usar el modo sin división casi toda la muestra entrará en la columna pues la válvula de *split* estará cerrada. Sin embargo, en este tipo de inyector existe la discriminación de compuestos por masa molecular pues los menos volátiles

tienden a quedarse en el inserto o a salir por la línea de purga al vaporizarse al final.

Usualmente, los inyectores con o sin división tienen los mismos componentes. Se ha desarrollado una variante del inyector PTV en la cual, además de emplearse únicamente el modo *split* o *splitless*, puede ser programado para alternar ambos tipos de inyección e incluso se permite la variación de temperatura en el mismo. Este tipo de inyector conocido como inyector programable *split/splitless* (PSSI, por sus siglas en inglés) permite la preconcentración de la muestra con volúmenes grandes de inyección pues remueve gran parte del disolvente, lo que permite obtener menores límites de detección. Además de disminuir la discriminación de compuestos con altos puntos de ebullición.

Por otra parte, hay otros inyectores que minimizan este problema como la inyección en columna en frío o *cold on column* (Figura no. 7-b). La muestra se inyecta directamente en la columna a temperatura baja para después incrementarse súbitamente hasta un valor específico. Se recomienda para compuestos termolábiles o con alto punto de ebullición. No obstante, este tipo de inyección deteriora la cabeza de la columna por acumulación de componentes no volátiles.

El inyector de vaporización con temperatura programada (*PTV* por sus siglas en inglés) (Figura no. 7-c), combina algunas ventajas de los inyectores descritos anteriormente. Se introduce la muestra en el puerto de inyección a baja temperatura, en el cual hay un material adsorbente que retiene los analitos con la válvula de división abierta. La temperatura de la cámara de inyección

incrementa hasta eliminar al disolvente, luego vaporiza la muestra con la válvula de *split* cerrada. Además, permite la inyección de grandes volúmenes pues permite la eliminación del disolvente, concentrando la muestra en el adsorbente. Tiene 3 modos de empleo: 1) inyección fría con división, 2) inyección fría sin división y 3) inyección con eliminación de disolvente.

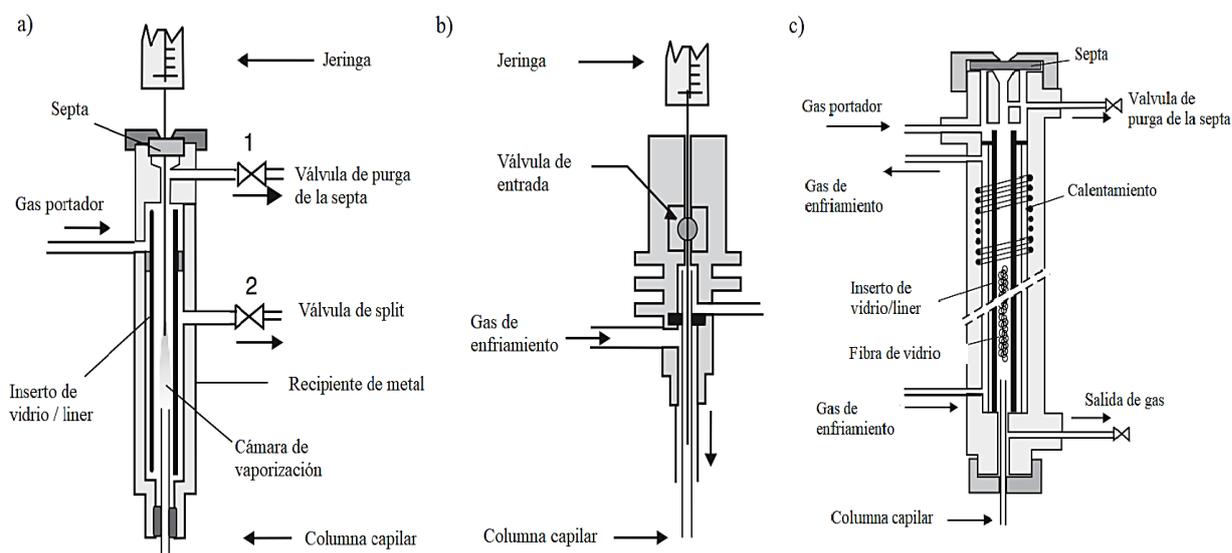


Figura no. 7. Diagramas de inyectores empleados en cromatografía de gases.
 a) Split/Splitless; b) Cold on column; c) PTV (adaptado de referencia 36)

Después de vaporizar la muestra, esta pasa al sistema de separación, es decir, a la columna que se encuentra dentro del horno para continuar con el proceso de separación. La función del horno es regular la temperatura de la columna. Así, la función de la columna es albergar a la fase estacionaria en la que se realiza la separación. Existen 2 tipos de columnas, empacadas y capilares; las columnas empacadas se rellenan con un material fino y homogéneo que sirve de soporte para la fase estacionaria líquida (Figura no 8.a). Por otro lado, las columnas capilares contienen una capa delgada de fase estacionaria enlazada químicamente a las paredes internas de la columna (Figura no. 8.b). Estas

últimas son las más empleadas actualmente en cromatografía de gases y existen 3 tipos (Figura no. 8.c):

- › Con pared recubierta, (WCOT, por sus siglas en inglés): La fase estacionaria líquida recubre la pared interior del capilar
- › Con soporte recubierto, (SCOT, por sus siglas en inglés): La pared interior contiene una capa fina de partículas no porosas que sirven de soporte a la fase estacionaria líquida
- › De lecho poroso (PLOT, por sus siglas en inglés): Poseen una capa fina de material poroso en su pared interior

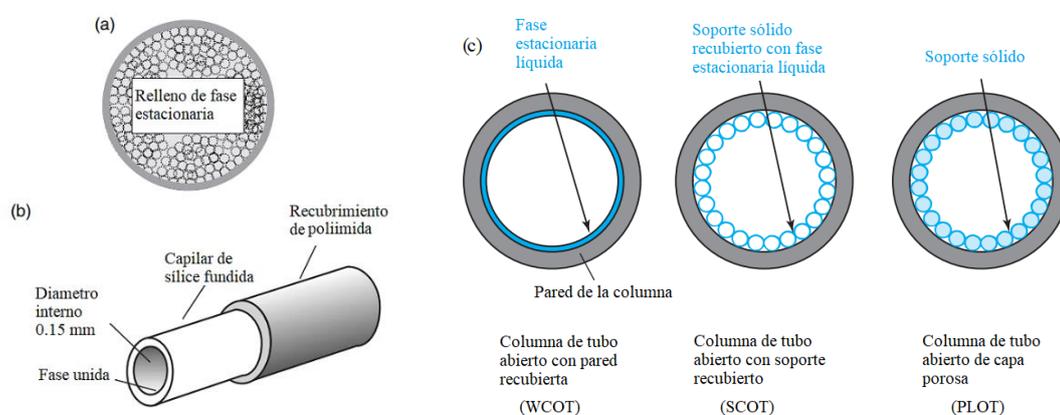


Figura no. 8. Columnas para cromatografía de gases. a) Columna empacada; b) Columna capilar; c) Tipos de columnas capilares (Adaptado de referencias 14 y 37)

Un detector es un traductor que transforma la información implícita en el efluente en información medible, normalmente señal eléctrica, fácilmente visible, manejable y amplificable.³⁵ Los detectores usados en cromatografía se basan en la medición de la variación de alguna propiedad fisicoquímica debido a un cambio en la composición del medio (efluente proveniente de la columna). Sin embargo, los detectores de cromatografía de gases suelen ser más sensibles que los utilizados en cromatografía de líquidos pues, el medio (gaseoso), al ser de baja

densidad, no perturba la detección.³⁵ Hay diversas características que son importantes al emplear un detector, como su capacidad de detectar todos los compuestos provenientes del efluente de la columna (universalidad) o solo a un tipo de analitos (selectividad), así como alta sensibilidad (Figura no. 9), intervalo lineal amplio, mínimo nivel de ruido y baja variabilidad de flujo, presión y temperatura.

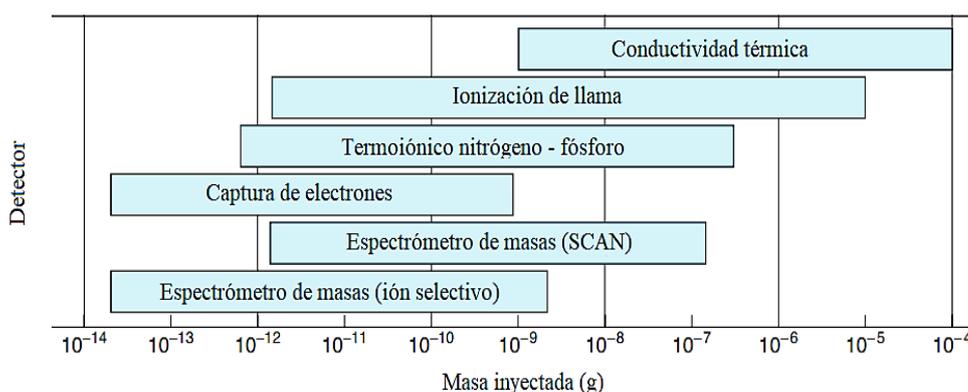


Figura no. 9. Sensibilidad y margen de trabajo aproximado de detectores representativos en cromatografía de gases. (Adaptado de referencia 37)

Existen varios detectores en cromatografía de gases como: conductividad térmica (TCD, por sus siglas en inglés), ionización de llama (FID, por sus siglas en inglés), captura de electrones (ECD, por sus siglas en inglés), termoiónico de nitrógeno y fósforo (NPD, por sus siglas en inglés), entre algunos otros. La selección del más adecuado depende de la aplicación analítica, los límites de detección y la matriz.³⁵

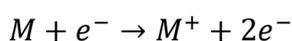
b.5.1.1. Acoplamiento con espectrometría de masas

El sistema acoplado GC-MS, se compone de un cromatógrafo de gases cuyo sistema de detección consiste en un espectrómetro de masas conectado a la salida de la columna. De esta forma, para cada compuesto eluido se obtiene un

espectro de masas, lo cual permite la identificación inequívoca de cada uno de los compuestos separados previamente en la columna cromatográfica.

