



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

Propuesta metodológica para la determinación de Tonalide y Almizcle cetona en muestras de lodo activado por extracción asistida con ultrasonido y microextracción en fase sólida seguida del análisis por cromatografía de gases - espectrometría de masas (UAE-SPME-GC-MS).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO

P R E S E N T A:

**RUIZ CHÁVEZ GILBERTO ÁNGEL
ASESOR**

DR. JOSÉ ELÍAS BECERRIL BRAVO



CDMX

2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE Prof.: PREZA DE LA VEGA JOAQUIN
VOCAL Prof.: DIAZ FLORES LUIS ALEJANDRO
SECRETARIO Prof.: BECERRIL BRAVO JOSE ELIAS
1er. SUPLENTE Prof.: VAZQUEZ MIRANDA JUAN ROLANDO
2º SUPLENTE Prof.: ROJO PORTILLO TANIA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Laboratorio de Ingeniería Ambiental, Edificio 5 del Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José Elías Becerril Bravo

SUSTENTANTE:

Gilberto Ángel Ruíz Chávez

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por la formación profesional y deportiva que me ha brindado.

Al Instituto de Ingeniería ambiental por permitirme realización de la tesis, así como el uso de reactivos. Además del apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico UNAM a través del Programa de Apoyo a Proyectos para Innovar y Mejorar la Educación (PAPIME 2018).

Al Dr. Luis Alejandro Díaz Flores por facilitarme el uso de equipos, por ayudarme a crecer en el ámbito profesional y por su guía en el desarrollo de mi proyecto de licenciatura.

Al M. en C. Francisco Rojo Callejas por su ayuda al facilitar el uso de equipos del laboratorio 102 del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química en el desarrollo de mi tesis

Al compañero I.Q. Nicolás por facilitar muestras de lodo activado de la planta de tratamiento del Cerro de la Estrella.

Dedicatorias

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por ser mi segunda casa, la cual amo y respeto, además de la formación profesional y deportiva que me ha brindado.

A mis padres y hermano: Patricia Chávez García, Marco Antonio Ruiz Gaviña y Marco Antonio Ruiz Chávez por su incondicional y entera confianza, amor y apoyo a lo largo de mi vida, esto no sería posible sin ellos.

A Gabriela Vázquez Ibarra, te agradezco el acompañarme en este momento, por apoyarme, quererme y ayudarme a crecer como persona.

Al Dr. José Elías Becerril Bravo por el apoyo y guía durante el proyecto de tesis.

Al Instituto de Ingeniería de la UNAM por permitirme usar sus instalaciones y equipos para realizar mi servicio social y mi tesis.

A los profesores Raúl Porta Contreras e Isaac Hernández Viveros, que en paz descansen, quienes ayudaron a mi formación como persona y atleta, dándome consejo o apoyo en momentos difíciles.

A mis compañeros del equipo representativo de natación de la UNAM, mis amigos del laboratorio 102 del departamento de Química Analítica de posgrado en la facultad de química.

A la “DONA”, mi grupo de amigos en la carrera, con los cuales compartí momentos de risa, estrés, nerviosismo y aprendizaje a lo largo de 5 años y que fueron de gran ayuda haciendo mi estancia en la facultad de química más amena y divertida.

“Odié cada minuto de entrenamiento, pero dije: no me voy. Sufro ahora y vivo el resto de mi vida como un campeón.”

-Muhammad Ali

“No puedes poner un límite a nada. Cuanto más sueñas, más lejos llegas”

-Michael Phelps

Abreviaturas

AcCN	Acetonitrilo
Ces	Contaminantes emergentes
CH₂Cl₂	Diclorometano
CV	Coefficiente de variación
DE	Desviación estándar
ECD	Electrón capture detector/Detector de captura de electrones
GC	Gas chromatography/Cromatografía de gases
K_{OW}	Coefficiente de distribución octanol-agua
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
MS	Mass spectrometry/Espectrometría de masas
PCPs	Personal care products/Productos del cuidado personal
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano/Divinilbenceno
PPM	Partes por millón
PPB	Partes por billón
PPT	Partes por trillón
PTAR	Planta de tratamiento de agua residual
PTFE	Polytetrafluoroethylene/Politetrafluoroetileno
R	Coefficiente de correlación lineal
SCAN	Barrido total de iones
SIM	Single ion monitoring/Monitoreo selectivo de iones
SPME	Solid phase microextraction/Microextracción en fase sólida
DI-SPME	Solid phase micro-extraction/Microextracción en fase sólida
UAE	Ultrasound-Assisted Extraction/ Extracción asistida con ultrasonido

Contenido

Abreviaturas	v
Contenido	vi
Resumen	1
1. Introducción	3
2. Antecedentes	5
2.1. Agua residual	5
2.1.1. Tratamiento de agua residual	5
2.2. Producción de lodos en el tratamiento de agua residual	5
2.2.1. Normatividad de lodos activados en México	6
2.3. Usos de los lodos residuales	6
2.3.1. Fuente de energía	6
2.3.2. Aprovechamiento en la agricultura	6
2.4. Tipos de contaminantes en lodo residual	7
2.4.1. Contaminantes emergentes	8
2.4.2. Distribución de almizcles en el ambiente	13
2.4.3. Almizcles sintéticos como disruptores endocrinos	13
2.4.4. Riesgos ambientales y ecotoxicidad de almizcles sintéticos	14
2.4.5. Legislación de almizcles	16
2.5. Métodos analíticos para la determinación de almizcles	16
2.6. Microextracción en fase sólida (SPME)	18
2.6.1. Fibras de SPME	19
2.6.2. Parámetros que afectan la SPME	19
2.6.3. Extracción de los analitos en SPME	20
2.6.4. Desorción de los analitos en SPME	21
2.7. Extracción asistida por ultrasonido (UAE)	22
2.7.1. Tipos de ultrasonido	22
2.7.2. Parámetros que afectan en la extracción por ultrasonido	23
2.8. Cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS)	24
3. Objetivos	26

3.1.	Objetivo general.....	26
3.2.	Objetivos particulares	26
4.	Justificación.....	26
5.	Hipótesis.....	26
6.	Desarrollo experimental.....	27
6.1.	Materiales y reactivos	27
6.1.1.	Limpieza del material de vidrio	27
6.2.	Instrumentación y equipos.....	28
6.3.	Condiciones del análisis cromatográfico.....	28
6.4.	Muestra de lodo activado	28
6.4.1.	Tratamiento previo de la muestra	28
6.5.	Identificación de Tonalide y Almizcle cetona por GC-MS	28
6.6.	Estudio de la temperatura del inyector y tiempo de splitless	29
6.7.	UAE de tonalide y almizcle cetona en lodo activado.	29
6.7.1.	Fortificación del lodo liofilizado	29
6.7.2.	Selección del disolvente de extracción para la UAE.....	29
6.7.3.	Extracción con metanol.....	30
6.7.4.	Evaluación de la retención de los analitos en el filtrado (membrana de teflón).	30
6.7.5.	Tiempo de extracción con ultrasonido.....	31
6.8.	Extracción del lodo por UAE.....	31
6.9.	Variables que afectan la extracción de los analitos con SPME	31
6.9.1.	Selección de la fase polimérica de extracción.....	31
6.9.2.	Efecto de una sal inerte (NaCl).....	31
6.9.3.	Efecto de la temperatura	31
6.9.4.	Estudio del efecto del pH	31
6.10.	Condiciones seleccionadas para el análisis de una disolución estándar de tonalide y almizcle cetona por SPME.	32
6.11.	Análisis de tonalide y almizcle cetona por SPME-GC-MS.....	32
6.11.1.	Límites de cuantificación y detección	32
6.11.2.	Curva de calibración para tonalide y almizcle cetona.....	33
6.12.	Análisis de lodo activado de la planta de tratamiento de Cerro de la Estrella, Iztapalapa, CDMX.	33
6.12.1.	Blanco de reactivos	33
6.12.2.	Blanco de lodo activado	33

6.12.3.	Determinación de Tonalide y Almizcle cetona en una muestra de lodo fortificado.	33
7.	Resultados y discusión	34
7.1.	Identificación de Tonalide y Almizcle cetona por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)	34
7.2.	Estudio de la temperatura del inyector y el tiempo de splitless para la identificación de Tonalide y Almizcle cetona.	36
7.3.	Desarrollo del método para análisis de lodo activado por UAE-SPME-GC-MS.	39
7.3.1.	Análisis del disolvente de extracción para la UAE.	39
7.3.2.	Retención de analitos en los filtros de membrana.	41
7.3.3.	Tiempo de extracción con ultrasonido.	42
7.4.	Condiciones óptimas para la UAE en sedimento	42
7.5.	Estudio de variables que afectan la extracción de los analitos con SPME.	43
7.5.1.	Selección de la fibra	43
7.5.2.	Efecto de la adición de una sal inerte (NaCl) en la extracción	44
7.5.3.	Efecto de la temperatura en la SPME	45
7.5.4.	Efecto del pH de extracción	46
7.6.	Condiciones seleccionadas para el análisis de tonalide y almizcle cetona en agua desionizada.	46
7.7.	Análisis del estándar de tonalide y almizcle cetona por UAE-SPME-GC-MS.	47
7.7.1.	Límites de cuantificación y detección	47
7.7.2.	Curva de calibración para tonalide y almizcle cetona	47
7.8.	Análisis de lodo activado de la planta de tratamiento de Cerro de la estrella, Iztapalapa, Ciudad de México.	48
7.8.1.	Blanco de reactivos	48
7.8.2.	Blanco de lodo activado	49
7.8.3.	Determinación de Tonalide y Almizcle cetona por UAE-SPME-GC-MS en muestra de lodo activado fortificado	49
8.	Conclusiones.	52
9.	Perspectiva	52
10.	Referencias	53
11.	Anexos	55
11.1.	Límites de detección y cuantificación	55
11.1.1.	Gráfico de los límites de detección y cuantificación	55
11.1.2.	Límites de detección y cuantificación	55

11.2.	Curvas de calibración	56
11.2.1.	Linealidad del sistema de cada analito	56
11.2.2.	Curvas de calibración independientes del tonalide	57
11.2.3.	Curvas de calibración de almizcle cetona	58
11.3.	Blanco de reactivos	58
11.4.	Blanco de lodo activado	59
11.5.	Lodo residual activado	59

Resumen

Se propuso una metodología para la determinación de tonalide y almizcle cetona (fragancias utilizadas en productos del cuidado personal) en lodo activado mediante la extracción asistida con ultrasonido (UAE) seguida de microextracción en fase sólida (SPME) y su análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).

En la UAE se evaluó el efecto del tiempo y disolvente de extracción. Para SPME se estudió el efecto de la fase polimérica, pH de la disolución, porcentaje de una sal inerte (NaCl) y temperatura de extracción.

Los resultados de las variables evaluadas para la UAE mostraron que las mejores condiciones fueron: el uso de metanol como disolvente y 30 s de baño de ultrasonido (30 Watts). Para SPME se utilizó la fibra de PDMS (100 μm), temperatura de extracción de 40 $^{\circ}\text{C}$ sin ajustar el pH y ni adicionar sal.

Se evaluó la linealidad del método ($R^2 > 0.98$) para ambos analitos, y se determinaron los límites de detección y cuantificación (0.15 y 0.5 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$).

El método desarrollado se aplicó a una muestra de lodo activado de la planta de tratamiento de agua residual de Cerro de la Estrella. El análisis reveló la presencia de ambos almizcles sintéticos, en concentraciones de 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ y 0.48 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ para almizcle cetona y tonalide respectivamente.

1.Introducción

En la actualidad existe interés por los contaminantes emergentes (CEs), debido a su contribución en la contaminación del aire, agua, suelo, sedimento y organismos vivos. Su presencia en el ambiente no se considera significativa en términos de distribución y concentración, provocando que pasen inadvertidos y con la posibilidad de generar problemas ambientales, así como riesgos para la salud dado el desconocimiento de su presencia, impacto y tratamiento. Se sabe que, entre los CEs más comunes, que completan la lista de sustancias no reguladas, se encuentran: hidrocarburos aromáticos, herbicidas, fármacos y productos del cuidado personal (PCP's) (5).

Algunos PCP's tienen como propósito brindar un mejor olor, consistencia y aspecto, después de cumplir su función, estas sustancias terminan en el sistema de drenaje y son canalizadas en las plantas de tratamiento de agua residual (PTAR). Durante el tratamiento recibido no se contempla su presencia, lo que lleva a que no sean eliminados en su totalidad, provocando que la principal vía de distribución en el ambiente sea a través del agua tratada y sedimento durante su uso en actividades humanas (riego, agricultura, generación de energía) (4 y 7).

La preocupación por la presencia en el ambiente de algunos PCP's como las fragancias, se basa en el desconocimiento de su impacto ecotoxicológico y su permanencia activa tras ser desechados e incorporados al ambiente. Diversos estudios han demostrado su presencia en agua residual, superficial y subterránea, así como suelo, sedimento y organismos vivos. La bioacumulación de fragancias en animales marinos es capaz de generar disrupción endócrina, afectando el desarrollo reproductivo, alterando el comportamiento, reduciendo las tasas de crecimiento y perjudicando la resistencia a enfermedades de la vida silvestre. En el caso de su bioacumulación en lodo residual, las concentraciones reportadas se encuentran en un rango de 1.4 -13.5 mg·kg⁻¹ y de 0 – 0.5 mg·kg⁻¹ para tonalide y almizcle cetona respectivamente (12-15).

Para su determinación, en distintas matrices ambientales, se desarrollan nuevos métodos que involucran un procedimiento laborioso a raíz de la complejidad y diversidad de las muestras. La variabilidad de la muestra puede poner en riesgo el desempeño analítico de un método, limitándolo a una aplicación específica y un número de muestra reducido, ya que sus características físicas, químicas y fisicoquímicas provocan que los contaminantes interactúen de manera compleja con la matriz, por lo que, el análisis de sedimento y organismos, sigue representando un reto analítico.

Actualmente existen procedimientos analíticos que han permitido el desarrollo de técnicas y sistemas de detección más eficientes con los que se pueden determinar de manera más efectiva (19).

En este trabajo se propuso el desarrollo de una metodología para la determinación de tonalide y almizcle cetona en lodo activado, utilizando técnicas de preparación de muestra miniaturizada (extracción asistida con ultrasonido (UAE) y microextracción en fase sólida (SPME)) seguido del análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La propuesta metodológica se aplicó a una muestra de lodo activado, aportando información sobre la presencia y distribución de estas fragancias.

2. Antecedentes

2.1. Agua residual

El agua residual, es el agua procedente de las descargas municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas (1).

Una planta de tratamiento de agua residual (PTAR), tiene el objetivo de generar mejores características en cuanto a la calidad y cantidad de agua tratada mediante diferentes procedimientos físicos, químicos y biotecnológicos (2).

2.1.1. Tratamiento de agua residual

En las PTAR, el agua residual recibe un tratamiento, el cual involucra procesos físicos, mecánicos, químicos y biológicos para la eliminación de diferentes tamaños de partículas y algunos compuestos orgánicos coloidales y disueltos (iones, bacterias, virus, sustancias orgánicas naturales y sintéticas, etc.), además, los desechos generados en este proceso deben ser tratados para controlar su contenido de contaminantes permisibles.