La introducción de la muestra hacia el espectrómetro de masas ocurre en la *línea de transferencia*, la cual tiene una temperatura igual o mayor que la columna para evitar la condensación de la muestra. Sin embargo, esta tiene una función adicional: reducir la presión proveniente del cromatógrafo hacia el espectrómetro, esto significa disminuir la presión atmosférica al vacío requerido para la ionización.

Posteriormente, los analitos llegan a la fuente de ionización. Existen varias técnicas de ionización como la ionización química positiva y negativa (CI y NCI, por sus siglas en inglés), así como el bombardeo de átomos rápidos (FAB, por sus siglas en inglés) y, la técnica más empleada debido a su sencillez: el impacto electrónico o electroionización (EI, por sus siglas en inglés). En éste proceso, las moléculas son irradiadas con una corriente electrónica a 70 eV proveniente de un filamento de tungsteno caliente; con el fin de ionizar y romper la molécula, los fragmentos producidos son atraídos o repelidos por campos eléctricos o magnéticos. Esta ionización generalmente produce especies positivas con una sola carga:



Luego, estos iones siguen hacia el analizador de masas. De los cuales también hay una gran variedad como la trampa de iones, el tiempo de vuelo y cuadrupolo. Este último se compone de 4 barras en un arreglo hiperbólico (Figura no. 10), y con diferente polaridad entre elementos adyacentes. Las barras son sometidas a voltaje de corriente directa que rápidamente cambia generando cambio en la

polaridad, lo que provoca que los iones sean atraídos durante nanosegundos hacia un lado y después repelidos. Además, se aplica radiofrecuencia de manera creciente a todas las barras para permitir que todos los fragmentos del intervalo generado de masa/carga (m/z) lleguen al detector y generen un espectro. Es importante que este aumento en la radiofrecuencia sea rápido pues le permite al instrumento escanear 10 veces por segundo con el fin de registrar los picos eluídos. Finalmente, los iones separados pasan al detector el cual se compone de un multiplicador electrónico que se encarga de contar los iones y generar el espectro.

La adquisición de datos puede darse de dos formas; por un lado, se encuentra el barrido total de iones (SCAN, por sus siglas en inglés), que detecta todos los iones introducidos al espectrómetro. El modo SCAN se utiliza para la identificación de compuestos desconocidos, correlacionando con las bases de datos que contienen espectros de referencia. Entre las más empleadas están las desarrolladas por el Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST, por sus siglas en inglés), y por la editorial Wiley. La identificación de los compuestos se hace mediante la comparación del espectro obtenido en el análisis y los espectros de referencia. El software proporciona aquellos espectros de referencia que presentan mayor porcentaje de coincidencia con las señales del espectro obtenido.³⁴

Por otra parte, si se seleccionan iones específicos del perfil de fragmentación de un compuesto en particular, se puede tener un cromatograma específico del mismo, este modo de adquisición se denomina monitoreo/registro selectivo de iones (*SIM/SIR* respectivamente, por sus siglas en inglés), con el que se obtiene

mayor sensibilidad y selectividad en el análisis pues disminuye e incluso elimina los interferentes.

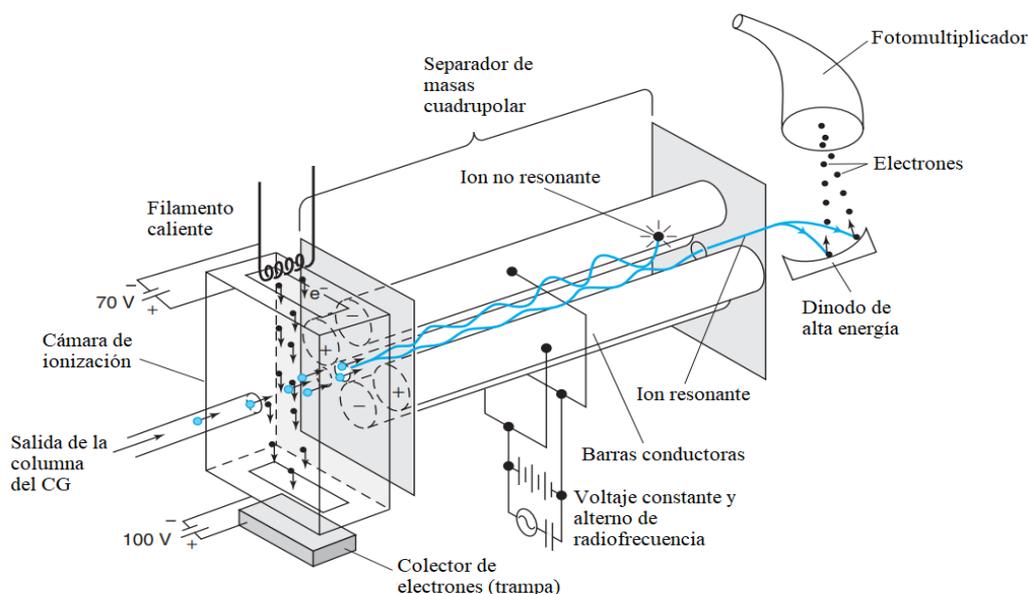


Figura no. 10. Esquema de un analizador de masas cuadrupolo (Adaptado de referencia 37)

Así, el acoplamiento de ambas técnicas resulta de gran utilidad en el análisis ambiental, alimentario, petrolero y químico en general. Entre las ventajas que ofrece, resalta la cantidad mínima de muestra con la que proporciona información amplia acerca de sus componentes. No obstante, tiene algunas desventajas como su elevado costo; además, requiere de una capacitación especial ya que es más complejo que un cromatógrafo de gases sin acoplamiento.

b.6. Validación de una metodología analítica

La validación es *el proceso de definir una necesidad analítica y confirmar que el método en cuestión tiene capacidades de desempeño consistentes con las que requiere la aplicación*.³⁸ La implementación de metodologías analíticas y los resultados obtenidos mediante ellas, tienen grandes implicaciones en la toma de decisiones. Si el resultado de una prueba no es confiable entonces tiene poco

valor; para que un resultado analítico concuerde con el propósito requerido, debe ser lo suficientemente confiable para que cualquier decisión basada en este pueda tomarse con confianza.

La validación de un método consiste en la realización de pruebas específicas que, en conjunto, dictaminan si éste es adecuado para su propósito; éstas pruebas se denominan *características de desempeño*, y; para evaluarlas, se hace uso de herramientas que permiten evaluar la influencia de los componentes de la muestra en los resultados, algunas de estas³⁸ son:

- i. Blancos: Permiten evaluar que proporción de la señal es atribuible al analito y/o a otros factores. Entre los mas empleados se encuentran:
 - a. Blancos de reactivos: Se analizan por separado los reactivos utilizados durante el proceso analítico, esto incluye los disolventes empleados en la separación o disolución; con el objetivo de ver si contribuyen a la señal de medición.
 - b. Blancos de muestra: Se trata de matrices sin analito. Se realizan para tener una estimación realista de las interferencias que pueden encontrarse en el análisis de las muestras de prueba.
- ii. Materiales de prueba: Brindan información acerca de las interferencias que pueden encontrarse realmente en el trabajo diario.
- iii. Materiales/disoluciones fortificados: Son materiales o disoluciones que han sido fortificados con el (los) analito (s) de interés. La adición de una cantidad conocida del analito permite incrementar la respuesta de este para ser medido y calculado en términos de la cantidad adicionada.
- iv. Materiales dopados: En este tipo de materiales, el analito puede ser ajeno al material pero ha sido introducido a este, previo al muestreo; de manera que

el analito estará fuertemente ligado a la matriz, en comparación a una adición. El valor del analito dependerá de las cantidades de éste en contacto con el material, de la relación de captura y de pérdida de la matriz y de otras pérdidas debidas al metabolismo.

- v. Repeticiones: Brinda información acerca del comportamiento estadístico de una medición en particular. Dado que su objetivo es obtener una variabilidad típica, considera todas las variaciones bajo las condiciones de operación que pueden ocurrir durante el uso rutinario del método.

Las características de desempeño a evaluar pueden ser especificadas en guías dentro de un sector particular de mediciones concernientes al método y es recomendable que, si se tienen disponibles, sean seguidas. En este caso, en el que se cuantifica un elemento traza en matrices biológicas, se utilizó la guía de la UNODC, al evaluar los siguientes parámetros³⁸:

- i. Exactitud: Se define como *la cercanía de un resultado al valor verdadero*, el objetivo de estimar este parámetro es evaluar la influencia de los errores sistemáticos y aleatorios sobre los resultados. La exactitud suele evaluarse en los siguientes componentes.
 - a. Veracidad: Es una expresión de que tan cercana se encuentra la media de un conjunto de resultados, producidos por el método, respecto del valor real. Por esto, la evaluación de la veracidad se determina contra un valor de referencia.

Recobro porcentual (1)

$$\%R = \frac{A_{relativa} Muestra\ fortificada}{A_{relativa} Blanco\ fortificado} \times 100\%$$

b. Precisión: Es una medida de que tan cercanos están los resultados, unos con respecto a los otros. Por lo tanto, se expresa mediante la desviación estándar o la desviación estándar relativa, las cuales, son medidas que describen la dispersión de los resultados. La repetibilidad es una de las pruebas de la precisión y brinda información acerca de la variabilidad esperada cuando un método se ejecuta por un solo analista, con un equipo en un corto periodo de tiempo, como puede ser en un mismo día (intra-día) o en varios días (inter-día).

Desviación estándar (2)

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Desviación estándar relativa (3)

$$DER = \frac{s}{\bar{x}} \times 100\%$$

ii. Linealidad: Define la habilidad del método para obtener resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito. De aquí se deduce que el intervalo lineal es el intervalo de concentraciones del analito dentro del cual los resultados de prueba obtenidos por el método son proporcionales a la concentración del analito.

Ecuación de la recta (4)

$$y = mx + b$$

En tal intervalo, se realiza la calibración, proceso en el que se determina la relación entre la respuesta analítica y la concentración del analito.³⁸ Se utilizan

dos tipos de calibrado: externo e interno; los cuales difieren en la forma de utilizar estándares químicos. En la calibración externa, se emplean en la preparación de disoluciones independientes de las disoluciones del analito con el objetivo de comparar una propiedad del analito con las del estándar.³⁸

Por otra parte, en casos donde se busca reducir la interferencia generada por otros componentes de la matriz de la muestra³⁹, suele añadirse una cantidad conocida de una sustancia de referencia a todas las muestras, estándares y determinaciones del blanco, de esta forma, la respuesta es una proporción entre la señal del analito y la señal de la sustancia de referencia. Este método es particularmente efectivo debido a que compensa ciertos tipos de errores si estos influyen en la misma magnitud proporcional al analito y a la especie química de referencia.

Sin embargo, para que esto se cumpla, se requiere que la sustancia de referencia, conocido como *estándar interno*, posea las siguientes características³⁹:

- ✓ Estar disponible;
- ✓ mismas propiedades fisicoquímicas que analito;
- ✓ no debe causar interferencias diferentes al analito;
- ✓ no debe tener contaminación del analito;
- ✓ ambas especies deben emplearse en concentraciones que sean lineales a la curva de calibración.

iii. Limite de detección: Es la concentración más baja de analito, o el valor de su propiedad relacionada, que puede detectarse confiablemente por el método. Esto implica que el valor reportado como el límite de detección es un indicativo

al cual la detección del analito resulta problemática. Es importante mencionar que este parámetro es dependiente del tipo de matriz.

- a. Relación señal – ruido: Es la relación entre la altura de un pico cromatográfico (considerado como la media) y el nivel del ruido de la línea base (tomado como la desviación estándar).³⁵ Este cociente es calculado por el software del instrumento, divide la altura mayor del rango de la señal por encima del nivel de ruido medio, entre la varianza.⁴¹ (Figura no. 11)

En este caso, el límite de detección, es la concentración o la cantidad de soluto que produce una señal de altura igual a 3 veces la altura del ruido de fondo, es decir, S/N igual a 3.

- iv. Límite de cuantificación: Es la concentración mas baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión de repetibilidad y veracidad. Es un valor indicativo y no debe usarse en la toma de decisiones. Es importante mencionar que ni el limite de detección ni el de cuantificación representan niveles en los que la cuantificación sea imposible, solo indica que el tamaño de las incertidumbres asociadas se hace comparable con el resultado real en la región del limite de detección. En analogía al límite de detección, el limite de cuantificación se define como la concentración en la que la altura de la señal del analito es igual a 10 veces la altura del ruido de fondo, teniendo S/N igual a 10.

$$S/N = \frac{H}{\sigma h}$$

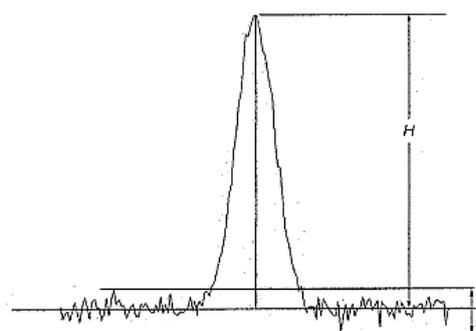


Figura no. 11. Estimación de la relación señal-ruido (S/N) en el software TurboMass 2.0

c. DESARROLLO EXPERIMENTAL

c.1. Materiales, reactivos, instrumentos y equipos

c.1.1. Materiales

Mortero de ágata con pistilo con capacidad de 40 mL (Cole-Parmer, India). Cartuchos de polipropileno (6 mL), y frits de polietileno de 1/2 in, 20 µm de tamaño de poro (Agilent, EUA). Adsorbente Chromabond C₁₈ PAH con tamaño de partícula 45 µm, (Macherey-Nagel, Alemania), jeringa Hamilton 10 µL.

c.1.2. Reactivos

Acetonitrilo 99.9%, HPLC; metanol 99.9%, reactivo (J.T.Baker, EUA), hexano 98.5%, HPLC; diclorometano 99.5%, HPLC (Tecsiquim, México), acetato de etilo (99.9%, reactivo, J.T.Baker, México), acetona (99.9%, pestanal, Fluka Analytical, Alemania), agua desionizada ultrapura tipo I (Direct Q-3 UV, Millipore, Alemania).

c.1.3. Estándares

Galaxolida (55.8%, Sigma-Aldrich, China), tonalida (99.3%, Sigma-Aldrich, EUA), oxibenzona (100.0%, Fluka Analytical, China), 4-metilbenciliden-canfor (4-MBC) 99.7%; octocrileno 99.2% (Fluka Analytical, Alemania), Padimato-O (99.0%, Fluka Analytical, EUA), 2-etilhexilmetoxicinamato (2-EHMC) (98.9%, Fluka Analytical, Suiza), benzo[a]antraceno (B[a]A) (100 µg/mL en diclorometano, Ultra Scientific, EUA).

c.1.4. Instrumentos

Balanza analítica (modelo: CP124S, Sartorius, Alemania), micropipetas de 5-50 y 20-200 µL (Hirschmann-Laborgeräte, Alemania), micropipeta 200-1000 µL (Accumax, India).

c.1.5. Equipos

Liofilizadora Freezezone Triad (modelo: 7400040, Labcongo, EUA), vortex (modelo: M37615, Thermolyne, EUA), baño de agua de temperatura controlada (modelo: 2825, Thermo Scientific, EUA), mufla (modelo: FB1315M, Thermo Scientific, EUA), procesador de alimentos modelo: DPA139, 800W, 60 Hz).

c.1.6. Material de vidrio

Matraces volumétricos de 5 y 10 mL (Kimax), viales de 8 y 11 mL, viales ámbar de 40 y 100 mL, frascos ámbar 400 mL, equipo Soxhlet (125 mL)

c.2. Lavado de material

Los almizcles se consideran ubicuos en el ambiente, por lo que se tuvo precaución durante la realización de este proyecto, para evitar contaminación. Se evitó usar productos que tuvieran como ingrediente a alguno de los analitos en estudio, tanto de higiene personal como de limpieza del laboratorio. El material de vidrio (no volumétrico), se enjuagó dos veces con metanol y se dejó reposar en agua caliente con detergente líquido Extran[®]. Posteriormente, se lavaron con Extran nuevamente, se enjuagó con agua corriente y al final se enjuagaron con agua desionizada para evitar la formación de sales. Finalmente, el material seco se colocó en la mufla durante una hora a 550 °C. Al terminar el ciclo, el material se selló con teflón y aluminio para garantizar su limpieza hasta su uso posterior.

c.3. Muestras

Las tilapias empleadas para la optimización y validación de la metodología se obtuvieron del departamento de Abejas, Conejos y Organismos Acuáticos de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la UNAM.

Se aplicó la metodología en muestras dopadas (descrita en la sección c.4.10), muestras ambientales y una comercial. Se muestra información detallada de las muestras en la tabla siguiente.

Tabla no. 3. Muestras de tilapias analizadas.

Muestra	Procedencia	Tilapias utilizadas
Muestra dopada: Acumulación de almizcles y filtros UV	Criaderos de FMVZ en Ciudad	6
Muestra dopada: Acumulación de filtros UV	Universitaria	6
Ambiental	Criaderos en el estado de Morelos	1
	FMVZ en Ciudad Universitaria	1
	Embarcadero "El salitre", Xochimilco, CDMX (19°15'40.1"N, 99°06'00.5"W)	4
Comercial	Filete, adquirido en Walmart Copilco	1

c.4. Metodología

c.4.1. Pre – tratamiento de la muestra

A cada tilapia se le retiró la piel y los órganos, se recuperó el músculo, el cual una vez sin huesos y enjuagado, se homogeneizó en el procesador de alimentos. Posteriormente, se depositó en capas delgadas dentro de cajas Petri y se almacenaron a -18 °C al menos 8 horas. Posteriormente se liofilizó a 0.024 mbar y -55 °C durante 48 horas. Finalmente, el músculo liofilizado se almacenó en un frasco ámbar dentro de un desecador para su posterior uso.

c.4.2. Determinación del contenido de grasa y humedad en músculo de tilapia

La grasa y la humedad se determinaron por gravimetría. El contenido de humedad se estimó con la diferencia entre el peso inicial y final después de la liofilización del músculo de tilapia.