Los procesos de tratamiento pueden clasificarse en tres tipos:

1) Primario

Ocurre la separación por métodos físicos (sedimentación, flotación y floculación) de los sólidos en suspensión sedimentables, no retenidos en el pretratamiento, así como las sustancias flotantes que puedan afectar los siguientes procesos.

2) Secundario

Elimina la materia orgánica biodegradable no sedimentable y disuelta, empleando la combinación de procesos mecánicos (sedimentación) y biológicos (aerobio y anaerobio). La biomasa que se genera en este proceso debe ser removida para que el efluente siga con el tratamiento.

3) Terciario

Incluye procesos biológicos, físicos y químicos para remover materiales disueltos que incluyen gases, sustancias orgánicas no biodegradables naturales y sintéticas, iones, bacterias, virus (3).

2.2. Producción de lodos en el tratamiento de agua residual

En el tratamiento de agua, los residuos que se generan se conocen como biosólidos, dentro de ellos, a los sólidos y semisólidos formados en el tratamiento biológico del agua se les conoce como lodos activados y su formación se lleva a cabo en dos etapas. En un decantador, durante el tratamiento primario se produce una separación física por parte de los sólidos en suspensión debido a su densidad. En

la segunda etapa (tratamiento secundario) una parte de la materia orgánica solubilizada es metabolizada a CO₂ y H₂O, y la otra es transformada en materia viva por el desarrollo de un cultivo microbiano. Los residuos orgánicos de estas etapas constituyen la mayoría de los lodos, pero también incluyen arena, natas y sólidos. La composición del lodo es heterogénea y varía en función de los constituyentes del agua residual, las condiciones ambientales y la procedencia del lodo (3).

2.2.1. Normatividad de lodos activados en México

Los lodos provenientes de las PTAR tienden a contar con la presencia de metales pesados y microorganismos patógenos, por ello deben cumplir con la NOM-004-SEMARNAT-2002 (NOM-004), en la cual se establecen los límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final, además de especificar los criterios con los que deberán cumplir los biosólidos para ser aprovechados. Dichos contaminantes consideran algunos metales, organismos patógenos y parásitos que se encuentran en el lodo. De igual manera establece que de acuerdo a la calidad del lodo el aprovechamiento que tendrá (4).

2.3. Usos de los lodos residuales

2.3.1. Fuente de energía

El lodo puede servir como fuente de energía, produciendo biogás, el cual se obtiene como subproducto de la digestión anaerobia durante el tratamiento secundario. Otras alternativas con las cuales se puede transformar el lodo, en un recurso energético, es sometiéndolo a secado térmico, incineración, pirolisis y gasificación. En las PTAR, se pueden obtener beneficios derivados del aprovechamiento del biogás, lo cual es importante debido a cambios en la economía por el incremento en el costo de la energía eléctrica. El biogás generado puede producir entre 50 y 100% de la energía requerida en un tratamiento biológico convencional (3).

2.3.2. Aprovechamiento en la agricultura

El aprovechamiento de los biosólidos y su aplicación en suelos tienen el propósito de mejorar sus características (textura y capacidad de absorción de agua), brindando condiciones más favorables para el crecimiento de las raíces e incrementando la tolerancia de la vegetación a la sequía. Por otra parte, se le proveen nutrientes como: el nitrógeno, fósforo, níquel, zinc y cobre. Esenciales para el crecimiento vegetal. Los biosólidos pueden servir también como una alternativa o sustituto a los costosos fertilizantes sintéticos. Estas formas orgánicas de nutrientes son menos solubles en agua y, por lo tanto, tienen una menor

probabilidad de lixiviarse al agua subterránea o ser arrastradas a las aguas superficiales (3).

Los nutrientes en los biosólidos representan una ventaja en comparación con los fertilizantes inorgánicos, gracias a que pueden ser incorporados lentamente por las plantas en crecimiento. Además, estos nutrientes son menos solubles en agua y, por lo tanto, tienen una menor probabilidad de lixiviar al agua subterránea o superficial (3).

2.4. Tipos de contaminantes en lodo residual

Un contaminante es toda materia o sustancia, sus combinaciones o compuestos, derivados químicos o biológicos, así como toda forma de energía, radiaciones ionizantes, vibraciones o ruido que, al incorporarse y actuar en la atmósfera, agua, suelo, flora, fauna o cualquier elemento del ambiente alteran o modifican su composición o afectan la salud (5-6).

Dependiendo de la carga de contaminantes y del tratamiento que se le dé al agua residual será la composición del lodo activado, ya que en él se concentra una gran variedad de sustancias químicas contaminantes suspendidas o disueltas (5). Algunos ejemplos se encuentran en la Tabla 1.

Tabla 1. Contaminantes indicadores en lodos residuales.

GRUPO CONTAMINANTE	EJEMPLO
Productos farmacéuticos	Antibióticos, analgésicos, antihipertensivos
Drogas ilícitas	Cocaína, LSD.
Hormonas esteroides	Testosterona, cortisol, progesterona.
Compuestos de consumo humano	Cafeína, nicotina, edulcorantes artificiales.
Retardantes de flama	Tetrabromobisphenol- A (TBBPA), Bifenilos polibromados.
Aditivos alimentarios	Alcanfor, ácido hexanóico, mentol.
Productos del cuidado personal	Perfumes, fragancias (galaxolide y tonalide), agentes de protección solar, repelentes de insectos.
Metales pesados	Cd, Zn, Ni, Hg, Mn.

Dentro de la gran cantidad de sustancias contaminantes que pueden estar presentes en el lodo residual se encuentran las que son catalogadas como contaminantes emergentes.

2.4.1. Contaminantes emergentes

Los contaminantes emergentes (CEs) son aquellas sustancias que representan una posible amenaza para la salud y el medio ambiente, debido a la incidencia, contribución de riesgo y datos ecotoxicológicos. Diversos estudios sobre estos compuestos indican que son candidatos a una regulación dependiendo de sus efectos nocivos a la salud humana y los datos de monitoreo con respecto a su incidencia. Un contaminante también puede ser emergente si se descubre una nueva fuente, vía de exposición con los humanos, método o tecnología de detección (5-6).

Algunos productos de consumo humano como los surfactantes, farmacéuticos, cuidado personal, aditivos de las gasolinas, retardantes de fuego, antisépticos, hormonas y subproductos de la desinfección del agua, han sido catalogados como CEs, sus emisiones representan un problema en cuanto a su eliminación durante el tratamiento de agua residual, por lo cual es importante el estudio de los CEs en las PTAR (5).

2.4.1.1. Productos del cuidado personal (PCP's)

Son un grupo de sustancias químicas utilizadas en diferentes productos comerciales, los cuales se elaboran para uso directo sobre el cuerpo humano, ingredientes activos y conservadores.

Los PCP's representan un grupo de contaminantes emergentes, debido a su capacidad de inducir efectos fisiológicos en seres vivos, por lo que en la actualidad son estudiados y se busca determinar su presencia en diferentes matrices medio ambientales y los posibles efectos a la salud en seres vivos. La Tabla 2 muestra algunos PCP's que son contaminantes emergentes

Tabla 2. Grupos de PCP's mencionados como contaminantes emergentes.

PCP	USOS	EJEMPLO
Fragancias	Generar olor placentero	policíclicos, macrocíclicos.
Agentes de protección solar	Proteger la piel y disminuir el daño por radiación UV	Benzofenona y metilbenzilidene
Repelentes de insectos	Combatir a los insectos	N, N-dietiltoluamida

Los PCPs terminan en las plantas de tratamiento, principalmente, a través de los desechos que resultan como producto de la higiene personal y actividades recreativas (natación). Dado que la mayoría de estos productos son de baja volatilidad, polares e hidrofílicos, su principal vía de transporte es en el agua y el sedimento.

Su presencia en el ambiente y algunos seres vivos genera preocupación ante la evidencia de efectos perjudiciales para los organismos con los que están en contacto (5).

2.4.1.1.1. Fragancias

Un perfume o fragancia es una combinación de diferentes componentes aromáticos que originan un olor agradable.

Las fragancias están hechas de dos tipos de aceites esenciales, los naturales y los sintéticos. Las primeras se extraen de las flores, hierbas, especias, raíces, maderas, musgos, así como de otras partes de vegetales y animales. Los almizcles aromáticos sintéticos (producto de una reacción química en laboratorio) intentan imitar los olores de los aceites esenciales naturales, aportando nuevas características, lo que da una mayor diversidad de productos. Los almizcles más importantes son los policíclicos y nitro almizcles, pues son utilizados en el 95% de las fragancias en Europa.

2.4.1.1.2. Almizcles sintéticos

Los almizcles sintéticos son utilizados como aditivos de fragancias y compuestos fijadores en una gran variedad de productos de cuidado personal y productos para el hogar como detergentes, suavizantes de telas.

Debido al costo elevado de las fragancias naturales, se han desarrollado los almizcles sintéticos, dichos compuestos tienen propiedades semejantes a los naturales y el costo de producción es menor (7).

2.4.1.1.3. Clasificación de los almizcles

➤ Nitroalmizcles

Son compuestos químicos fragantes que se encuentran en productos para el hogar y cuidado personal. Se crearon para sustituir a los almizcles macrocíclicos naturales.

Son solubles en disolventes orgánicos, tienen un rango de coeficiente de octanol/agua (entre 4.3-4.9), por lo que se les considera lipofílicos y en consecuencia persistentes en tejido adiposo. Presentan alta estabilidad química, baja biodegradabilidad y alto potencial de bioacumulación. Algunos ejemplos de nitrocompuestos aromáticos son: el nitrobenzeno, naftaleno y los almizcles ambreta, cetona y xileno. Su producción hoy día, ha disminuido por su toxicidad (8).

➤ Policíclicos

Estos almizcles no se producen en la naturaleza, y no existe una relación química o estructural con los compuestos naturales de almizcle macrocíclico. Surgen de la necesidad de eliminar a los almizcles con grupo nitro, por el riesgo que implican para la salud, además tienen un bajo costo de producción, alta resistencia a la luz y medios alcalinos.

Tienen baja solubilidad en agua, además de coeficientes de reparto octanol / agua elevados (5.7-6.31). Su bioacumulación es mayor, por su bajo grado de degradación biológica y química en el medio ambiente. Debido a que presentan características similares a los nitroalmizcles, su estudio en diferentes matrices ambientales y biológicas ha incrementado (7). Se utilizan para aromatizar detergentes y perfumes, los más usados son: galaxolide y tonalide, aunque existen otros de menor uso como: pantolide, celestolide y traesolide.

➤ Macrocíclicos

Este grupo está conformado por almizcles sintéticos y naturales, por lo general son cetonas macrólidas (de origen animal), lactonas y bis-lactonas (origen vegetal). Sus principales características implican una producción fácil aunque de costo elevado, una mayor biodegradación e inestabilidad en relación a los dos grupos anteriores, a pesar de ser sintéticas, y es el grupo menos perjudicial para la salud y el medio ambiente (8).

2.4.1.2. Propiedades fisicoquímicas de algunos almizcles.

Tonalide

El nombre de IUPAC es: 6-acetil-1, 1, 2, 4, 4,7 hexametiltetralina.

Se identifica por otros sinónimos como Tonalide o AHTN.

CAS: 1506-02-1

Formula: C₁₈H₂₆O

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas del tonalide (9) .

Masa Molecular	258.40 g·mol ⁻¹
Densidad	600 g·mL ⁻¹
Punto de fusión	54.5 °C (52- 57)
Solubilidad	1.25 mg·L ⁻¹
Log K _{o/w}	5.7
Punto de ebullición	326 °C
Presión de vapor	5.12 x10 ⁻⁴ mm Hg

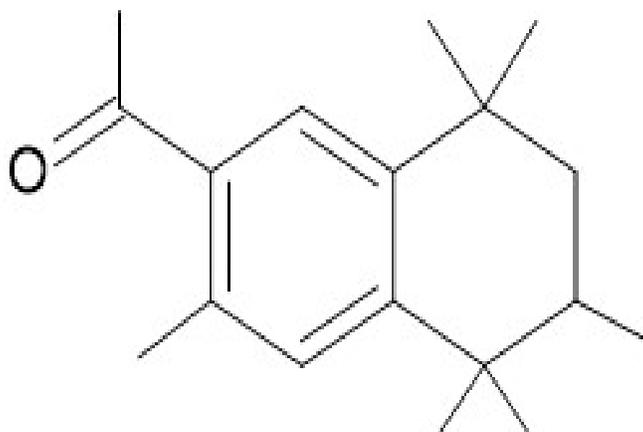


Figura 1. Estructura del tonalide.

Almizcles Cetona

El nombre de IUPAC es: 4-terc-butil- 2,6-dimetil-3,5-dinitroacetofenona.

Se identifica por otros sinónimos más extendidos como almizcle o almizcle cetona (MK).

Su número CAS: 81-14-1

Formula: C₁₄H₁₈N₂O₅

Es un sólido cristalino que se utiliza como ingrediente en fragancias. Generalmente se vende disuelto.

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas del almizcle cetona.

Masa Molecular	294.31 g·mol ⁻¹
Densidad	1.29 g·mL ⁻¹
Punto de fusión	135.5 °C (135-139)
Punto de inflamación	168 °C
Solubilidad	En agua, 0.4 mg·mL ⁻¹ a 20 °C, muy soluble en cloroformo
Log K _{o/w}	4.30
Presión de vapor	0.1 hPa, (0.1 mmHg) a 80 °C
Punto de ebullición	sin datos disponibles

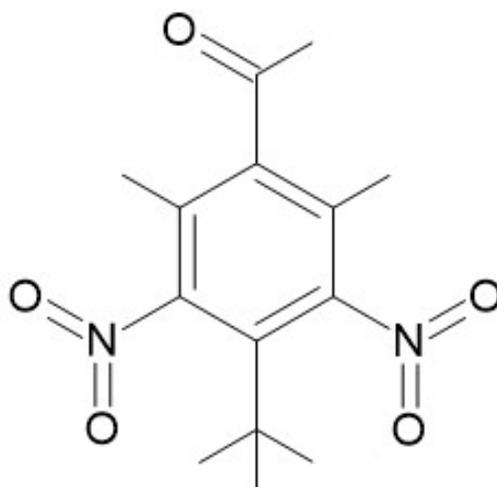


Figura 2. Estructura del almizcle cetona

2.4.2. Distribución de almizcles en el ambiente

Desde la década de 1980 se ha detectado la presencia de distintos almizcles en el medio ambiente y seres vivos, generando preocupación por la incidencia de estos compuestos.

Existen diferentes vías por las cuales llegan al ambiente, las principales son:

- Descarga de agua residual (doméstica, industrial, hospitalaria) en cuerpos de agua superficial
- Irrigación de suelos con agua tratada, residual o agua superficial potencialmente contaminada
- Lixiviación a través del suelo
- Uso de biosólidos en la agricultura.

Su presencia en el lodo indica ineficiencia por parte de las plantas de tratamiento para su eliminación, por lo cual, se incrementa el riesgo de exposición para los seres vivos y el ambiente.