El contenido de grasa se determinó con una extracción Soxhlet en la que se pesó 1 g de músculo liofilizado de tilapia y se sometió a reflujo con 55 mL de una mezcla 1:1 (v/v) de diclorometano – hexano durante 16 horas. Después de este tiempo, el extracto se filtró para eliminar cualquier partícula sólida y se transfirió a un matraz bola, en el cual se evaporó a sequedad utilizando un rotavapor. Se pesó el matraz con el residuo hasta alcanzar peso constante. El análisis de grasa se realizó por duplicado.

c.4.3. Preparación de las disoluciones

En las pruebas de optimización y validación se utilizaron estándares analíticos. Se prepararon las disoluciones madre de cada analito a una concentración de 1 mg/mL en metanol. Se pesaron 10 mg de cada estándar (de galaxolida se pesó 18 mg debido a la pureza del estándar, 55.8%), y se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL, al que se adicionó 5 mL de metanol y se agitó en vórtex hasta su disolución; se completó el aforo con metanol. A partir de estas disoluciones se realizaron las diluciones requeridas en el desarrollo de la metodología. Todas las disoluciones se almacenaron a 4 °C en ausencia de luz.

c.4.4. Fortificación de muestras

Se pesó 0.2 g de músculo liofilizado, el cual se fortificó con 100 µL de una disolución estándar de los analitos en acetona a 2 µg/mL (partiendo de las

disoluciones descritas en la sección c.4.3), para facilitar la eliminación del disolvente. Se dejó en equilibrio durante 2 horas. Al terminar este tiempo, la muestra se preparó según el procedimiento descrito en la sección c.4.6.

c.4.5. Desarrollo de MSPD para tilapia mojarra

Los parámetros evaluados para el desarrollo de la MSPD con músculo de tilapia fueron fase dispersante, relación muestra:dispersante y uso de co-columna.

Fase dispersante: Se estudió florisil^{iv} y sílice C₁₈ como dispersante en una proporción 1:5 de muestra:dispersante (0.2 de músculo de pescado liofilizado y 1.0 g de dispersante) para evaluar el recobro en dos muestras fortificadas a 1 µg/g.

Relación muestra:dispersante: Con el fin de mejorar el recobro de los analitos, se evaluaron dos relaciones de muestra:dispersante. (a) 1:4 (0.5 g de músculo de pescado liofilizado y 2.0 g de Sílice C₁₈) y; (b) 1:3 (0.2 g de músculo de pescado liofilizado y 0.6 g de Sílice C₁₈). Se comparó el recobro de los analitos en muestras fortificadas a 1 µg/g con las proporciones (a) y (b) evaluadas.

Uso de co-columna: Se evaluó el uso de una co-columna de florisil para mejorar la limpieza del extracto. Para ello, se realizaron dos análisis de muestras fortificadas a 1 µg/g con una proporción de 0.2 g de pescado liofilizado y 1.0 g de Sílice C₁₈. En una se colocó 0.5 g de florisil como co-columna previo a la muestra dispersada en sílice C₁₈ y, a la otra muestra no se le añadió co-columna. Se compararon los cromatogramas en modo SCAN y SIR con el objetivo de observar interferencias.

^{iv} Silicato de magnesio sintético, MgO:XSiO₂•H₂O

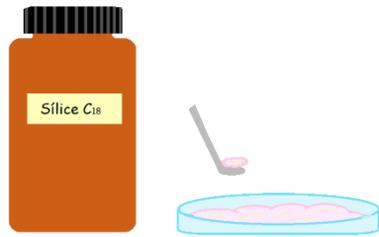
c.4.6. Metodología MSPD para tilapia mojarra

Se pesó 0.2 g de músculo liofilizado de tilapia y 0.6 g de sílice C₁₈ como fase dispersante, los cuales se homogenizaron en el mortero de ágata con pistilo durante 5 min. Posteriormente, la mezcla se transfirió a un cartucho de polipropileno provisto con un frit en el fondo, introducido con ayuda de un émbolo. Al terminar de verter la dispersión en el cartucho, se colocó un segundo frit en la parte superior con el émbolo para empacar el macerado. Los analitos se eluyeron por gravedad con 5 mL de acetonitrilo. El extracto se evaporó a sequedad en un baño de agua a 40 °C con un flujo suave de nitrógeno. Posteriormente, el residuo se reconstituyó con 900 µL de acetato de etilo, 100 µL de acetona y 20 µL de la solución de estándar interno B[a]A (10 µg/mL en metanol). Se agitó 30 s en el vórtex y se inyectaron 5 µL del extracto reconstituido en el sistema PSSI-GC-MS. (Figura no. 12).

c.4.7. Efecto matriz

Con el propósito de estudiar la influencia de la composición de la matriz en la respuesta de los analitos, se compararon los cromatogramas obtenidos del análisis de una muestra fortificada a 1 µg/g y un blanco fortificado a 200 ng/mL .

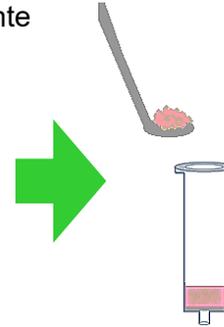
0.6 g de Sílice C₁₈ y 0.2 g de músculo liofilizado de tilapia



Homogenización de la mezcla muestra:dispersante durante 5 min

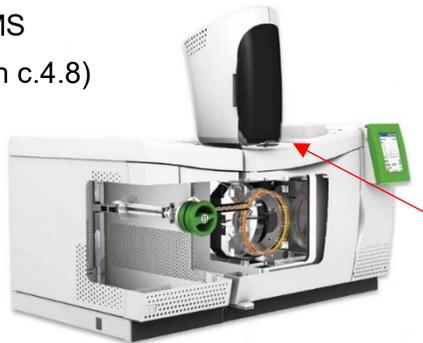


Adición del macerado y empacado en el cartucho de polipropileno



Elución con 5 mL de acetonitrilo

Análisis en el sistema PSSI-GC-MS (ver sección c.4.8)



Reconstitución de la disolución con 900 μ L de AcOEt, 100 μ L de acetona y 20 μ L de EI [10 ppm]



Evaporación a sequedad del extracto en un baño de agua a 40°C con flujo suave y constante de N₂

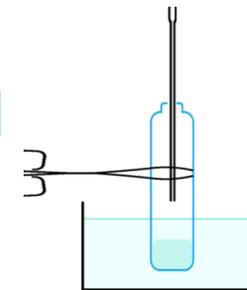


Figura no. 12. Metodología desarrollada

c.4.8. Análisis cromatográfico

Se empleó un cromatógrafo de gases Clarus 680 GC de Perkin Elmer, con inyector programable *split/splitless* acoplado a un espectrómetro de masas Clarus SQ 8 C. El software TurboMass 6.1.0 se utilizó en la adquisición de datos. En la separación se ocupó una columna capilar Elite-5MS (5% difenil - 95% polidimetilsiloxano, 30 m de longitud x 0.25 mm de diámetro interno x 0.25 µm de grosor de fase, Perkin Elmer, EUA). El programa de temperatura del horno fue: 80 °C durante 1 min seguido de un incremento de 10 °C/min hasta 300°C y se mantuvo en dicha temperatura por 10 min; con una duración total de 33 min. Se empleó helio (99.999%, Praxair) como gas portador cuyo flujo en la columna fue de 1 mL/min de 0-20 min y de 2 mL/min de 20-33 min. El volumen de inyección fue de 5 µL. Para la preconcentración de los analitos se empleó un programa de temperatura en el inyector: 80 °C por 1.3 min después se incrementó a razón de 200 °C/min hasta alcanzar 320 °C y se mantuvo por 28.7 min. También el inyector se programó en los siguientes modos: splitless (0-0.1 min), split 50:1 (0.1-1.5 min), splitless (1.5-3 min) y split 50:1 (3-30 min). Las temperaturas de la línea de transferencia y la fuente de ionización fueron 280 °C y 250 °C respectivamente. Los espectros de masas se obtuvieron por impacto electrónico con un potencial de ionización de 70 eV. La identificación se realizó en modo SCAN de 50-400 m/z y para la cuantificación se empleó el modo SIR con los iones que se muestran en la Tabla no. 5.

c.4.9. Validación del método

Los parámetros de validación evaluados fueron precisión (repetibilidad), veracidad, linealidad, límites de detección y cuantificación. La veracidad y la

precisión se realizaron con muestras fortificadas a 1.0 µg/g. Para ello, se analizaron tres muestras fortificadas en dos días diferentes y se calculó el recobro y la DER. La linealidad se evaluó fortificando muestras de tilapia liofilizada en el intervalo 0.1 a 30 µg/g a siete niveles de concentración (0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 30 µg/g) para el 4 – MBC, y seis para el resto de los analitos (0.5, 1, 5, 10, 20, 30 µg/g); de cada concentración se realizaron tres réplicas y se calculó la ecuación de la recta, así como el coeficiente de determinación (R^2). Los límites de detección y cuantificación se determinaron con la relación señal/ruido de la línea base, como 3 y 10 respectivamente, mediante el análisis de muestras fortificadas a 50, 75, 100, 250 y 500 ng/g.

c.4.10. Obtención de muestras dopadas

Se realizó el análisis de las tilapias expuestas a una concentración constante de los almizcles y filtros UV estudiados. En ambas exposiciones, las 6 tilapias empleadas en cada experimento se acondicionaron durante una semana previa en un acuario instalado en el laboratorio. Se mantuvieron en 70 L de agua aireada con 4 ± 0.5 mg/L de oxígeno disuelto, a una temperatura de 27 °C y pH igual a 7 con cambios diarios de 50 L de agua aireada.

Acumulación de almizcles y filtros UV: el experimento se realizó en el acuario con 70 L de agua aireada durante 5 días. En la fortificación, se utilizó una disolución madre a 1 mg/mL de cada uno de los analitos preparada en metanol. Se añadió 1 mL de dicha disolución por cada 10 L de agua. Para mantener la concentración constante, el acuario se refortificó diariamente después del cambio de 50 L de agua aireada. Al finalizar la exposición de los peces, se recuperó el músculo siguiendo el procedimiento descrito en la sección c.4.1 y se realizó el análisis de acuerdo con la sección c.4.6.

Acumulación de filtros UV: en este experimento, el acuario con 70 L de agua se fortificó con 1 mL de una disolución estándar de cada uno de los filtros UV estudiados a 1.0 mg/mL preparada en metanol, por cada 10 L de agua aireada. Para obtener una concentración en el acuario de 100 ng/mL de los filtros UV, se fortificó el acuario diariamente, después de realizar el cambio de 50 L de agua aireada. Se extrajeron 2 tilapias en intervalos de 24 h durante 3 días. Se preparó un duplicado de cada muestra a las 24 y 72 horas de exposición; debido a que se emplearon tilapias juveniles, y por ende de menor tamaño; la cantidad de muestra era escasa. Se siguió con los procesos descritos en c.4.1 y c.4.6.

Tabla no. 5. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos estudiados

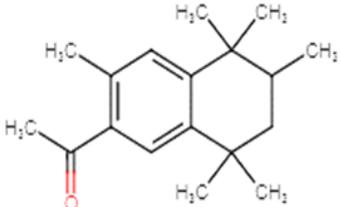
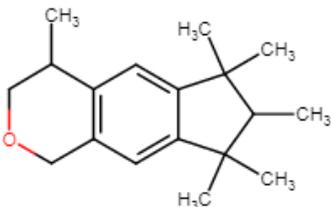
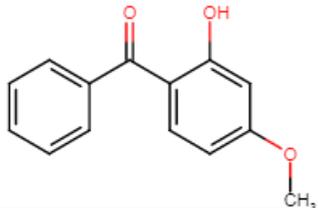
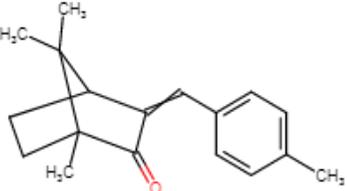
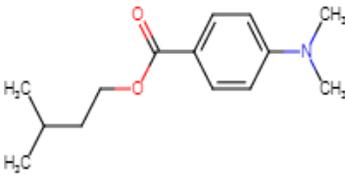
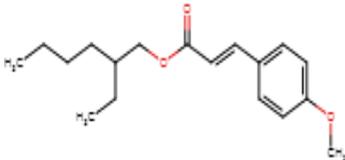
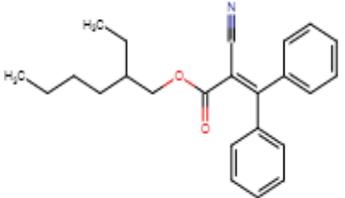
Tipo	Nombre IUPAC	Nombre común (Abreviación)	Estructura	Fórmula/Peso molecular [g/mol]	Log K _{ow}	S ⁱⁱⁱ [mg/mL] ⁴²	Iones monitoreados [m/z]
Almizcles	1,3,4,6,7,8-hexahidro-4,6,6,7,8,8-hexametil-ciclopenta(g)-2-benzopirano	Galaxolida (HHCB)		C ₁₈ H ₂₆ O 258.40	5.9 ¹⁰	1.75	243, 258
	1-(5,6,7,8-tetrahidro-3,5,5,6,8,8-hexametil-2-naftalenil)-etanona	Tonalida (AHTN)		C ₁₈ H ₂₆ O 258.40	5.8 ¹⁰	1.25	243, 258
Filtros UV	(2-hidroxi-4-metoxifenil) fenil-metanona	Oxibenzona (BP-3)		C ₁₄ H ₁₂ O ₃ 228.24	3.5 ³⁹	130	171, 211, 254
	1,7,7-trimetil-3-[(4-metilfenil) metileno]-biciclo[2.2.1]heptan-2-ona	4-metil-benciliden alcanfor (4 - MBC)		C ₁₈ H ₂₂ O 254.37	5.5 ³⁹	17	77, 151, 228

Tabla no. 5. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos estudiados

Tipo	Nombre IUPAC	Nombre (Abreviatura)	Estructura	Fórmula y masa molecular [g/mol]	Log K _{ow}	S ^v [mg/mL] ⁴²	Iones monitoreados [m/z]
Filtros UV	Ácido 4-(dimetilamino)-2-etilhexiléster benzoico	Padimato – O (O-PABA)		C ₁₇ H ₂₇ NO ₂ 277.40	5.8 ³⁹	4.70	148, 165, 277
	Ácido 3-(4-metoxifenil)-2-etilhexiléster 2-propiónico	2-etilhexil metoxicinamato (2-EHMC)		C ₁₈ H ₂₆ O ₃ 290.40	5.8 ³⁹	0.15	161, 178, 290
	Ácido 2-ciano-3,3-difenil-2-etilhexiléster 2-propionico	Octocrileno (OC)		C ₂₄ H ₂₇ NO ₂ 361.48	6.9 ³⁹	0.36	204, 249, 360

^v S: solubilidad en agua

d. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

d.1. Desarrollo de la metodología

La preparación de muestra busca proveer una matriz adecuada para el análisis, por lo que se estudió la influencia de los componentes de la matriz en la respuesta de los analitos. Por esto, se evaluaron las condiciones descritas en la sección c.4.5. con el fin de reducir o eliminar la presencia de interferentes.

d.1.1. Fase dispersante

En tilapia, el uso de florisil derivó en recobros del 40% para casi todos los analitos, excepto para la oxibenzona cuyo recobro fue del 10%. Este resultado se asocia con la interacción entre el silicato del adsorbente y el grupo hidroxilo de la oxibenzona lo que, posiblemente, dio lugar a la formación de puentes de hidrógeno provocando una mayor retención de BP-3 en el dispersante. En la muestra dispersada con sílice C₁₈ se observó un aumento en el recobro de todos los analitos obteniéndose porcentajes de 50-70% excepto para oxibenzona, con un recobro de 126%. Por lo que se seleccionó como dispersante la sílice C₁₈.

d.1.2. Uso de co-columna

Los cromatogramas en modo SCAN mostraron un extracto más limpio con la co-columna; sin embargo, las señales correspondientes al colesterol y a los ácidos grasos no se modificaron. Además, el recobro de los analitos disminuyó con la co-columna de florisil por lo que se omitió el uso de esta.

d.1.3. Relación muestra:dispersante

En la Tabla no. 6 se muestra el recobro por analito en las proporciones estudiadas (sección c.4.5). La elección de la mejor relación muestra:dispersante se basó en los recobros de los blancos fortificados. La disminución de la cantidad

de fase dispersante incrementó el recobro de los analitos pues alcanzó valores de 60-80%, excepto para oxibenzona. Debido a esto, se eligió utilizar la relación 1:3.

Tabla no. 6. Comparación entre blancos de muestra con las relaciones muestra-dispersante evaluadas (1:4 y 1:3)

Analito	% Recobro (1:4)	% Recobro (1:3)
Galaxolida	63.9	74.0
Tonalida	51.3	68.3
Oxibenzona	126.8	132.2
4 – MBC	48.9	63.3
Padimato – O	68.3	70.2
2 - EHMC	67.4	68.5
Octocrileno	83.3	72.8

d.2. Efecto matriz

A pesar de obtenerse un extracto limpio y de la adición de un estándar interno, se observó un efecto matriz importante, por lo que se empleó la calibración en matriz pues ofrece un mejor estimado del recobro considerando la composición de la matriz.³² Los almizcles, galaxolida y tonalida muestran efecto matriz negativo con un 22.2 % y 29.6 % de disminución en la señal, respectivamente. Por otra parte, los filtros UV presentan un efecto negativo de 13 – 21 %, a excepción de la oxibenzona con un efecto positivo de 34%.

Como se trató anteriormente, las características del analito como la polaridad y la estabilidad, influyen en el alteración de la respuesta atribuida al efecto matriz. Posiblemente, en el caso de efecto matriz positivo, hubo un incremento en la

transferencia de masa del inyector a la columna en los extractos de la muestra, en comparación con estándares en disolución. Esto se puede atribuir al enmascaramiento de sitios activos en el inyector del cromatógrafo por componentes co-extraídos de la matriz, favoreciendo el acceso a la columna. Así como un efecto protector de estos mismos, lo cual, reduce el riesgo de descomposición de los analitos en el inyector antes de pasar a la columna. Por el contrario, los analitos con efecto matriz negativo no experimentan este efecto protector de la matriz, por lo que no son transferidos con tanta eficiencia a la columna. Esto es posible debido a que poseen mayor estabilidad a altas temperaturas o a un potencial limitado de adsorción sobre el inyector; lo cual hace que su disminución sea mayormente atribuible a la eficiencia de extracción.

d.3. Validación del método MSPD-PSSI-GC-MS para tilapia mojarra

Con la metodología ya optimizada, (sección c.4.5), se realizaron las pruebas correspondientes a los parámetros de validación, descritas en el apartado c.4.9.

d.3.1. Precisión y veracidad

En estos parámetros, se obtuvieron desviaciones estándar relativas menores al 16.08 %. Esto es aceptable bajo el criterio de la Guía de las Naciones Unidas para análisis de drogas a nivel de trazas en especímenes biológicos⁴⁴, pues establece que un método preciso debe tener valores de DER < 20%.

Tabla no. 7. Precisión y veracidad del método MSPD-PSSI-GC-MS

Analito	<i>Intra-día (n=3)</i>		<i>Inter-día (n=6)</i>	
	Recobro promedio	DER	Recobro promedio	DER
Galaxolida	77.78 %	13.87 %	80.93 %	11.22 %
Tonalida	70.36 %	11.49 %	76.84 %	14.86 %
Oxibenzona	134.58 %	7.91 %	129.44 %	11.36 %
4 – MBC	78.72 %	4.71 %	85.99 %	15.24 %
Padimato - O	85.09 %	4.20 %	91.40 %	12.01 %
2 – EHMC	86.89 %	3.26 %	93.61 %	12.67 %
Octocrileno	80.62 %	4.67 %	89.75 %	16.08 %

d.3.2. Linealidad

En la Tabla no. 8, se observa que el coeficiente de determinación de los filtros UV es mayor a 0.97, mientras que para los almizcles es mayor a 0.90. Posiblemente relacionado con la semivolatilidad de estos últimos, generando un aumento en el error aleatorio en el análisis.