Las concentraciones encontradas de almizcles en el lodo se consideran bajas ($\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$, $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), por tanto, el riesgo dependerá de la frecuencia de exposición (continua o discontinua); el impacto, puede ser perjudicial, mientras se expone de manera continua dado el desconocimiento de sus efectos, por lo cual se han creado líneas de investigación que estén enfocadas en la determinación de estas sustancias en diferentes matrices ambientales y biológicas, por el contrario, cuando discontinua el riesgo es mínimo (3, 7,10).

2.4.3. Almizcles sintéticos como disruptores endocrinos

Los disruptores endocrinos (EDs) son cualquier sustancia química (natural o sintética), contaminante ambiental, que una vez incorporado a un ser vivo pueden causarle efectos adversos al igual que a su descendencia (11).

Los estudios sobre almizcles nitro y policíclicos iniciaron aproximadamente hace 40 años. Galaxolide, tonalide, celestolide, almizcle cetona, almizcle xileno y almizcle ambreta son los más determinados en una amplia variedad de matrices como el agua residual, lodos residuales y animales (peces, invertebrados y roedores), demostrado su toxicidad y bioacumulación. El determinar estas sustancias en distintas matrices incrementa el desarrollo de nuevas metodologías para su detección y la información toxicológica (11).

Los almizcles (nitro y policíclicos) están catalogados como posibles disruptores endocrinos. Los disruptores endocrinos interfieren en el funcionamiento del sistema hormonal mediante alguno de estos tres mecanismos:

- Mimetizando a las hormonas naturales.
- Bloqueando la acción de hormonas naturales.
- Aumentando o disminuyendo los niveles de concentración en el organismo.

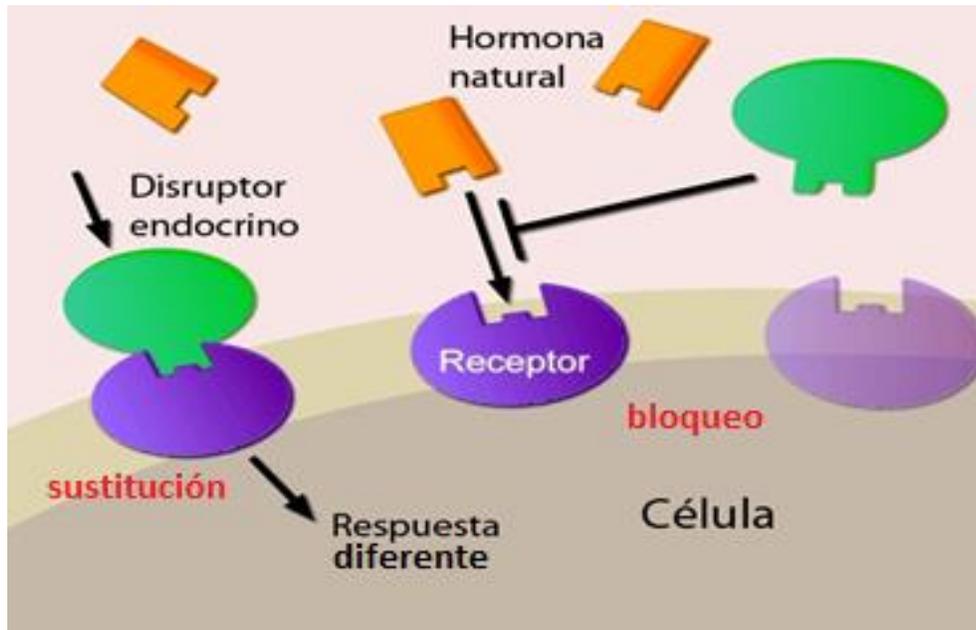


Figura 3. Representación del efecto que tienen los disruptores endocrinos en la célula.

De manera general, los efectos producidos en los seres vivos por los disruptores endocrinos son los siguientes:

- Modificación de los niveles hormonales
- Infertilidad
- Alteración de características sexuales
- Modificación del sistema inmunológico
- Criptorquidia (no descenso testicular)
- Diferentes tipos de cáncer
- Malformaciones en el aparato reproductor
- Alteraciones de la densidad y estructura ósea (11).

2.4.4. Riesgos ambientales y ecotoxicidad de almizcles sintéticos. (12-16)

La distribución en el ambiente de los almizcles resulta de interés debido a su presencia constante, la cual es resultado de su baja degradación en el ambiente, además de un uso y desecho continuos.

La eliminación incompleta durante el tratamiento de aguas y la descarga de estas y el lodo en las aguas receptoras (ríos, lagos, mares y océanos) implica un riesgo potencial para los organismos acuáticos y la salud pública.

Su toxicidad varía dependiendo del organismo, el tiempo de exposición y la concentración a la que se encuentren estos contaminantes. La exposición a niveles de traza (ng kg^{-1} , $\mu\text{g kg}^{-1}$, mg kg^{-1}) en etapas sensibles del desarrollo, permite explicar las anomalías descritas en los organismos expuestos.

Diversos estudios en el mundo proporcionan información sobre las concentraciones determinadas y los efectos de que generan estos compuestos en diferentes organismos (invertebrados, mamíferos y plantas) y matrices (ambientales y biológicas), lo que permite clasificar su riesgo ambiental.

Tabla 5. Ecotoxicidad reportada para tonalide y almizcle cetona (13-16)

sustancia	Matriz de estudio	Efectos encontrados	Referencia
Almizcle cetona	Pez cebra (Danario rerio)	Afecta a la reproducción provocando una reducción en la fecundación y el tiempo de supervivencia de la descendencia.	Carlsson et al., 2000
Almizcle Cetona	Roedores	Actúa como posible cogenotóxico en combinación con varios agentes carcinógenos. Aumento en el peso de hígado y riñones sin histopatología.	Shmeiser et al., 2001
Tonalide	Carpa (Cyprinus Carpio L.)	Anomalías morfológicas (curvatura de la columna vertebral, malformación del cráneo, edema visceral).	Tumov et al., 2014
Tonalide	Especies acuáticas nativas de China (peces, crustáceos, algas, etc.)	Afectaciones en la supervivencia y reproducción (efectos estrogénicos).	Li et al., 2020

2.4.5. Legislación de almizcles

El uso de algunos almizcles como el ambreta, tibetano y moscano ha sido prohibido en Europa debido a su toxicidad a largo plazo. Por el contrario, los almizcles cetona y xileno que se producen y utilizan en China e India con un uso regulado por la comisión científica de productos cosméticos y no alimentarios para el consumidor en la Directiva 2004/88/CE. En la Tabla 6 se especifican las regulaciones con respecto al uso de estos dos compuestos.

Tabla 6. Legislación del uso de nitro almizcles en Europa (17).

Sustancia	Ámbito de aplicación	Concentración máxima autorizada
Almizcle cetona	Todos los productos cosméticos excepto para higiene bucal.	1.4% Fragancia fina 0.56% Agua de colonia 0.042% demás productos
Almizcle xileno	Todos los productos cosméticos excepto para higiene bucal.	1.0% Fragancia fina 0.4% Agua de colonia 0.03% demás productos

Con respecto a los almizcles policíclicos pocas son las limitantes en cuanto a su uso y disponibilidad, una de ellas, establecida por el comité sobre productos cosméticos y no alimentarios, restringe el uso de tonalide a no más de un 12% en las fragancias (17).

En México existe un acuerdo en el que se incluyen las sustancias restringidas y prohibidas en la elaboración de productos de belleza y perfumería, en el cual no se encuentra ninguna restricción para el uso de tonalide. Por el contrario, para almizcle cetona se limita a las condiciones de uso y concentraciones máximas permitidas que se encuentran en la Tabla 7 (18).

Tabla 7. Concentraciones máximas permitidas de almizcle cetona para productos de perfumería y de belleza en México.

Sustancia	Concentración máxima permitida (%)
Almizcle cetona	1.4 en perfumes 0.56 en aguas de tocador 0.04 en otros productos

2.5. Métodos analíticos para la determinación de almizcles

La selección de la técnica instrumental es uno de los puntos fundamentales en la detección y cuantificación de analitos. Para ello se tienen que considerar varios

aspectos como la complejidad de la muestra, estado físico del analito y sus propiedades fisicoquímicas (19).

Técnicas como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas han favorecido el desarrollo de nuevos métodos analíticos de análisis en matrices de complejidad variada y, a su vez, permiten la detección de almizcles a niveles de trazas y ultra trazas ($\text{ng}\cdot\text{kg}^{-1}$, $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$).

El análisis de los compuestos de interés usualmente incluye 3 pasos:

- Extracción del analito
- Eliminación las impurezas e interferencias de la matriz
- Selección del instrumento adecuado para la detección

El pretratamiento de la muestra incluye varios pasos que son importantes para obtener datos confiables, estos pasos incluyen el muestreo, preparación de la muestra, su separación y el análisis de datos.

El muestreo es el primer paso en cualquier análisis químico. Es un proceso en el que se decide el sitio y condiciones para tomar la muestra, obteniendo una fracción representativa la cual se espera que refleje la composición del material total.

El siguiente paso es la preparación de muestra, esta suele ser la etapa que más tiempo requiere y la más importante debido a que la mayoría de los instrumentos analíticos no pueden procesar las muestras directamente y consiste en realizar la extracción, concentración, aislamiento del analito de interés y la reducción o eliminación de compuestos interferentes que afecten el análisis.

En un principio la cromatografía era una técnica exclusivamente de separación, al acoplarla con un dispositivo capaz de identificar especies químicas, se transformó en un instrumento de análisis que brinda mayor información para determinar (identificar y cuantificar) los compuestos que se van separando.

La evaluación estadística de los resultados da información con la cual se puede estimar la concentración de los analitos estudiados en la muestra, además, ayuda con la toma de decisiones importantes al considerar la coherencia de los resultados.

Para poder elegir el instrumento de análisis se deben tomar en cuenta varios aspectos de la muestra como el estado físico, su complejidad y características fisicoquímicas. Teniendo en cuenta esto, el muestreo y la preparación de la muestra son la parte más compleja del análisis. En la actualidad, existen instrumentos cromatográficos con la capacidad de separar y determinar los componentes de mezclas complejas, dentro de los más utilizados está la cromatografía de gases y cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (GC-MS y HPLC-MS).

La complejidad y la tardanza son aspectos a mejorar en la preparación de muestra de matrices complejas, por lo cual es de utilidad desarrollar técnicas de

microextracción que reduzcan el consumo de reactivos, disolventes, cantidad y manipulación de muestra y el tiempo con el que se llevan a cabo. Algunas técnicas que permiten cumplir con estos objetivos en matrices ambientales son la microextracción en fase sólida (SPME) y la extracción asistida por ultrasonidos (UAE) (19).

2.6. Microextracción en fase sólida (SPME). (20-21)

La microextracción en fase sólida se desarrolló en la década de 1990 como una técnica de extracción capaz de facilitar la preparación y análisis de muestras complejas. Se pueden realizar extracciones en líquidos, gases e incluso sólidos sin el uso de disolventes. Está constituida por una fibra retráctil de sílice fundida recubierta de una fase polimérica en la que se extraen los analitos.

La ventaja de la SPME es que no es indispensable el uso de disolventes orgánicos, los tiempos de preparación de muestra son menores, requiere una manipulación mínima de la muestra, además de combinar los procesos de extracción, concentración y limpieza de la muestra en un solo paso.

Es útil para el monitoreo de contaminantes orgánicos ambientales. La eficiencia en la extracción depende de los parámetros experimentales (recubrimiento de la fibra, tipo de extracción, pH, % de sal inerte, tiempo de extracción y cantidad de muestra) que involucran las propiedades de los analitos, la matriz de la muestra y la fase estacionaria que recubre la fibra, además, se debe tener cuidado con ciertas complicaciones (efecto matriz e interferentes) que se presentan al trabajar con matrices complejas.

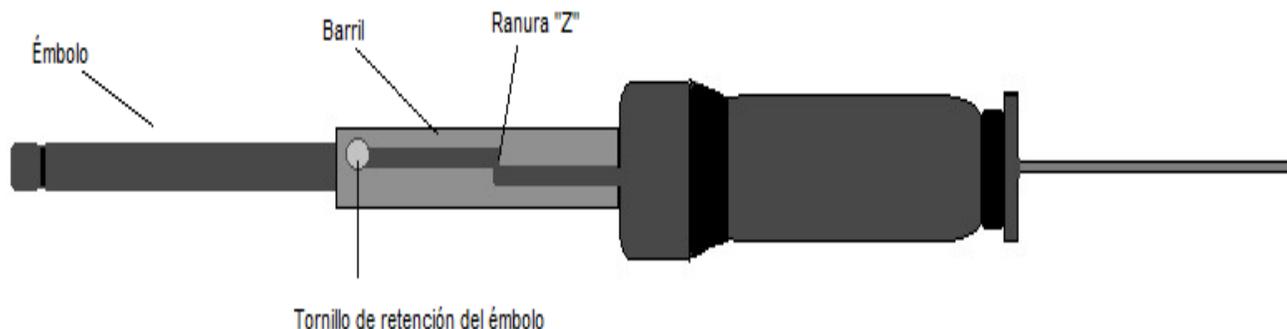


Figura 4. Dispositivo manual de SPME que contiene la fase extractora

2.6.1. Fibras de SPME

La selectividad en la extracción depende la fase polimérica que recubre la fibra de SPME, así como de su espesor. Una afinidad elevada por los analitos es esencial debido a la competencia que existe por ellos entre la fase y la muestra. El volumen del recubrimiento también influye en la sensibilidad del método, los recubrimientos más gruesos extraen una mayor cantidad de analito, aunque significan tiempos más largos de extracción.

2.6.2. Parámetros que afectan la SPME.

2.6.2.1. Matriz

Los diferentes tipos de matriz (sólida, líquida o gaseosa) y su complejidad (lodos residuales, fluidos biológicos, agua, vapores, etc.) presentan dificultades variadas, una de ellas, es el encontrar una gran cantidad de sustancias orgánicas e inorgánicas que tengan características similares a las del analito de interés, actuando como interferentes y afectando la selectividad.

2.6.2.2. Adición de una sal inerte

La adición de sales solubles (NaCl o KCl) provoca un aumento de la fuerza iónica, en la solución de la muestra, esto puede disminuir la solubilidad acuosa de los compuestos orgánicos, con lo cual se incrementan las constantes de distribución de los analitos entre la fase de extracción-muestra, aumentando así la eficacia y selectividad del proceso de extracción. El efecto de la adición de sal y la cantidad óptima, deben determinarse experimentalmente.

2.6.2.3. pH de la muestra

Regular el pH de la muestra, puede disminuir la solubilidad de los analitos, lo que mejora la volatilidad tanto de ácidos como de bases y la sensibilidad del método. Para los analitos ácidos la disminución en el pH mejora la eficiencia de extracción y en compuestos básicos es más adecuada a un pH elevado, sin embargo, debe determinarse experimentalmente.

2.6.2.4. Volumen de la muestra

La cantidad de analito extraído en la fase aumenta con el volumen de muestra, sin embargo, esto no ocurre cuando el producto del coeficiente de difusión (K_{es}) y el volumen de la fase extractora (V_e) es insignificante en comparación con el volumen de la muestra, si se cumple esta condición la preparación de la muestra no requiere

de un volumen de muestra definido, este suele ser el caso en muchos sitios y determinaciones in vivo.