Tabla no. 8. Parámetros de linealidad (n = 3)

Analito	Intervalo [µg/g]	Ecuación	R ²
Galaxolida	0.5-30	$y = 0.1203 (\pm 0.0099) x + 0.1736 (\pm 0.1755)$	0.9029
Tonalida	0.5-30	$y = 0.1633 (\pm 0.0107) x + 0.1766 (\pm 0.1715)$	0.9357
Oxibenzona	1-30	$y = 0.3146 (\pm 0.0116) x - 0.0335 (\pm 0.1818)$	0.9788
4-MBC	1-30	$y = 0.1779 (\pm 0.0062) x + 0.0848 (\pm 0.0893)$	0.9775
Padimato-O	0.5-30	$y = 1.0845 (\pm 0.0416) x + 0.5872 (\pm 0.6941)$	0.9769
2-EHMC	0.5-30	$y = 1.0684 (\pm 0.0404) x + 0.5047 (\pm 0.6204)$	0.9777
Octocrileno	0.5-30	$y = 0.2774 (\pm 0.0092) x + 0.0953 (\pm 0.1424)$	0.9825

d.3.3. Límites de detección y cuantificación

Ambos límites se determinaron con la relación señal–ruido (S/N) obtenida del instrumento. Se evaluó dicho cociente en muestras fortificadas a 0.05, 0.075, 0.1, 0.25 y 0.5 µg/g, tomando como criterio $S/N \geq 3$ para el límite de detección y $S/N \geq 10$ para el de cuantificación, dando como resultado las concentraciones mostradas en la Tabla no. 9. Los valores obtenidos demuestran que el método es adecuado para la cuantificación de los analitos a nivel de trazas por su alta sensibilidad.

Tabla no. 9. Límites de detección y cuantificación por analito

Analito	LD [µg/g]^{vi}	LC [µg/g]^{vii}
Galaxolida	0.050	0.100
Tonalida	0.075	0.250
Oxibenzona	0.250	0.750
4-MBC	0.500	0.750
Padimato-O	0.075	0.250
2-EHMC	0.050	0.075
Octocrileno	0.075	0.500

d.4. Contenido de grasa y humedad en muestras de tilapia mojarra

Como se describió en la sección c.4.2, se estimó el porcentaje de humedad y de grasa de algunas muestras. En la Tabla no. 10, se observa que la mayor parte del peso de las tilapias se debe a agua pues en la liofilización se perdió un 78-83% de la masa total.

^{vi} Determinado en base seca con señal/ruido de 3

^{vii} Determinado en base seca con señal/ruido de 10

Tabla no. 10. Caracterización de muestras de tilapia mojarra (valor promedio)

Muestra	% humedad	% Grasa ^{viii}
Veterinaria 1	82.98	0.30
Morelos	81.58	0.71
Walmart	82.39	1.89
Veterinaria 2	78.90	1.38

d.5. Aplicación del método MSPD-PSSI-GC-MS en muestras de tilapia

Como se mencionó en el apartado c.3, la aplicación de la metodología a muestras de tilapia se divide en 3 apartados.

d.5.1. Muestras dopadas

La exposición de las muestras a una concentración constante de los analitos estudiados permitió evaluar la respuesta de cada compuesto absorbido en condiciones ambientales.

d.5.1.1. Acumulación de almizcles y filtros UV

En este ensayo se cuantificó el analito absorbido por la tilapia después de un periodo de 120 h de exposición a los analitos estudiados. En la Tabla no. 11, se muestra que la oxibenzona y el octocrileno son los compuestos más absorbidos de los filtros UV. Por otra parte, el almizcle tonalida se encontró en mayor cantidad que galaxolida.

^{viii} En base húmeda

Tabla no. 11. Resultados del ensayo de acumulación

Analito / Muestra	Concentración [$\mu\text{g/g}$]					
	1	2	3	4	5	6
Galaxolida	1.87	0.22	0.88	ND ^{ix}	ND	ND
Tonalida	0.71	2.87	3.29	< LC	1.21	0.70
Oxibenzona	6.63	2.34	3.57	3.20	5.80	2.66
4-MBC	1.46	ND	ND	ND	< LC	ND
Padimato-O	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2-EHMC	ND	< LC	ND	ND	ND	ND
Octocrileno	1.78	2.57	2.65	0.83	1.25	0.39

d.5.1.2. Acumulación de filtros UV

Los resultados de las 2 tilapias expuestas a los filtros UV analizadas en periodos de 24 y 72 horas a los filtros UV se muestran en la Tabla no. 12. No se detectaron 4 – MBC y padimato – O después de 24 h. Sin embargo, a las 72 h de exposición a los contaminantes se aprecia la señal de 4-MBC. En cambio, oxibenzona presentó señal desde las 24 h.

^{ix} ND: No detectado

Tabla no. 12. Resultados del ensayo de acumulación de filtros UV

Analito	Concentración [$\mu\text{g/g}$]	
	<i>24H-2</i>	<i>72H-1</i>
Oxibenzona	3.59	11.12
4-MBC	ND ^x	1.91
Padimato-O	ND	ND
2-EHMC	ND	0.16
Octocrileno	1.34	3.57

d.5.2. Muestras ambientales

Se identificaron algunos filtros UV en concentraciones menores al límite de cuantificación en la muestra de los criaderos de FMVZ en Ciudad Universitaria. Sin embargo, se identificó oxibenzona en la muestra del estado de Morelos, así como galaxolida en 2 especímenes de la alcaldía de Xochimilco, (Tabla no. 13). Es difícil determinar si el lugar de origen de estas muestras está contaminado puesto que en el análisis ambiental se requiere del muestreo formal y con un número de especímenes mayor, pues existe cierta variación entre individuos de la misma especie, ya sea por la etapa de crecimiento del organismo o factores como su principal fuente o nivel de alimentación.

^x ND: No detectado

Tabla no. 13. Resultados de muestras ambientales

Analito	Concentración [$\mu\text{g/g}$]					
	Morelos	FMVZ	Xochimilco			
			1	2	3	4
Galaxolida	ND ^{xi}	< LC	ND	ND	ND	0.18
Tonalida	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Oxibenzona	8.07	< LC	< LC	< LC	ND	< LC
4-MBC	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Padimato-O	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2-EHMC	ND	< LC	ND	ND	ND	< LC
Octocrileno	< LC	< LC	ND	ND	ND	< LC

d.5.3. Muestra comercial

Se analizó por duplicado el filete de tilapia de Walmart, en el cual se detectó la presencia de componentes de la muestra cercanos a los tiempos de retención de los filtros UV. Para descartar la presencia de los analitos en la muestra comercial, se comparó el cromatograma de la muestra de Walmart con el correspondiente a una muestra fortificada a 1 $\mu\text{g/g}$ y a un blanco de muestra. (Figura no. 13). En este cromatograma se observaron las señales de los almizcles debido, posiblemente, a su ubicuidad en el ambiente. Por otra parte, los filtros UV fueron descartados al observar que los picos correspondieron a componentes de la muestra. Es importante mencionar que la muestra comercial contenía mayor cantidad de grasa, en comparación con el resto de las muestras estudiadas en la sección d.4. Además, esta muestra presentó una apariencia más rosada comparada con las tilapias analizadas en las secciones d.5.1 y d.5.2,

^{xi} ND: No detectado

lo cual puede atribuirse a los aditivos^{xii} añadidos a los productos durante su procesamiento, como colorantes y conservadores.⁴⁵

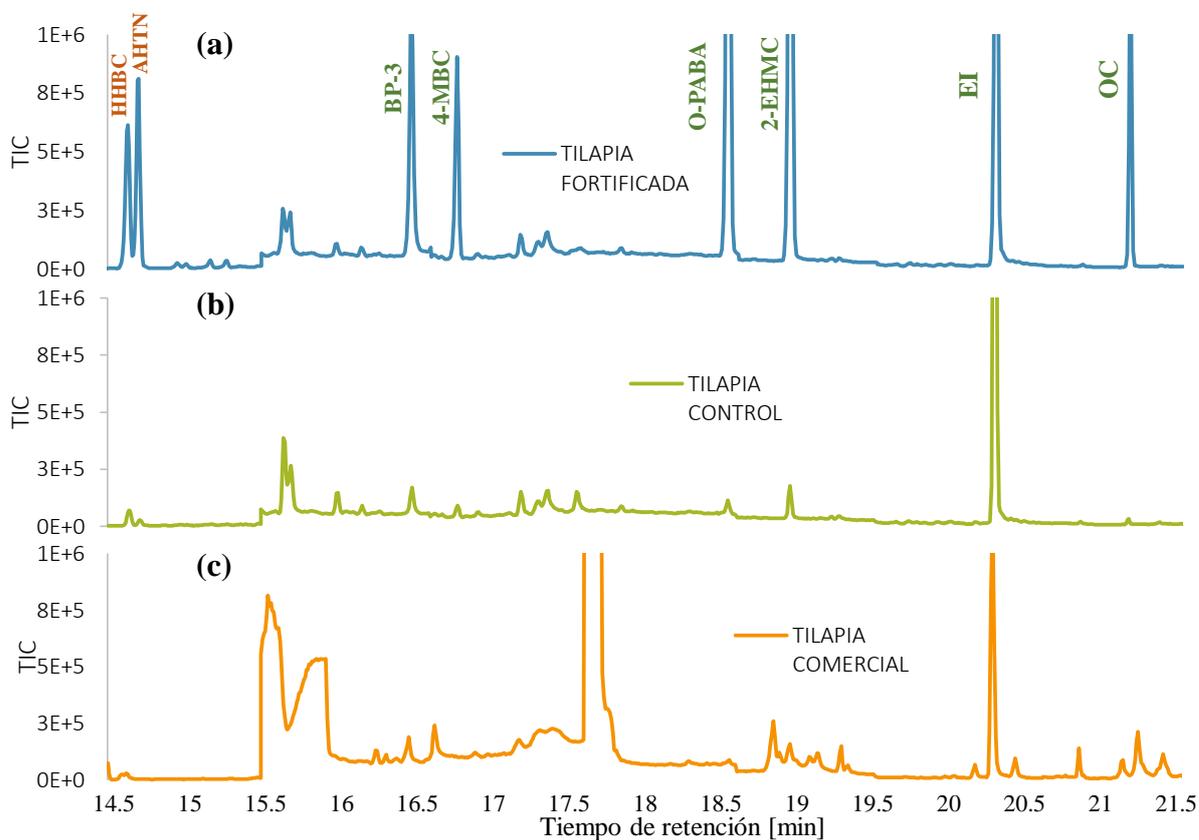


Figura no. 13. Comparación de los cromatogramas iónicos de (a) una muestra fortificada (1 µg/mL), (b) una muestra control, y (c) la muestra comercial (Walmart).

^{xii} Cualquier sustancia permitida que, sin tener propiedades nutritivas, se incluya en la formulación de productos y que actúe como estabilizante, conservador o modificador de sus características organolépticas, para favorecer su estabilidad, conservación, apariencia o aceptabilidad.

e. CONCLUSIONES

Se desarrolló y validó una metodología para la determinación de almizcles aromáticos policíclicos y filtros UV en tilapia mojarra, con lo cual se brinda una alternativa al análisis ambiental que permitirá la regulación de este tipo de contaminantes, pues la metodología emplea un menor volumen de disolventes y menor cantidad de muestra en comparación con otras técnicas de preparación. Asimismo, se trata de una metodología repetible, sencilla y rápida que facilitará el monitoreo ambiental.

Se realizó la cuantificación de almizcles y filtros UV en muestras de tilapia expuestas a los analitos, demostrando que son organismos susceptibles a la presencia de los analitos estudiados, lo que hace de la tilapia mojarra un buen organismo para el monitoreo de recursos agropecuarios.

En la aplicación de la metodología en muestras ambientales y en la comercial no se determinaron concentraciones importantes de los analitos en los especímenes estudiados. Sin embargo, esto no resta importancia a la necesidad de monitorear y regular los almizcles y filtros UV en el ambiente, solo demuestra que se puede evitar el daño a la salud humana por consumo de productos contaminados.

f. REFERENCIAS

1. Kümmerer, K. in *Treatise on Water Science* **3**, 69–87 (Elsevier, 2010).
2. Smital, T. Acute and chronic effects of emerging contaminants. *Handbook of Environmental Chemistry, Volume 5: Water Pollution* **5 S1**, 105–142 (2008).
3. Montes-Grajales, D., Fennix-Agudelo, M. & Miranda-Castro, W. Occurrence of personal care products as emerging chemicals of concern in water resources: A review. *Science of the Total Environment* **595**, 601–614 (2017).
4. Barceló, D. Emerging pollutants in water analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **22**, (2003).
5. Brausch, J. M. & Rand, G. M. A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. *Chemosphere* **82**, 1518–1532 (2011).
6. Montesdeoca-Esponda, S., Checchini, L., Del Bubba, M., Sosa-Ferrera, Z. & Santana-Rodríguez, J. J. Analytical approaches for the determination of personal care products and evaluation of their occurrence in marine organisms. *Science of the Total Environment* **633**, 405–425 (2018).
7. Clarke, B. O. & Smith, S. R. Review of “emerging” organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environment International* **37**, 226–247 (2011).
8. Gros, M., Petrovic, M. & Barceló, D. Analysis of emerging contaminants of municipal and industrial origin. *Handbook of Environmental Chemistry, Volume 5: Water Pollution* **5 S1**, 37–104 (2008).
9. Petrie, B., Barden, R. & Kasprzyk-Hordern, B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge,

- understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research* **72**, 3–27 (2014).
10. Rimkus, G. G. Polycyclic musk fragrances in the aquatic environment. *Toxicology Letters* **111**, 37–56 (1999).
 11. Fromme, H., Otto, T. & Pilz, K. Polycyclic Musk Fragrances in the Aquatic Environment. *ACS Symposium Series* **773**, 203–222 (2001).
 12. Homem, V., Silva, J. A., Ratola, N., Santos, L. & Alves, A. Long lasting perfume e A review of synthetic musks in WWTPs. *Journal of Environmental Management* **149**, 168–192 (2015).
 13. Sommer, C. in *Handbook of Environmental Chemistry* **3**, 1–16 (Springer Verlag, 2004).
 14. Hanrahan, Jane R. “Sunscreens.” *Australian Prescriber* **35**, 5, 148–3 (2012).
 15. Geoffrey, K., Mwangi, A. N. & Maru, S. M. Sunscreen products: Rationale for use, formulation development and regulatory considerations. *Saudi Pharmaceutical Journal* **27**, 1009–1018 (2019).
 16. Sambandan, D., Ratner, D. Sunscreens: an overview and update. *Journal of the American Academy of Dermatology* **64**, 748-58 (2011)
 17. Ramos, S., Homem, V., Alves, A. & Santos, L. Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment - A review. *Science of the Total Environment* **526**, 278–311 (2015).
 18. Díaz-Cruz, M. S. & Barceló, D. Chemical analysis and ecotoxicological effects of organic UV-absorbing compounds in aquatic ecosystems. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **28**, 708–717 (2009).
 19. Lowe, N. and Shaath, N. *Sunscreens: Development, evaluation and regulatory aspects*. 2nd ed. New York: M. Dekker. (1990).

20. Pedrouzo, M., Borrull, F., Marcé, R. M. & Pocurull, E. Analytical methods for personal-care products in environmental waters. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **30**, 749–760 (2011).
21. Chovanec, A., Hofer, R. & Schiemer, F. Chapter 18: Fish as bioindicators. *Trace Metals and other Contaminants in the Environment* **6**, 639–676 (2003).
22. Calow, P. *Handbook of Ecotoxicology. Handbook of Ecotoxicology* **1–2**, 1–885 (Wiley Blackwell, 2009).
23. Instituto Nacional de Pesca (2012). Acuacultura – Tilapia. Consultado el 5 de diciembre del 2019 desde <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/308111/02tilapia.pdf>
24. Hernández-Sánchez, F., & Aguilera-Morales, M.E. Nutritional Richness and Importance of the Consumption of Tilapia in the Papaloapan Region. *Revista Electrónica de Veterinaria* **13**, 6, 1-12 (2012).
25. Gerhardt, A. Bioindicator species and their use in biomonitoring. In: UNESCO, editor. *Encyclopedia of life support systems*. Oxford (UK): UNESCO, EOLSS. 50 p. (2002).
26. Smith, R. M. Before the injection - Modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A* **1000**, 3–27 (2003).
27. Barker, S. A. Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **70**, 151–162 (2007).
28. Barker S.A. Use of Matrix Solid-Phase Dispersion for Determining Pesticides in Fish and Foods. *Pesticide Protocols. Methods in Biotechnology*. Humana Press. **19**, (2006).
29. Bogialli, S. & Di Corcia, A. Matrix solid-phase dispersion as a valuable tool for extracting contaminants from foodstuffs. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **70**, 163–179 (2007).

30. Poole, C. F. Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1158**, 241–250 (2007).
31. Akutsu, K., Yoshimitsu, M., Kitagawa, Y., Takatori, S., Fukui, N., Osakada, M., Yamaguchi, S., Kajimura, K., Obana, H., Watanabe, T. Evaluation of the matrix-like effect in multiresidue pesticide analysis by gas chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* **40**, 1293–1300 (2017).
32. Giacinti, G., Raynaud, C., Capblancq, S. & Simon, V. Matrix-Matching as an Improvement Strategy for the Detection of Pesticide Residues. *Journal of Food Science* **81**, T1342–T1350 (2016).
33. Hajšlová, J. *et al.* Matrix-induced effects: A critical point in the gas chromatographic analysis of pesticide residues. *Journal of Chromatography A* **800**, 283–295 (1998).
34. McNair, H. and Miller, J. *Basic Gas Chromatography*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Incorporated. (2009).
35. Polo Díez, L. *Fundamentos de cromatografía*. 1ra ed. España: Dextra. (2015).
36. Rouessac, F., Rouessac, A. and Brooks, S. *Chemical analysis Modern Instrumentation Methods and Techniques*. 2nd ed. Chichester: *John Wiley and Sons, Ltd.* (2014).
37. Harris, Daniel C., *Quantitative Chemical Analysis*. New York :W. H. Freeman and Co. (2010).
38. EURACHEM. *Métodos analitos adecuados a su propósito. Guía para la validación de métodos y temas relacionados*. CENAM, México (2005). 2da. Edición.