2.6.2.5. Agitación de la muestra

La agitación durante la extracción influye en el desempeño del método, ya que favorece la difusión de los analitos que se encuentran en la matriz acuosa hasta la fibra, acelerando la cinética de extracción en la mayoría de las ocasiones. Este paso reduce el espesor de la capa límite que rodea la fase extractora, lo que implica tiempos más cortos de equilibrio.

2.6.2.6. Temperatura

Un cambio en la temperatura de extracción tiene varios efectos en SPME. Con un aumento de temperatura, los coeficientes de difusión, equilibrios de distribución ocurren más rápido mientras que las constantes de Henry aumentan, así mismo los coeficientes de partición para la fase de extracción disminuyen provocando que la transferencia de masa entre la fase extractora y la muestra sea más rápida, de la misma forma que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio es reducido. En este punto se debe tomar en cuenta que el incremento de la temperatura no representa una mejor extracción, debido a la disminución de los coeficientes de distribución para la fase de extracción-muestra, por lo cual la cantidad extraída de analito en el equilibrio disminuye.

2.6.2.7. Tiempo de extracción

La mejor sensibilidad en el proceso de extracción se alcanza en la llamada condición de equilibrio. Dicho tiempo de equilibrio depende de los coeficientes de distribución entre la matriz de la muestra-fase extractora, coeficiente de difusión del analito, el tipo de fase extractora y su grosor.

Para optimizar el tiempo de extracción se debe correlacionar la masa del analito extraído con respecto al tiempo.

2.6.3. Extracción de los analitos en SPME

El proceso de la microextracción se lleva a cabo en dos etapas: extracción y desorción

En la extracción se expone la fibra a la muestra contenida en un vial sellado para que se produzca la distribución de los analitos hacia la fibra durante un tiempo y

temperatura determinada. La extracción se puede llevar a cabo de dos formas: inmersión directa (DI-SPME) o en espacio cabeza (HS-SPME).

2.6.3.1. SPME en espacio cabeza (HS-SPME)

HS es la alternativa adecuada para extraer compuestos volátiles, semi-volátiles y de volatilidad elevada. La fibra se expone en el espacio libre (espacio cabeza) existente sobre la muestra durante un tiempo determinado, en el que los analitos pasaran de la muestra al espacio cabeza y después a la fibra. Posterior a la extracción, la fibra se retrae y se realiza la desorción de los analitos.

El volumen de HS en el vial debe ser lo mínimo posible para aumentar la concentración de los analitos en la fase gaseosa y, por tanto, que la transferencia de masa al recubrimiento de la fibra será mayor.

2.6.3.2. SPME por inmersión directa (DI-SPME)

Es adecuada para extraer compuestos de volatilidad media- baja. Consiste en sumergir la fibra directamente en la muestra (acuosa) durante un tiempo determinado para que se produzca la distribución de los analitos desde la matriz hacia la fibra. Después de la extracción, la fibra se retira y los analitos que están en la fase extractora, son removidos por desorción térmica o líquida.

Las muestras acuosas deben tener características químicas controladas que favorezcan la distribución de los analitos hacia la fase extractora. Para disminuir el deterioro de la fibra de SPME, se debe evitar su uso en matrices complejas, concentraciones elevadas de disolventes y reactivos previo a la extracción.

2.6.4. Desorción de los analitos en SPME

Para el análisis por cromatografía de gases (GC), el proceso de desorción implica introducir la fibra en el inyector del GC donde los analitos serán desorbidos térmicamente para su análisis.

A medida que aumenta la temperatura, disminuye la capacidad de la fibra para retener a los analitos. La temperatura del inyector debe ser de entre 20-30 °C por debajo del límite de temperatura de trabajo de la fibra y/o la columna de CG (generalmente de 200-280 °C). Además, el flujo constante de gas acarreador dentro del inyector de GC introduce los analitos a la columna. Normalmente, un tiempo de desorción de dos minutos es suficiente para desorber la mayoría de los analitos.

2.7. Extracción asistida por ultrasonido (UAE). (22-24)

Es una técnica de extracción y preparación de muestra en la que se utilizan ondas acústicas de alta frecuencia (20 kHz- 40 kHz) para disgregar una muestra sólida y extraer los compuestos.

Las ondas de sonido viajan a través del disolvente produciendo ciclos de expansión y compresión. En estos ciclos se provoca la formación de burbujas en el líquido, durante el proceso, estas crecen hasta que la burbuja implota (cavitación).

Por la cavitación, el disolvente es propulsado a altas velocidades generando una mayor penetración del mismo en los materiales sólidos, lo que facilita la transferencia de los analitos de la matriz al disolvente.

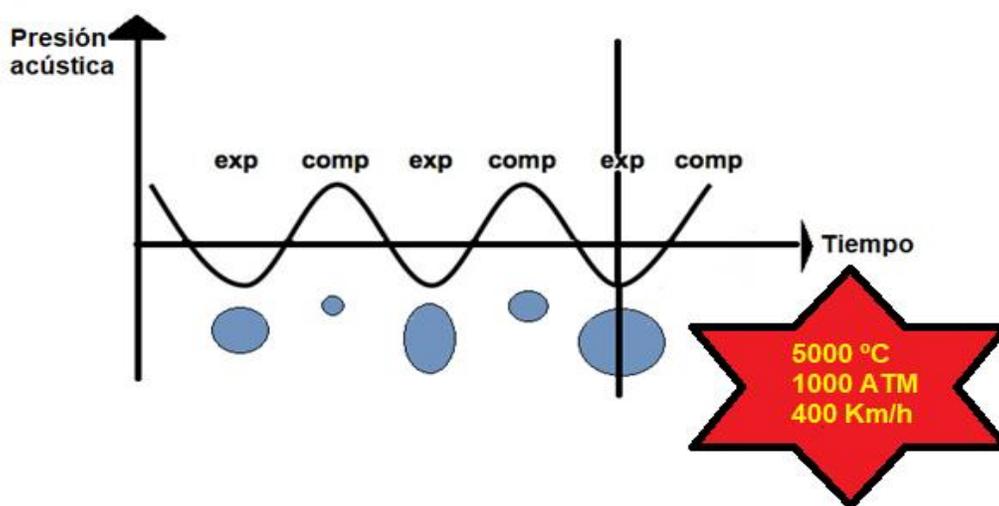


Figura 5. Fenómeno de cavitación en la extracción con ultrasonido.

2.7.1. Tipos de ultrasonido

Existen dos tipos de ultrasonido para su aplicación en preparación de muestra:

- UAE con baño ultrasónico
- UAE con sonda ultrasónica

El baño de ultrasonido permite la extracción de varias muestras, al mismo tiempo, de una manera eficiente. Su uso es más frecuente cuando el tiempo de extracción es corto. La aplicación en un material sólido suspendido en un disolvente requiere la optimización previa de varios factores: cantidad de muestra, tipo de disolvente, tiempo de extracción y temperatura.

La sonda ultrasónica ha demostrado ser más eficiente que el baño de ultrasonido en la extracción de analitos para matrices sólidas, ya que la proyección de la onda

ultrasónica es unidireccional, sin embargo, es probable que se presente una degradación del analito empleando este tipo de ultrasonido.

2.7.2. Parámetros que afectan en la extracción por ultrasonido

- Frecuencia

Con frecuencias de sonicación altas (MHz), la producción de burbujas de cavitación se torna más complicada que con frecuencias bajas (kHz).

- Disolvente

Debido a que la presión negativa en el ciclo de expansión-compresión, se deben superar las fuerzas cohesivas naturales que actúan en el líquido, cualquier aumento de tales fuerzas disminuirá la cavitación. La viscosidad y tensión superficial son propiedades que pueden aumentar estas fuerzas, por lo cual, la reducción en la viscosidad del disolvente y una baja tensión superficial favorecen la cavitación en la solución.

- Temperatura

La cavitación aumenta con la disminución de la temperatura de la solución. Esto se debe a que, cuando la temperatura del disolvente aumenta también lo hace su presión de vapor y, por lo tanto, una mayor cantidad de solvente, en forma de vapor, termina en las burbujas, actuando como una barrera de transmisión del sonido anulando su efectividad. En caso de compuestos volátiles con altas presiones de vapor, pueden perderse a través de la evaporación.

- Cantidad de muestra

Se debe determinar con base en la concentración de los analitos en la matriz. Al tener una muestra de mayor tamaño se puede facilitar la detección de los analitos al igual que de interferentes, en este punto, se recomienda usar un tamaño de muestra representativo capaz de ser manipulado fácilmente.

- Volumen de disolvente

Debe ser adecuado con el fin de tener una extracción eficiente del compuesto, emplear volúmenes fuera de lo óptimo no incrementa la recuperación, e incluso, bajo estas condiciones es capaz de reducir la concentración del analito provocando una disminución en la sensibilidad del método y un consumo innecesario del solvente.

- Intensidad

Para alcanzar el umbral de cavitación se requiere una intensidad mínima. Esto significa que no siempre son necesarias amplitudes más altas para obtener los resultados deseados. Además, amplitudes altas de sonicación pueden provocar una

agitación de la disolución en lugar de la cavitación y una mala transmisión del ultrasonido a través del medio líquido. Por otro lado, la amplitud debe aumentarse cuando se trabaja con muestras de alta viscosidad, como sangre. Esto se debe a que a medida que aumenta la viscosidad de la muestra, también aumenta la resistencia de la muestra al movimiento de las ondas ultrasónicas.

2.8. Cromatografía de gases - espectrometría de masas (GC-MS). (25)

La cromatografía de gases (GC) es una técnica de separación en la que la muestra en forma gaseosa se distribuye entre dos fases; una estacionaria (sólida o líquida) y una móvil (gas acarreador). Existen múltiples aplicaciones de la GC, pero en todas, las muestras deben ser volátiles o semi-volátiles y termoestables para poder separar sus componentes, debido a que la separación depende de la presión de vapor y la afinidad de los analitos por la fase estacionaria.

La espectrometría de masas (MS) es una técnica analítica, en la cual se utilizan métodos eléctricos, químicos o de radiación para ionizar y fragmentar una molécula. Después, los iones fragmento resultantes se separan mediante campos eléctricos o magnéticos y son tabulados con base en su relación de masa y carga (m/z).

El GC-MS es un instrumento que tiene la capacidad para separar, identificar y cuantificar una amplia variedad de compuestos. Consiste en la unión de un cromatógrafo de gases con un espectrómetro de masas por medio de una línea de transferencia a alta temperatura. Cuando la muestra se inyecta en el cromatógrafo se vaporiza en el inyector y se separa en la columna, el efluente que sale de la columna es ionizado y fragmentado por un bombardeo de electrones en la cámara de ionización (70 eV), los iones son acelerados y dirigidos hacia el analizador másico en donde son separados en función de su relación m/z .

En GC-MS los analitos pueden ser ionizados térmicamente, por campos eléctricos, impacto de electrones, iones o fotones. La electroionización (EI) es uno de los métodos más comunes para ionizar a los compuestos, generando una gran cantidad de iones fragmento característicos que permiten una identificación casi inequívoca de los analitos. Consiste en que un haz de electrones producido por un filamento caliente interactúe con las moléculas de la muestra para dar una mezcla de iones que serán propulsados al analizador másico, generalmente un cuadrupolo, el cual consiste en cuatro barras metálicas colocadas de forma paralela a las cuales se les aplica un voltaje constante y una radiofrecuencia oscilante que genera un campo eléctrico y produce variaciones en las trayectorias de los iones dependiendo de su relación m/z , y así, obtener información que permita establecer una estructura, además, con sus abundancias relativas dar identidad a los compuestos.

La identificación de los iones generados en el MS puede ser de dos formas: por barrido total de iones (SCAN) o monitoreo selectivo de iones (SIM). En SCAN se detectan todos los iones en un intervalo de m/z seleccionado y la identificación se

efectúa comparando el tiempo de retención de un estándar de referencia y el patrón de fragmentación. Para SIM solo se registran las relaciones m/z más prominentes del compuesto en un rango de tiempo seleccionado, lo cual evita determinaciones erróneas por la presencia de compuestos denominados interferentes, dando mayor selectividad y sensibilidad al análisis. En cuanto a la cuantificación para ambos métodos se debe correlacionar la respuesta analítica obtenida de la integración del área del pico cromatográfico o de la medición de la abundancia relativa de los iones fragmento diagnóstico en función de la concentración, para ello se utilizan concentraciones estándar de concentración conocida.

En la determinación de contaminantes, la GC-MS representa una técnica de análisis útil, ya que, permite separar, identificar y cuantificar de manera simultánea una gran cantidad de compuestos en muestras complejas con una gran selectividad y sensibilidad ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ - $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

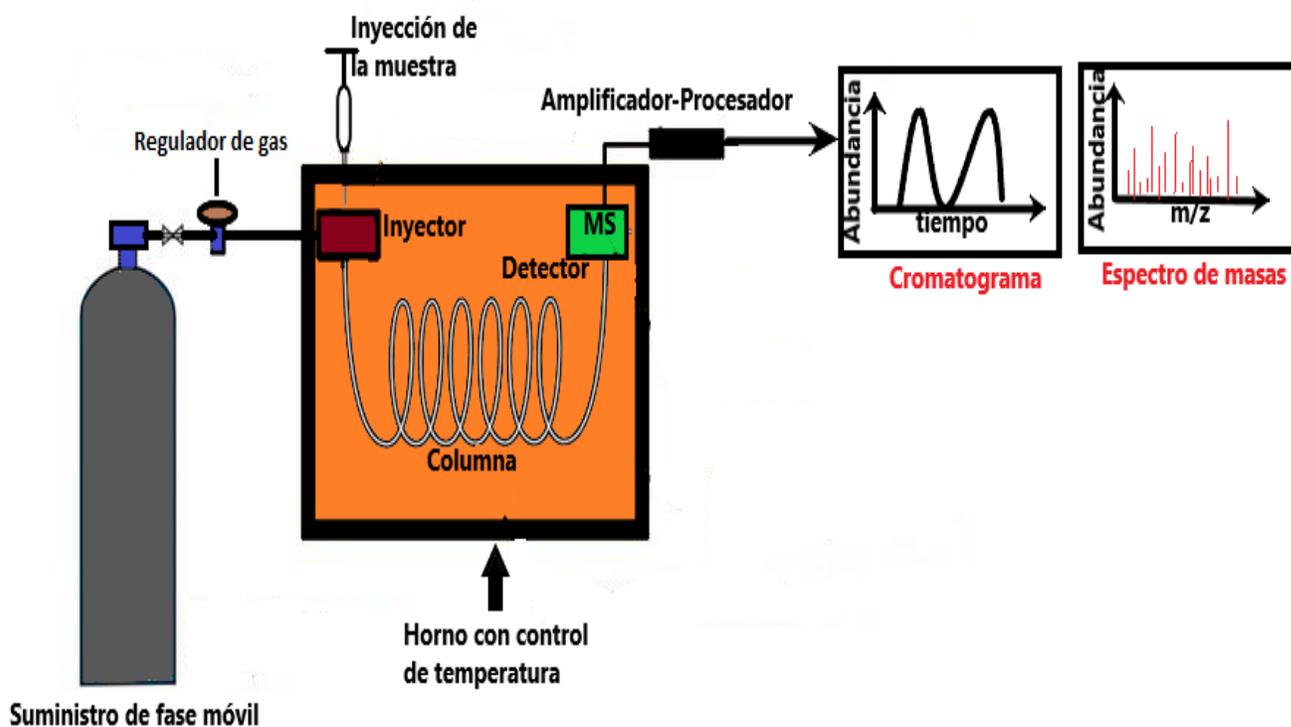


Figura 6. Esquema de equipo de CG-MS.