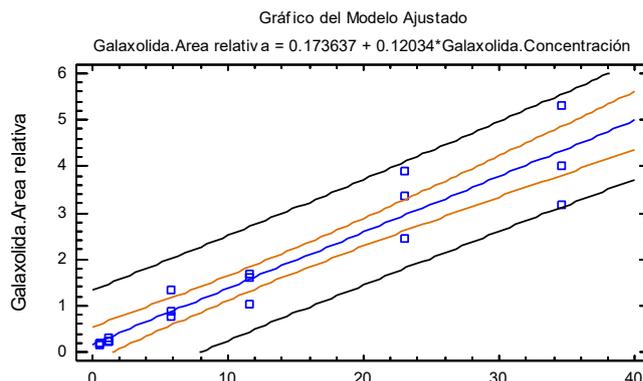
39. Skoog, D. A., West, D. M., Holler, F. J. & Crouch, S. R. "Fundamentos de química analítica", 9na ed. Cengage Learning. D.F., México. (2015).
40. Ocaña-Rios, I., Peña-Alvarez, A., Loeza-Fuentes, E. & Zuñiga-Perez, I. Determination of Personal Care Products in Fish Tissue Based on Matrix Solid-Phase Dispersion Combined with Programmable Split/Splitless Injector Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods* **11**, 2272–2279 (2018).
41. Perkin Elmer. (2011). TurboMass Software User's Guide. 09931016 B. USA.
42. Skoog, D. A., Holler, J. H., Nieman, T. A. "Principios de Análisis Instrumental", 5a ed. McGraw Hill. Madrid, España. (2001).
43. Reaxys. Consultado el día 14 de noviembre del 2019 desde <https://www.reaxys.com/#/search/quick>
44. United Nations Office on Drugs and Crime. Guidance for the validation of analytical methodology and calibration of equipment used for testing of illicit drugs in seized materials and biological specimens. *United Nations*, New York. (2009). Extraído desde: unodc.org/documents/scientific/validation_E.pdf
45. NORMA Oficial Mexicana NOM-242-SSA1-2009, Productos y servicios. Productos de la pesca frescos, refrigerados, congelados y procesados. Especificaciones sanitarias y métodos de prueba. Consultado el 20 de mayo de 2020. Extraído desde: <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4295/salud2a/salud2a.htm>
46. Miller, N.J. & Miller, J.C., "Estadística y quimiometría para química analítica", 1ra ed. Pearson Educación. Madrid, España. (2002).

g. ANEXOS

g.1. Curvas de calibración por analito – Linealidad

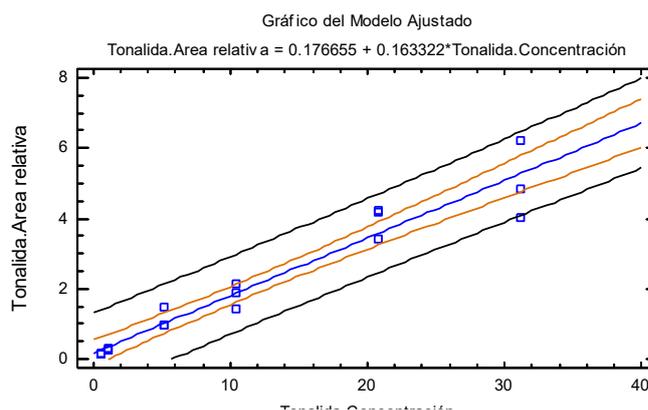
Galaxolida

Parámetro	Mínimos Cuadrados	Est
	Estimado	E
Intercepto	0.1736	0.1
Pendiente	0.1203	0.0
R ²	0.9029	



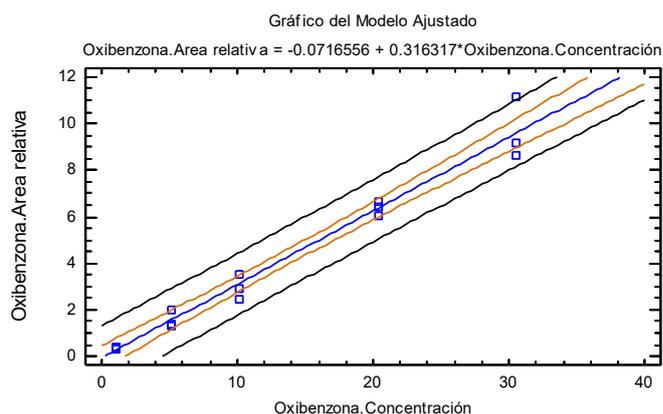
Tonalida

Parámetro	Mínimos Cuadrados	Est
	Estimado	t
Intercepto	0.1766	0.
Pendiente	0.1633	0.
R ²	0.9357	



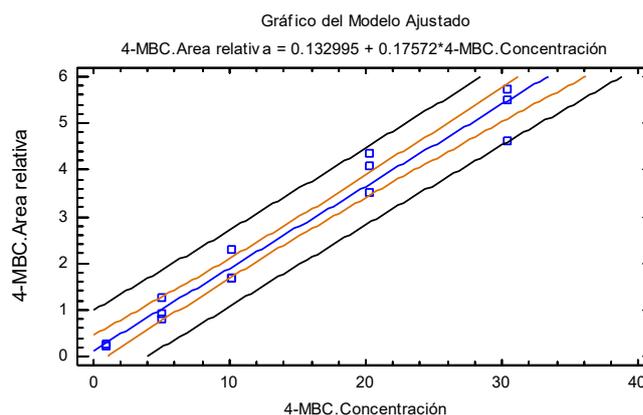
Oxibenzona

Parámetro	Mínimos Cuadrados	Est
	Estimado	E
Intercepto	-0.0716	0.2
Pendiente	0.3163	0.0
R ²	0.9742	



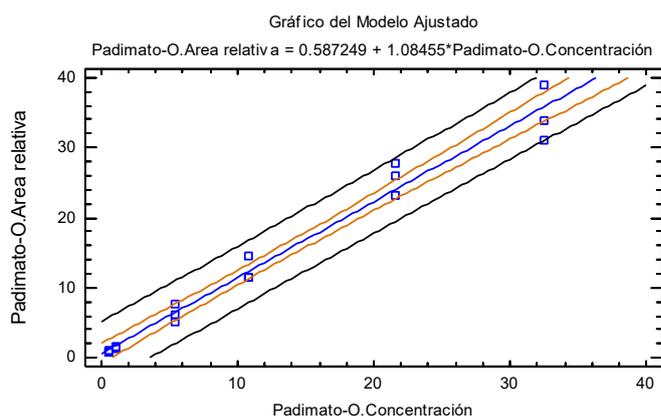
4-MBC

Parámetro	Mínimos Cuadrados	Est
	Estimado	E
Intercepto	0.1330	0.1
Pendiente	0.1757	0.0
R ²	0.9680	



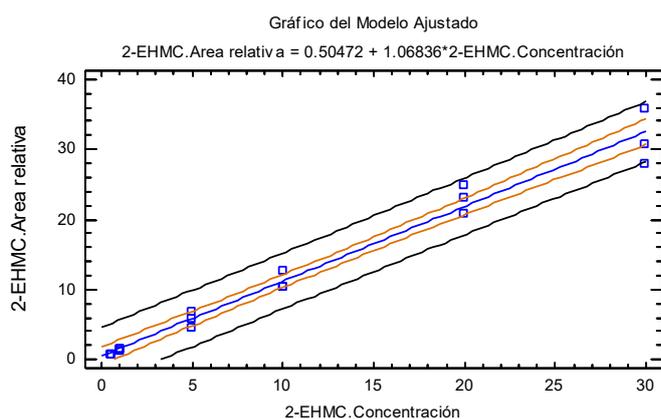
Padimato – O

Parámetro	Mínimos	Est
	Cuadrados	
	Estimado	E
Intercepto	0.5872	0.0
Pendiente	1.0845	0.0
R ²	0.9769	



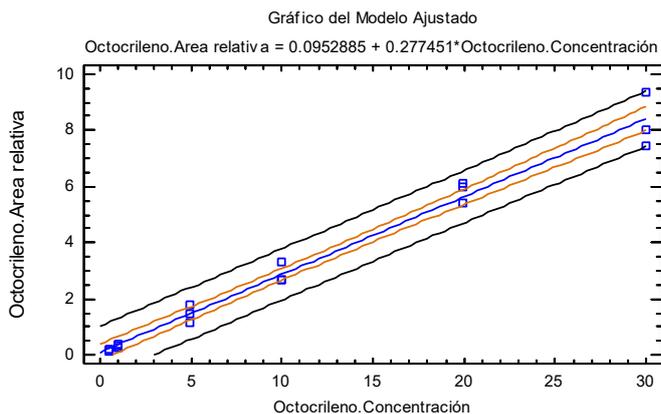
2 – EHMC

Parámetro	Mínimos	Est
	Cuadrados	
	Estimado	E
Intercepto	0.5047	0.0
Pendiente	1.0684	0.0
R ²	0.9777	



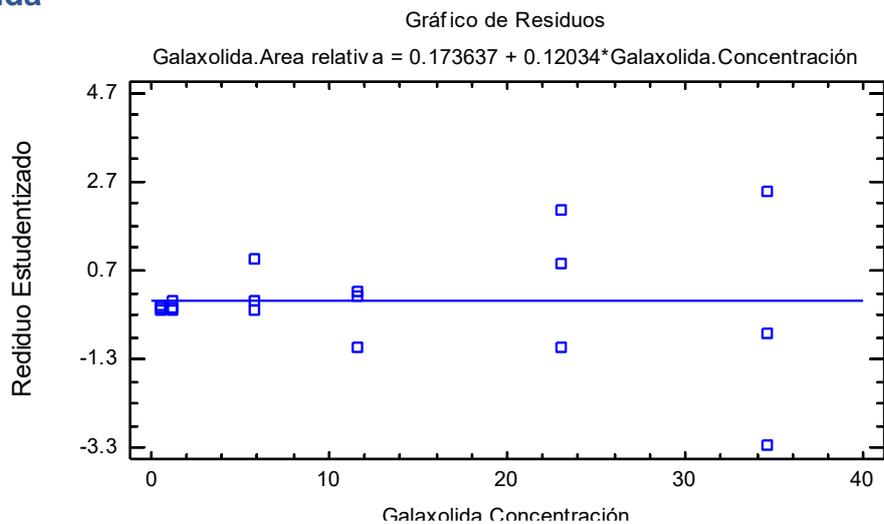
Octocrileno

Parámetro	Mínimos	Est
	Cuadrados	
	Estimado	E
Intercepto	0.0953	0.0
Pendiente	0.2774	0.0
R ²	0.9825	



g.2. Gráficos de residuales asociadas a la prueba de linealidad por analito

Galaxolida



Tonalida