3. Objetivos

3.1. Objetivo general

Desarrollar un método para la determinación de tonalide y almizcle cetona en muestras de lodo activado.

3.2. Objetivos particulares

1. Aplicar la metodología a una muestra de lodo activado de la planta de tratamiento de aguas residuales del Cerro de la Estrella.

4. Justificación

Existe la necesidad de desarrollar nuevos procedimientos analíticos que sean rápidos, sensibles, ecológicos y económicos, que permitan la determinación de tonalide y almizcle cetona en diferentes matrices ambientales a diferentes niveles de concentración. Por lo que esta investigación busca contribuir con una nueva metodología para su determinación en muestras de lodo activado.

5. Hipótesis

El método que se desarrollará basado en la extracción asistida con ultrasonido (UAE) y microextracción en fase sólida (SPME), seguido del análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), permitirá determinar de manera más eficaz y eficiente los almizcles sintéticos (tonalide y almizcle cetona) en lodo activado.

6. Desarrollo experimental

6.1. Materiales y reactivos

Reactivos

- Tonalide $\geq 97\%$ Sigma- Aldrich (100 mg)
- Almicle cetona $\geq 98\%$ Sigma- Aldrich ($100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).
- Cloruro de sodio
- Ácido clorhídrico (37 %)
- Acetonitrilo $\geq 99\%$, Tecsiquim
- Acetona $\geq 99\%$ B&J
- Diclorometano anhidro, $\geq 99.8\%$, Sigma-Aldrich (USA)
- Agua tipo I (Mili-Q).
- Agua tipo II (destilada)
- Metanol $\geq 99.8\%$ ACS

Material

- Jeringa Hamilton de 10 μL .
- Matraz volumétrico de 10,0 mL marca PYREX
- Pipetas Pasteur de tallo largo
- Vasos de precipitados de 10, 50 y 100 mL
- Viales ámbar de 10 mL
- Viales de vidrio transparente de 10 mL y septas de PTFE (teflón) / silicón
- Tapas de aluminio de 20 mm x 8 mm, Supelco (USA)
- Jeringas de plástico BD Plastipak (3.0 mL).
- Termómetro de mercurio (-20 °C a 100 °C), LAUKA.
- Filtros para jeringa de PTFE (teflón), Titan 3 de 0.45 μm

6.1.1. Limpieza del material de vidrio

El material de vidrio se lavó con jabón neutro y se enjuago con agua del grifo. Posteriormente se metió en un baño de ultrasonido con agua destilada durante 15 minutos. Se dejaron escurrir los viales y después se envolvieron en papel aluminio para introducirlos en una mufla durante una hora a 350 °C.

El material volumétrico solamente se lavó con la misma espuma del jabón y se enjuagó con agua destilada para posteriormente dejarlo escurriendo.

6.2. Instrumentación y equipos

- Fibra para microextracción en fase sólida de polidimetilsiloxano (PDMS) de 100 μm , SUPELCO (Bellefonte, USA)
- Balanza analítica, OHAUS (10 mg – 200 mg)
- Ultrasonido, Branson
- Parrilla de agitación magnética con control de temperatura, Thermolyne
- Soporte manual para fibras de SPME, SUPELCO
- Micropipeta de 100 – 1000 μL Biohit Proline
- Micropipeta de 1 – 10 mL Biohit Proline

6.3. Condiciones del análisis cromatográfico

El análisis se realizó con un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890 N acoplado a un detector selectivo de masas Hewlett Packard 5973. Usando, como gas acarreador helio a flujo constante de 1 mL \cdot min⁻¹ y el inyector se usó en modo splitless (2 min) a 250 °C. La separación se llevó a cabo en una columna capilar HP-5MS-UI (5 %-fenil)-metilpolisiloxano (30 m x 0.25 mm d.i. x 0.25 μm de fase estacionaria), el programa de temperatura fue 50 °C, 10 °C min⁻¹ hasta 240 °C (2 min), 30 °C min⁻¹ hasta 300 °C (5 min). La línea de transferencia entre el cromatógrafo y el detector de masas se mantuvo en 280 °C, la temperatura del cuadrupolo y fuente de ionización fueron de 150 y 230 °C respectivamente.

6.4. Muestra de lodo activado

La muestra de lodo se obtuvo de la planta de tratamiento de Cerro de la Estrella, ubicada en Av. San Lorenzo 312, San Juan Xalpa, Iztapalapa, 09850, (19°20'19.65" N, 99°04'42.44" O), Ciudad de México.

La muestra se almacenó en un recipiente de plástico, el cual se guardó en una hielera para su traslado. Para su almacenamiento en el laboratorio, el lodo se transfirió a frascos de vidrio ámbar para su refrigeración a 4 °C.

6.4.1. Tratamiento previo de la muestra

El lodo se liofilizó a -20 °C durante 24 h, se tamizó en malla 80/100 y se almacenó en frascos de vidrio ámbar a temperatura ambiente. El sedimento se fortificó con los analitos en porciones de 1.0 g para optimizar la extracción por UAE.

6.5. Identificación de Tonalide y Almizcle cetona por GC-MS

Se inyectó 1 μL de tonalide (2.5 ppm) en acetona y 1 μL de almizcle cetona (5ppm) en acetonitrilo en el cromatógrafo de gases. Se obtuvo el tiempo de retención y respectivo espectro de masas por barrido total de iones (SCAN) en un intervalo de m/z de 50 a 500 uma.

6.6. Estudio de la temperatura del inyector y tiempo de splitless

Se realizó un estudio de la temperatura del inyector y el tiempo de splitless para establecer las condiciones en las que se obtuviera una mayor abundancia y mejor señal cromatográfica de los analitos.

Para el tonalide, el análisis de la temperatura del inyector se realizó con tres diferentes temperaturas (100, 160 y 210 °C) y para el nitro almizcle (almizcle cetona) también se evaluaron tres temperaturas (160, 210, 250 °C).

La evaluación correspondiente a la duración del tiempo de splitless se realizó en dos y cuatro minutos para los analitos. El análisis de este estudio se realizó con el mismo programa de temperatura con el cual se identificaron los almizcles.

6.7. UAE de tonalide y almizcle cetona en lodo activado.

Para la extracción de los almizcles en lodo fortificado se evaluaron las siguientes variables: tipo de disolvente y tiempo de extracción con baño de ultrasonido.

6.7.1. Fortificación del lodo liofilizado

Para fortificar, se pesó 1 g de lodo liofilizado en un vaso de precipitados de 50 mL y se le distribuyó en forma de goteo 1.0 mL de cada analito con la micropipeta. Después, se cubrió el vaso con papel aluminio perforado, que permitió la evaporación del disolvente, así mismo, durante esta etapa se revolvió el lodo para homogenizarlo.

6.7.2. Selección del disolvente de extracción para la UAE

Tabla 8. Proporción de disolventes usados para evaluar la extracción

Disolvente	Proporción
Acetonitrilo	1
Acetona	1
Diclorometano	1
Acetonitrilo /Acetona	1:1
Acetonitrilo/ Diclorometano	1:1
Acetona/ Diclorometano	1:1
Acetonitrilo/Acetona/ Diclorometano	1:1:1

Para cada extracción, se acondicionó una jeringa y un filtro de membrana con el disolvente correspondiente. A cada vial se transfirió una muestra de 100 mg de lodo y se le adicionó 1.0 mL del disolvente, evitando la suspensión no controlada del lodo. Con el vial cerrado, se realizó la UAE a temperatura ambiente durante 30 s; el extracto se mantuvo estático para inducir la sedimentación y así extraer el

sobrenadante con la jeringa a la cual, posteriormente se le colocó el filtro de membrana y se filtró el extracto en un vial. Dicho procedimiento se aplicó para ambos analitos con cada disolvente de extracción. En la Tabla 8 se especifican los disolventes de extracción utilizados.

El extracto filtrado se analizó por GC-MS y se obtuvo el área correspondiente a la cantidad de analito extraída, cada análisis de disolvente se realizó por duplicado (n=2).

Con la información obtenida, se realizó la optimización del disolvente, usando aquellos con los que se obtuvo una mayor extracción de cada analito, además de una mezcla intermedia de estos disolventes para realizar dicho análisis.

6.7.3. Extracción con metanol

Adicionalmente, se realizó el estudio de extracción de los analitos con metanol. El procedimiento fue el siguiente:

Se pesaron 100 mg de lodo fortificado en un vial. Con una jeringa se le agregó 1.0 mL de metanol, posteriormente se introdujo el vial al baño ultrasónico durante 30 s y después de sedimentar se extrajo el sobrenadante con la jeringa. El extracto se filtró en un vial y finalmente se inyectó 1,0 μL del extracto para su análisis por GC-MS.

6.7.4. Evaluación de la retención de los analitos en el filtrado (membrana de teflón).

Al filtrar el extracto, los analitos se pueden retener de manera no selectiva en el filtro, por lo que se evaluó dicho efecto utilizando y reutilizando los filtros de membrana en presencia y ausencia del lodo activado.

Para tonalide:

Utilizando las membranas correspondientes a la extracción con AcCN/CH₂Cl₂ 1:1 (V/V) y una nueva, se filtró 1.0 mL del estándar de tonalide (250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en cada una. Posteriormente se analizaron los extractos obtenidos por GC-MS y se compararon sus respuestas cromatográficas con la obtenida del estándar sin filtrar.

Para almizcle cetona:

Se utilizaron las membranas correspondientes a la extracción con AcCN y una nueva, en ambas se filtró 1.0 mL del estándar de almizcle cetona (1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Después se analizaron los extractos mediante GC-MS y se compararon las respuestas cromatográficas con la obtenida del estándar sin filtrar.

6.7.5. Tiempo de extracción con ultrasonido

Para establecer el tiempo de extracción en la UAE, se estudió su eficacia a 30, 50 y 80 s. El procedimiento fue el siguiente:

Se pesaron 100 mg de lodo fortificado en los viales y a cada uno se le adiciono 1 mL de metanol para después realizar la UAE durante el tiempo evaluado (n=3). Con la jeringa se extrajo el sobrenadante y se filtró en un vial, posteriormente se inyectó 1.0 µL de cada extracto para su análisis por GC-MS.

6.8. Extracción del lodo por UAE

100 mg de lodo se colocan en un vial de 8 mL y se agrega 1.0 mL de metanol; la extracción por ultrasonido se realiza durante 30 s y el extracto final se filtra a través de una membrana de teflón de 0.45 µm. 1.0 mL del eluato se transfiere a un matraz de 100.0 mL y se lleva al aforo con agua Mili-Q.

6.9. Variables que afectan la extracción de los analitos con SPME

Se evaluó el tipo de fibra, el efecto por la adición de una sal inerte (NaCl), temperatura de extracción y el efecto del pH.

6.9.1. Selección de la fase polimérica de extracción

El primer paso en el desarrollo de un método por SPME es la selección de la fibra de extracción, por lo cual se evaluó la extracción de los analitos con las fibras de PDMS (polidimetilsiloxano) y PDMS/DVB (polidimetilsiloxano divinilbenceno) bajo las mismas condiciones de extracción.

6.9.2. Efecto de una sal inerte (NaCl)

El agregar sales solubles aumenta la fuerza iónica de la disolución y puede favorecer la extracción de los analitos en la fibra de SPME. Con base en esto se estudió la influencia del NaCl en la extracción de los analitos con 30 % (36 g de NaCl/ 100 mL) para cada 10 mL de disolución estándar.

6.9.3. Efecto de la temperatura

Aumentar la temperatura puede favorecer la transferencia de masa a la fibra y reducir el tiempo de extracción, o generar un efecto opuesto. Debido a esto, se evaluó la extracción a temperatura ambiente (25 °C) y con un baño de agua a 40 °C.

6.9.4. Estudio del efecto del pH

El ajuste de pH se realizó con ácido clorhídrico al 37 %, realizando las diluciones correspondientes hasta un pH=3 en disolución.

6.10. Condiciones seleccionadas para el análisis de una disolución estándar de tonalide y almizcle cetona por SPME.

En un vial de 15 mL se colocó una alícuota de 10.0 mL de una disolución estándar de los analitos (1 % de disolvente orgánico), posteriormente se introdujo en un baño de agua a 40 °C con agitación constante, para realizar la extracción con la fibra de PDMS (100 µm) por inmersión directa durante 30 min.

El análisis se llevó a cabo con la desorción de los analitos exponiendo la fibra en el inyector del CG-MS a 250 °C durante 3 min. En la figura 6 se muestra un es quema del sistema de extracción utilizado de SPME.

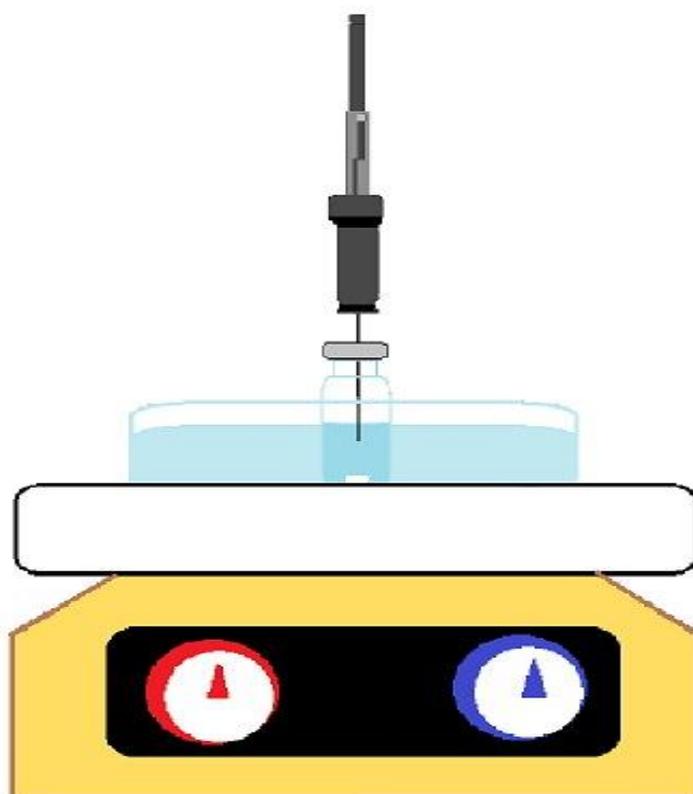


Figura 7. Sistema de extracción para SPME en las condiciones seleccionadas

6.11. Análisis de tonalide y almizcle cetona por SPME-GC-MS.

6.11.1. Límites de cuantificación y detección

Los límites de detección y cuantificación se determinaron con una disolución estándar de los analitos, cuya respuesta fue de 3 y 10 veces la relación señal/ruido respectivamente.

6.11.2. Curva de calibración para tonalide y almizcle cetona.

Con una disolución madre de 12.6 ppb, se preparó una curva de calibración de 6 puntos (n=3) en un intervalo de 0.5 a 5 ppb. El punto inicial de la curva correspondió al límite de cuantificación de los analitos (0.5 ppb). Las disoluciones estándar se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Estándares para la curva de calibración de tonalide y almizcle cetona

Estándar	Concentración (ppb)	Disolución madre (mL)	Volumen de aforo (mL)
1	0.5	2.0	50
2	1.4	5.6	50
3	2.3	9.2	50
4	3.2	12.8	50
5	4.1	16.4	50
6	5.0	20.0	50

6.12. Análisis de lodo activado de la planta de tratamiento de Cerro de la Estrella, Iztapalapa, CDMX.

6.12.1. Blanco de reactivos

Para establecer la ausencia de los analitos en la metodología, se preparó una disolución de agua Mili-Q al 1 % de metanol y se analizó bajo las condiciones descritas en el apartado 6.10.

6.12.2. Blanco de lodo activado

Se realizó el análisis de una muestra de lodo liofilizado, utilizando el procedimiento de extracción descrito en el apartado 6.8.

Después se agregó 1.0 mL del extracto filtrado en un matraz de 100.0 mL y se llevó al aforo con agua Mili-Q. Se tomaron 10.0 mL de esta disolución y se hizo el análisis con las condiciones establecidas en el apartado 6.9.

6.12.3. Determinación de Tonalide y Almizcle cetona en una muestra de lodo fortificado

Se realizó la extracción del lodo fortificado y con el extracto se preparó una disolución con una concentración aproximada de 1 ppb. La extracción y el análisis del lodo fortificado se realizaron bajo las condiciones descritas en los apartados 6.8 y 6.9 respectivamente.

7. Resultados y discusión

7.1. Identificación de Tonalide y Almizcle cetona por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS)

Las fragancias estudiadas se identificaron por barrido total de iones (SCAN) para obtener los espectros de masas correspondientes. La Figura 8 muestra el cromatograma por SCAN del análisis de una disolución estándar de tonalide a 2.5 ppm en acetona cuya señal cromatográfica se identificó en un tiempo de 17.28 min.

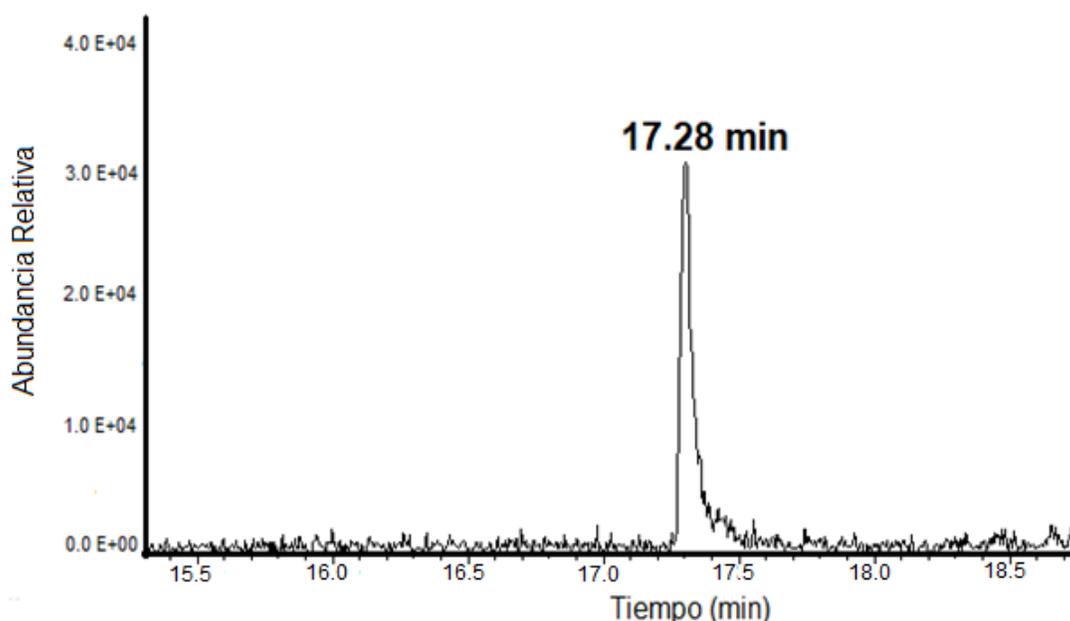


Figura 8. Cromatograma por barrido total de iones (SCAN) de tonalide a 2.5 ppm.

Se obtuvo el espectro de masas del tonalide y los iones con mayor abundancia fueron las relaciones de m/z 243 y 258. En la Figura 9 se muestra el espectro de masas de tonalide cuyo ion molecular se observa a una m/z 258. El ion fragmento de m/z 243 corresponde al pico base y se puede atribuir a la pérdida de un grupo metilo ($[M-15]^+$), predominantemente el del C-1 para dar lugar a la formación del ion acilo. Los iones fragmento diagnóstico para el tonalide fueron las m/z 243 y 258.

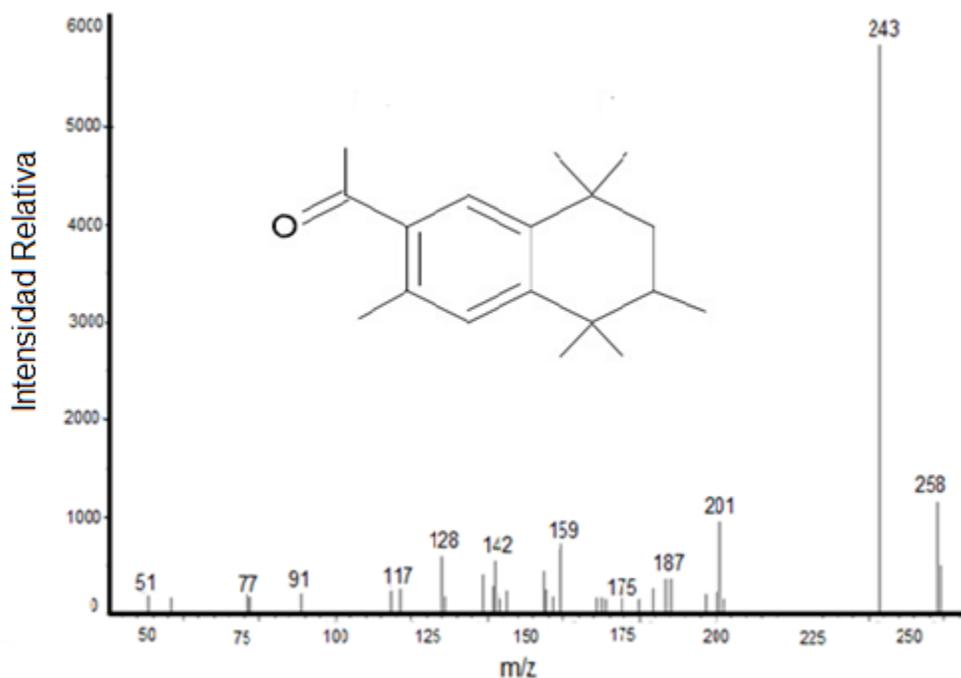


Figura 9. Espectro de masas de tonalide

El pico cromatográfico correspondiente al almizcle cetona se identificó a un tiempo de retención de 18.56 min. La Figura 10 muestra el cromatograma del análisis de una disolución estándar de almizcle cetona en acetonitrilo a 5 ppm.

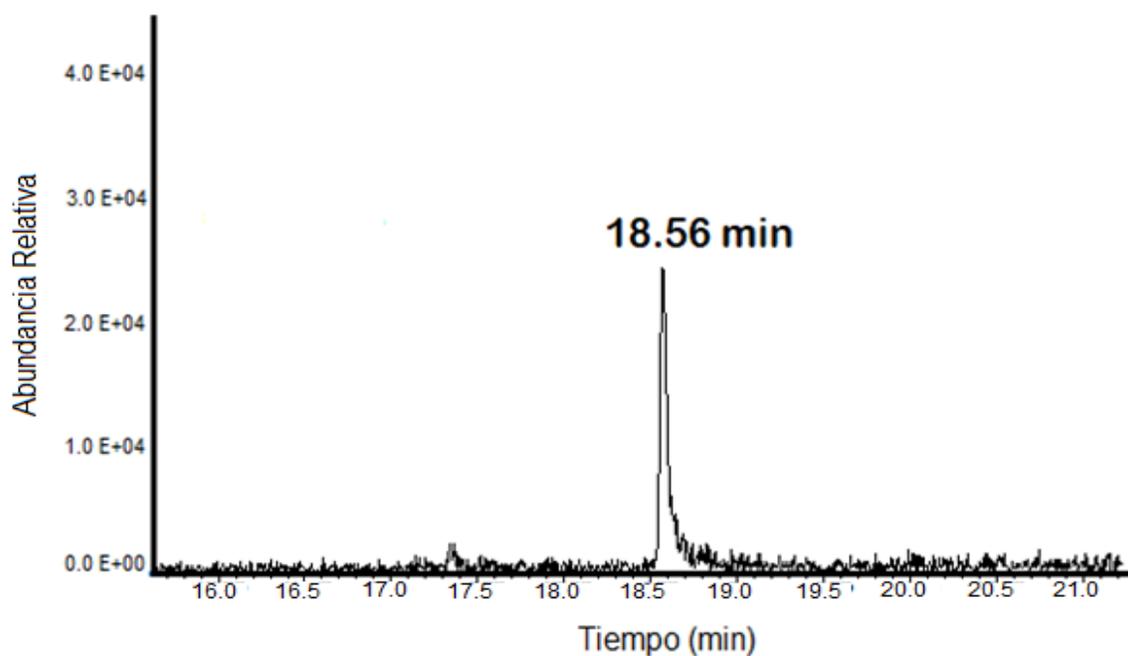


Figura 10. Cromatograma por barrido total de iones (SCAN) de almizcle cetona a 5 ppm.

Se obtuvo el espectro de masas del almizcle cetona y se identificaron los iones fragmento característicos. Los iones con mayor abundancia fueron las relaciones m/z : 279 y 294.

En la Figura 11 se muestra el espectro de masas de almizcle cetona cuyo ion molecular se observó en m/z 294. El ion que representa el pico base para el almizcle cetona es el que tiene m/z 43, sin embargo, este no se observa debido a que el intervalo de m/z en el que se trabajó fue de 50 a 550, este ion representa la formación del ion acilo ($C_2H_3O^+$) del C-1. Por su parte el ion acilo puede fragmentar de nuevo para dar una pérdida de CO, originándose el ion CH_3^+ , que establece la pérdida de un metilo ($[M-15]^+$), en este caso representado por el ion con m/z 279. Los iones fragmento diagnóstico para el almizcle cetona fueron los picos de m/z 279 y 294.

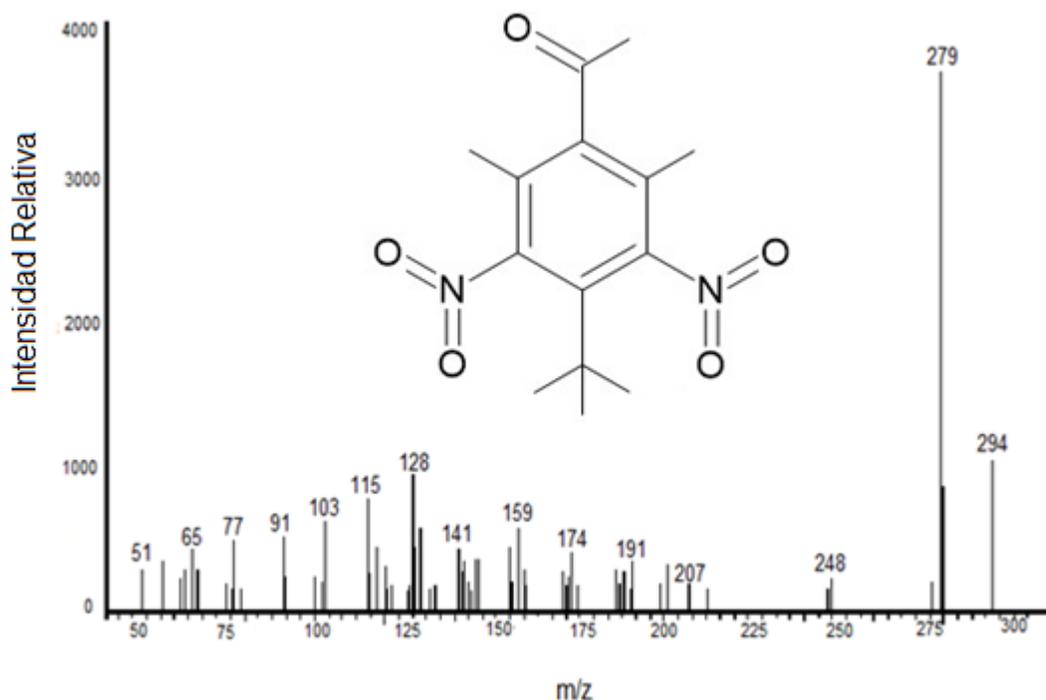


Figura 11. Espectro de masas de almizcle cetona

7.2. Estudio de la temperatura del inyector y el tiempo de splitless para la identificación de Tonalide y Almizcle cetona

Para el análisis de tonalide, se evaluó la temperatura del inyector (100, 160 y 210 °C) y el tiempo de splitless (2 y 4 min). La mayor respuesta cromatográfica del tonalide se obtuvo a una temperatura de 160 °C y 4 min de splitless, sin embargo, 2 min fueron adecuados para transferir al analito hacia la columna, ya que con 4 min la respuesta cromatográfica aumentó aproximadamente 6 % en comparación con 2 min de splitless.

Por lo anterior, los análisis posteriores se realizaron con una temperatura del inyector de 160 °C y 2 min en splitless.

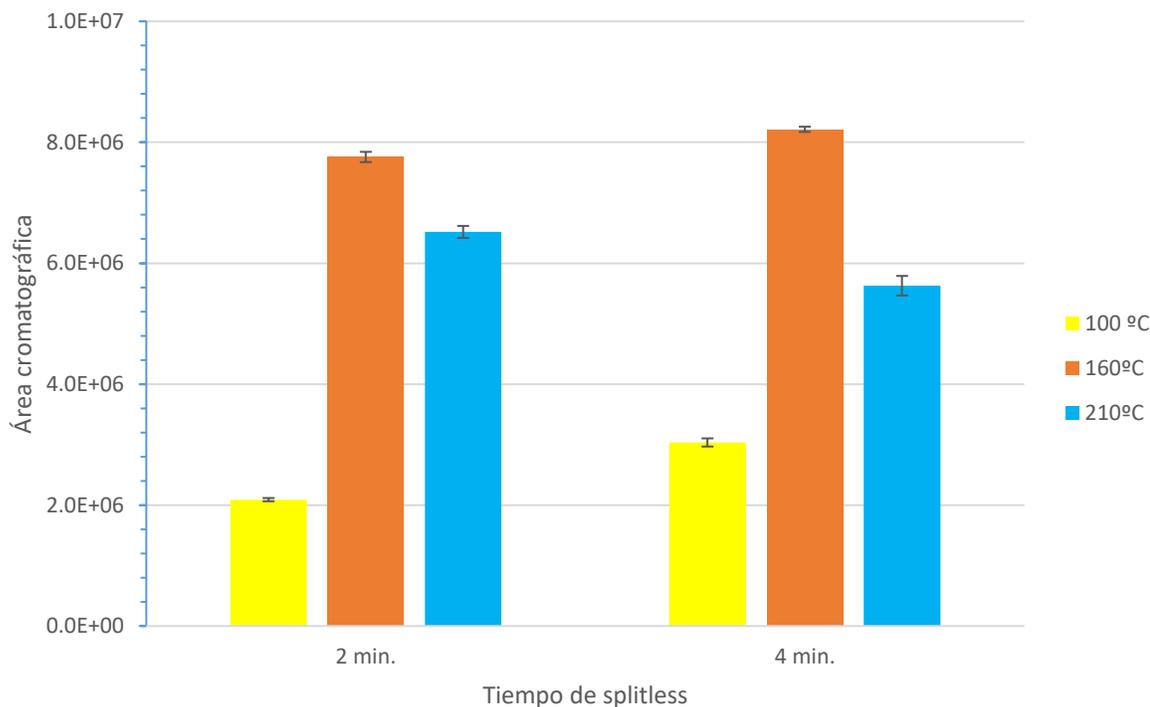


Gráfico 1. Estudio de la temperatura del inyector (por inyección directa) y tiempo de splitless para tonalide.

Los resultados, correspondientes a la variación de temperatura del inyector, mostraron que a 100 °C la respuesta analítica es baja, probablemente por una falta de volatilización de la muestra, y que a 210 °C también disminuyó, en este caso, debido a una posible descomposición térmica del analito. Siendo 160 °C la temperatura en la cual se volatilizó la mayor cantidad de la muestra, sin su descomposición, dando una mayor respuesta del analito.

El hecho de que la respuesta analítica con 4 min de splitless no sea del doble que la de 2 min, se puede atribuir a que la mayor cantidad de analito vaporizado pasa a la columna en ese lapso.

Para el almizcle cetona, también se estudió la temperatura del inyector (160, 210 y 250 °C). En este caso se tomó un rango más alto de temperaturas debido al mayor peso molecular del compuesto, y de igual manera se evaluó el tiempo de splitless (2 y 4 min.). En el Gráfico 2, se observa que la mayor respuesta se obtuvo a 160 °C y 2 min de splitless, por lo que de igual manera que con el tonalide los análisis posteriores se realizaron en estas condiciones.

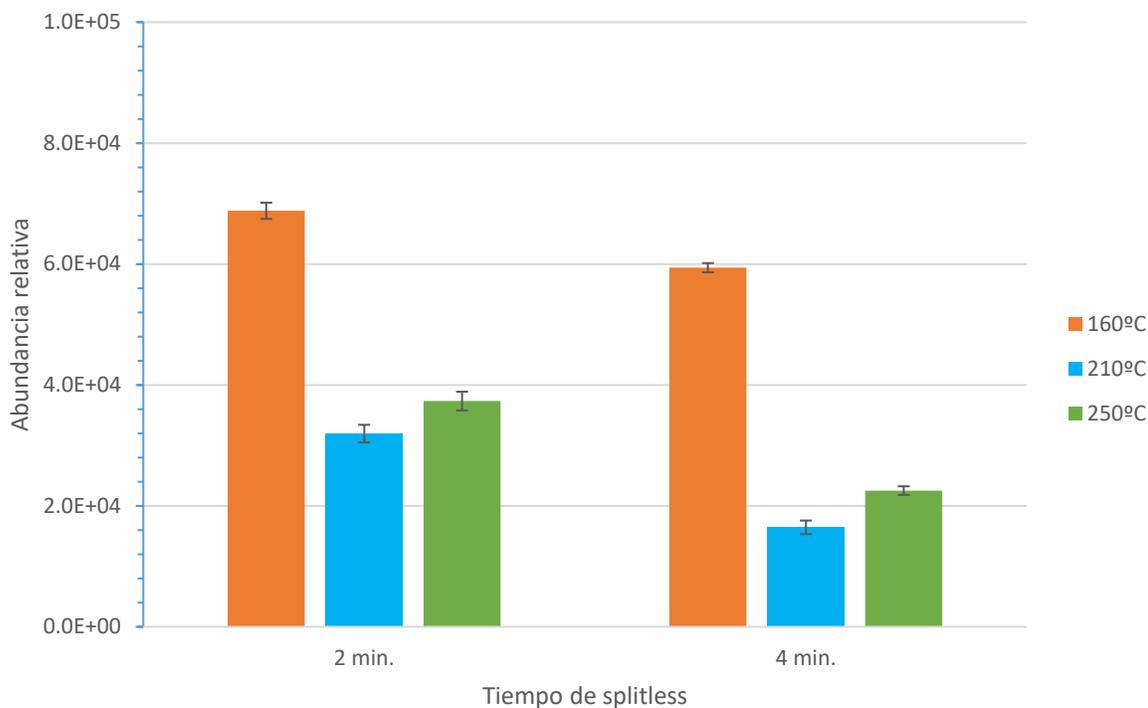


Gráfico 2. Estudio de la temperatura del inyector y tiempo de splitless en el análisis de almizcle cetona.

La variación de la temperatura del inyector para almizcle cetona, mostró al igual que con tonalide, que a 160 °C se obtuvo la mayor respuesta cromatográfica, debido a que se vaporizó la mayor cantidad de analito sin descomposición. A 210 y 250 °C la respuesta disminuyó debido a la posible descomposición térmica del compuesto.

Con 2 min de splitless se obtuvo una mayor respuesta cromatográfica, por lo que los análisis posteriores se realizaron bajo las mismas condiciones (160 °C y 2 min de splitless).

Al usar SPME, la desorción y detección de los analitos a 160 °C, fue baja, por lo cual y con base en el intervalo de trabajo recomendado por el fabricante para la fibra, se aumentó la temperatura del inyector a 250 °C. Este incremento favoreció la desorción y detección de los compuestos sin observar descomposición de ellos, esto puede explicarse considerando que la fase extractora de SPME evita la descomposición del analito a temperaturas elevadas. Por lo que la temperatura de desorción fue de 250 °C.

7.3. Desarrollo del método para análisis de lodo activado por UAE-SPME-GC-MS

7.3.1. Análisis del disolvente de extracción para la UAE

En un principio, y debido a la baja solubilidad acuosa de los analitos, se propuso realizar su extracción del lodo empleando tres disolventes: acetonitrilo, acetona y diclorometano.

En las extracciones para cada analito, se varió la proporción de los disolventes al 100, 50 y 33.33 %.

Los resultados de este estudio mostraron que las proporciones de AcCN/CH₂Cl₂ 1:1 (V/V) y AcCN extrajeron en un 450% y 370% más de tonalide y almizcle cetona respectivamente. Tomando en cuenta esta información, se realizó un análisis para optimizar la proporción de disolventes, en el que se utilizaron las dos proporciones anteriores y se añadió una fracción intermedia de entre ellos (AcCN/CH₂Cl₂ 3:1 (V/V)).

En la optimización, se observó que la proporción de AcCN/CH₂Cl₂ 3:1 (V/V) es la que extrae en mayor cantidad a los analitos. Sin embargo, el diclorometano es capaz de disolver las fibras de SPME. Por lo cual y sabiendo la elevada capacidad de extracción del metanol, se realizó un estudio para extraer los analitos con él.

Los resultados obtenidos indicaron que el metanol aumento en casi 300 % la extracción de los analitos en comparación con la de las proporciones de disolventes ya evaluadas. Esto se puede explicar con la fuerza de elución de los disolventes. Dicha fuerza es una medida de su capacidad relativa para desplazar solutos de un determinado adsorbente, además de la facilidad con que se pueden formar enlaces de hidrogeno con los compuestos que se quieren extraer. Cuanto más polar sea el disolvente, mayor será su fuerza de elución y la extracción de los analitos. El metanol tiene una fuerza de elución (ϵ°) de 0.70, mientras que la acetona, AcCN y CH₂Cl₂ de 0.53, 0.52 y 0.3 respectivamente, debido a esto se puede determinar que el metanol extraerá una mayor cantidad de los compuestos (26).

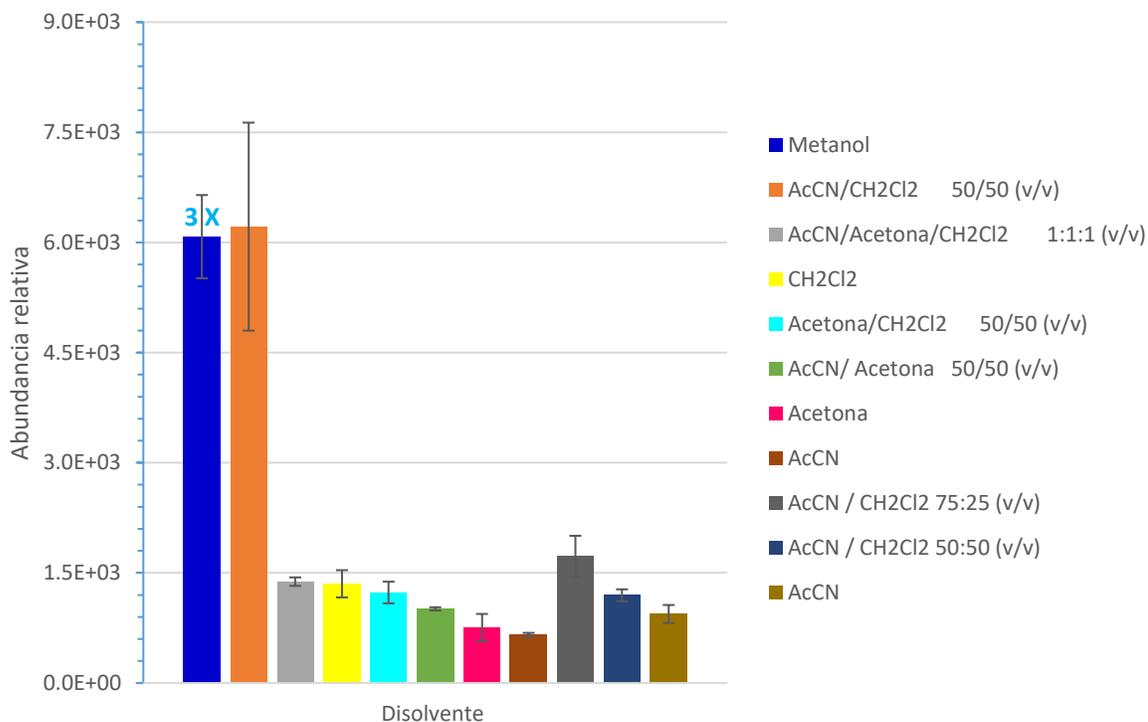


Gráfico 3. Estudio del disolvente de extracción para tonalide.

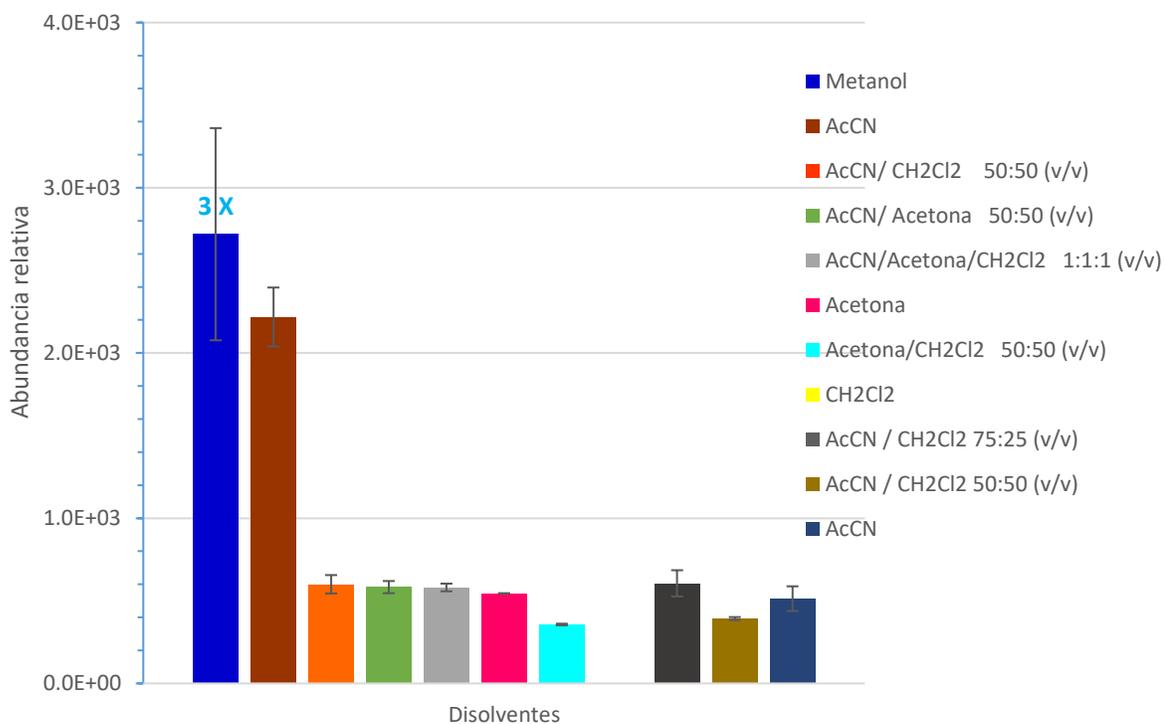


Gráfico 4. Estudio del disolvente de extracción para almizcle cetona.

7.3.2. Retención de analitos en los filtros de membrana.

En la preparación de la muestra, el uso de filtros membrana permite la difusión selectiva de un componente a través de sus poros utilizando presión.

El grado de recuperación de un analito es importante, por lo que la pérdida por adsorción se debe estudiar. Para ello se usaron una membrana nueva y una usada en la filtración de lodo y en cada una se filtró 1.0 mL de disolución estándar de almizcle cetona. Después, se analizó 1,0 μ L de cada filtración por GC-MS.

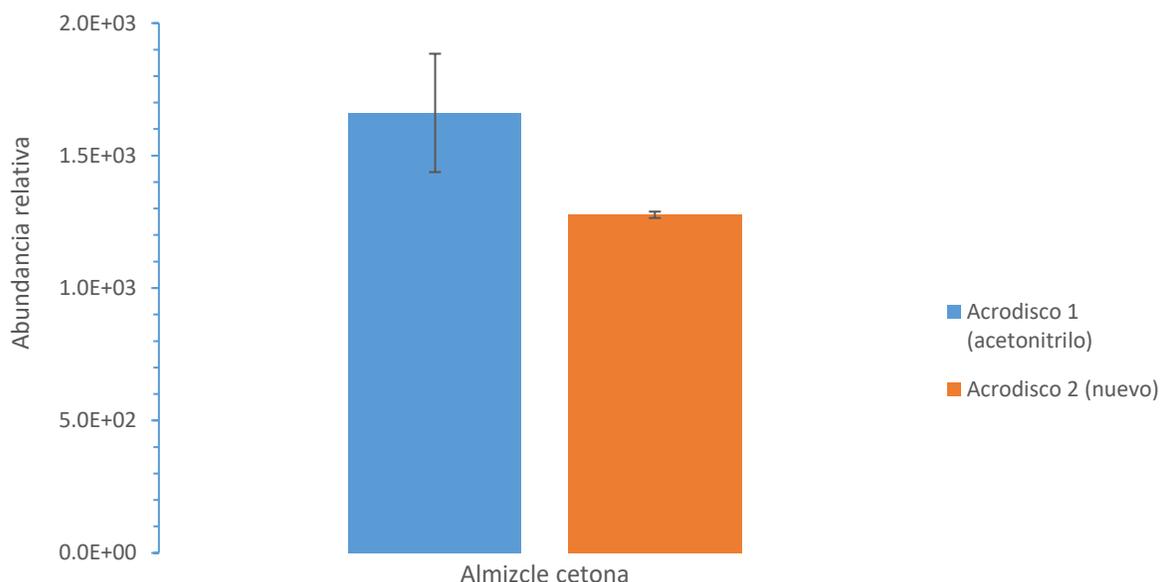


Gráfico 5. Estudio de la retención de los analitos en el filtro usado y nuevo.

En el Gráfico 5 se observa que el filtro usado retuvo menos a los analitos que el nuevo, esto se puede atribuir a su grado de saturación, es decir, se presenta una retención menor de los analitos cuando existe una acumulación de algún soluto (lodo en este caso) retenido en la superficie del filtro, lo que indica que no existen muchos sitios disponibles en los cuales se genere la adsorción de los compuestos. Por el contrario, una saturación deficiente del filtro permitirá una mayor adsorción de los compuestos de interés debido al mayor número de sitios insaturados siendo mayor la interferencia al paso de los compuestos.

Por tal motivo, se estableció saturar el filtro con 2 mL del disolvente con el que se realizó la extracción para reducir la cantidad de analito retenido.

7.3.3. Tiempo de extracción con ultrasonido

Para determinar la influencia del tiempo en la extracción de los analitos se realizó un estudio utilizando un baño de ultrasonido en el que se evaluó la extracción a 30, 50 y 80 s.

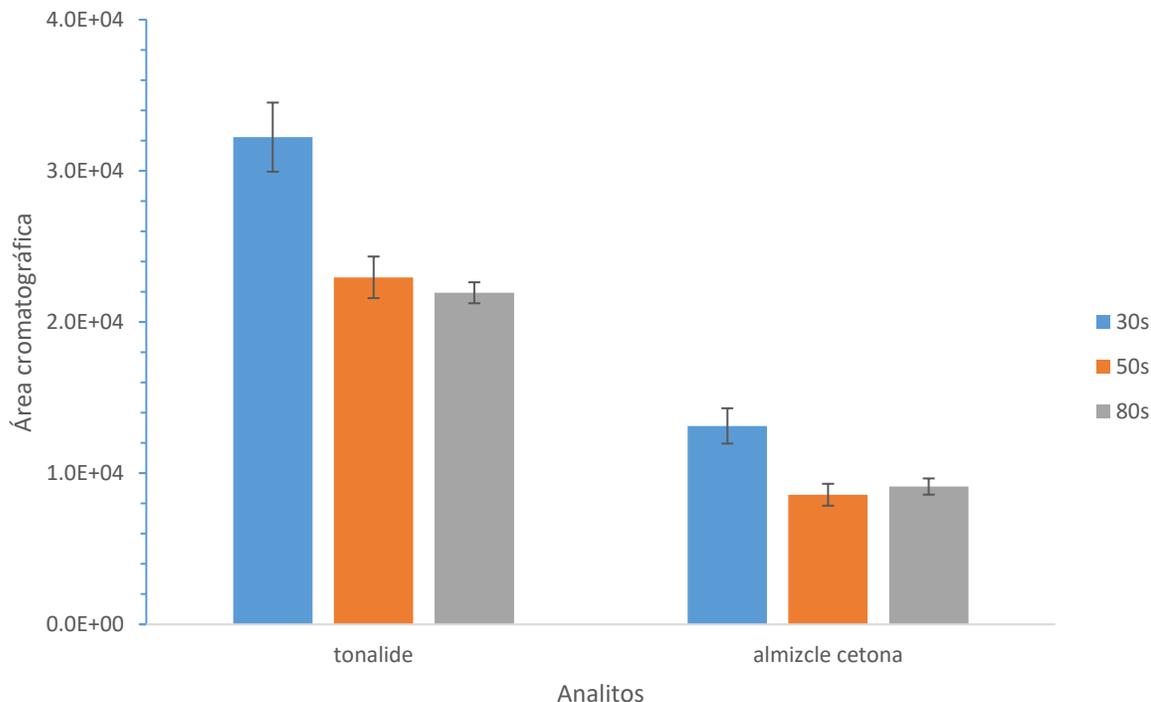


Gráfico 6. Extracción asistida con ultrasonido a 30, 50 y 80 s.

En el Gráfico 6, se observa que la mayor respuesta cromatográfica se obtuvo con 30 s de extracción, por el contrario, al aumentar el tiempo a 50 y 80 s la respuesta disminuyó en un 28 y 35 % respectivamente para los analitos, esto se debe a que tiempos mayores provocan una falta de uniformidad en la distribución de las ondas de ultrasonido, lo cual disminuye su eficiencia, provocando una reducción en las recuperaciones obtenidas (24).

7.4. Condiciones óptimas para la UAE en sedimento

Las condiciones experimentales óptimas para la UAE después de realizar los análisis son: 100 mg de lodo fortificado en el vial, 1 mL de metanol y 30 s como tiempo de extracción, manteniendo el vial en el centro y a una profundidad media en el baño de ultrasonido.

7.5. Estudio de variables que afectan la extracción de los analitos con SPME.

7.5.1. Selección de la fibra

Se evaluaron 2 fibras, una de PDMS (100 μm) y la otra de PDMS/DVB (65 μm). En el Gráfico 7 se observa que la mayor extracción de los compuestos se obtuvo con la fibra de PDMS (100 μm) la cual extrajo en más de 460 % y 840 % al tonalide y almizcle cetona respectivamente con respecto a la fibra de PDMS/DVB (65 μm), por lo que para realizar las extracciones por SPME se utilizó la fibra de PDMS (100 μm).

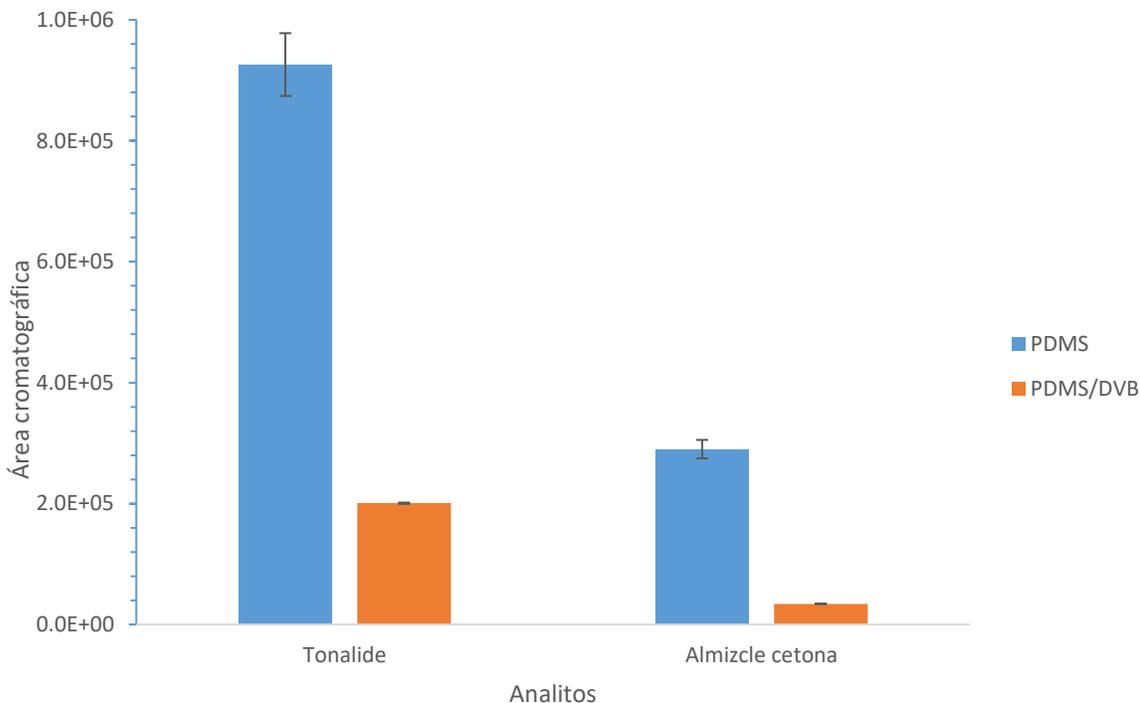


Gráfico 7. Selección de la fibra de SPME, PDMS (100 μm) VS PDMS/DVB (65 μm)

El mecanismo de extracción está determinado por si el recubrimiento es de tipo absorbente o adsorbente, grosor y polaridad. La fibra de PDMS (100 μm), tiene una mayor superficie de contacto que PDMS/DVB (65 μm) para extraer los compuestos de carácter no polar y su mecanismo se basa en un proceso de absorción permitiendo que el analito ingrese al recubrimiento, contrario al de adsorción de PDMS/DVB, el cual se ve limitado por la reducción de la superficie de contacto y que en matrices complejas los analitos, así como, interferentes compiten por los sitios de adsorción de la fibra.

En forma general, las fibras con recubrimientos absorbentes se utilizan más para muestras complejas a niveles variados de concentración, también favorecen la extracción de analitos muy ramificados o aromáticos sustituidos (20).

7.5.2. Efecto de la adición de una sal inerte (NaCl) en la extracción

La adición de sales solubles aumenta la fuerza iónica de la solución y a su vez puede disminuir la solubilidad de los compuestos orgánicos que están en ella, generando un incremento en la sensibilidad del método.

Debido a lo anterior, se realizó un estudio en el que se evaluó el efecto de la adición del 30% de una sal inerte (NaCl) en la eficiencia de extracción de la SPME.

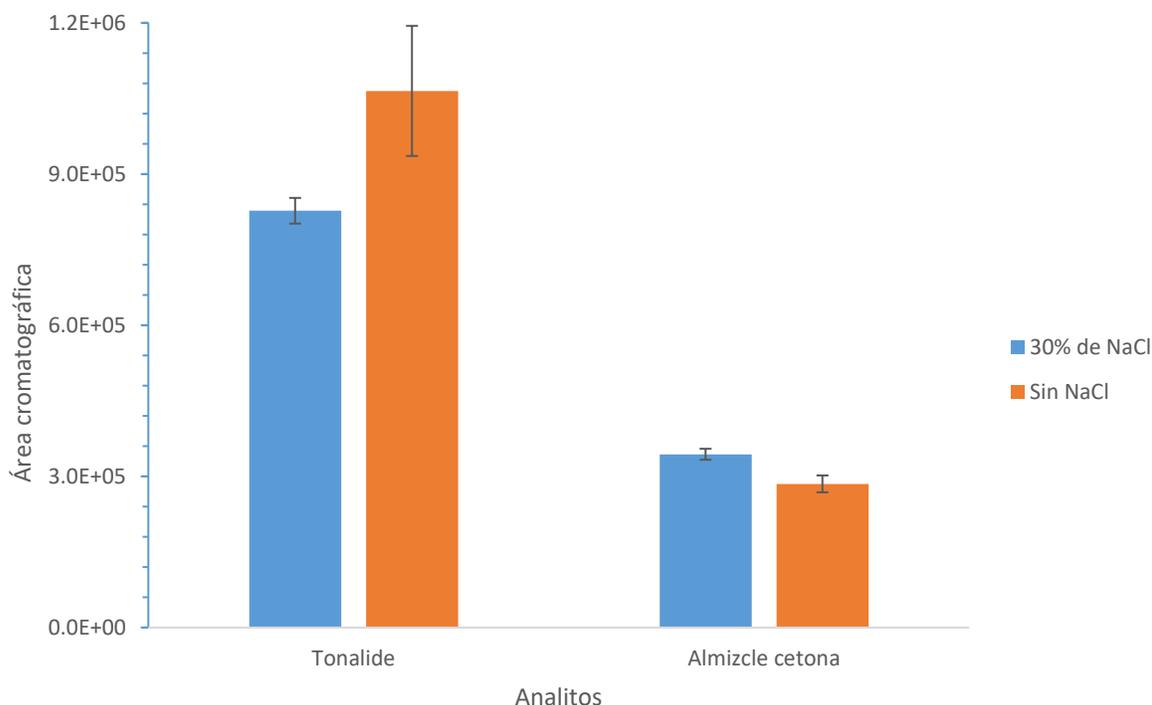


Gráfico 8. Efecto de la adición de NaCl en la extracción de los analitos por SPME.

Los resultados obtenidos mostraron que la adición de NaCl afecta de manera distinta a los analitos de interés. En primera instancia su influencia es negativa para el caso de tonalide, disminuyendo el área cromatográfica en un 22.32 %. Por el contrario, en el caso de almizcle cetona el área incrementó en un 17.02 %.

La disminución en la extracción de tonalide con SPME al añadir NaCl puede atribuirse a dos factores. El primero menciona que para compuestos cuya solubilidad acuosa no cambia, la adición de sal puede disminuir la cantidad extraída por la fibra de SPME. El segundo factor menciona que, al agregar sal para generar la disminución de la solubilidad en medio acuoso, se puede provocar un aumento en la adsorción superficial (por ejemplo, en las paredes del vial) o incluso la formación de interacción de la sal con el analito (20-21).

Para el almizcle cetona, se observa que al agregar NaCl la respuesta incrementa ligeramente (17.02 %), esto puede atribuirse a que la sal reduce la solubilidad del compuesto en el disolvente y, en consecuencia, el analito se puede distribuir en la

fase extractora. Por el contrario, la adición del NaCl reduce la extracción de tonalide, esto se puede atribuir a que la adición de sal se utiliza para favorecer la extracción de compuestos polares y su efecto es relativamente insignificante en compuestos poco polares, por lo que los análisis posteriores se hicieron sin la adición de NaCl (20).

7.5.3. Efecto de la temperatura en la SPME

El incremento de la temperatura en SPME generalmente favorece la transferencia de masa de los analitos a la fibra, reduciendo el tiempo para alcanzar el equilibrio. Debido a esto, se realizó un estudio en el que se evaluó la extracción de los compuestos con la fibra de SPME a 25 y 40 °C.

En el Gráfico 9 se observa un incremento en la respuesta analítica a una temperatura de extracción de 40 °C, con un 33 % para tonalide y 8.5 % para almizcle cetona, en comparación con las respuestas obtenidas a 25 °C, debido a esto los análisis posteriores se realizaron a 40 °C.

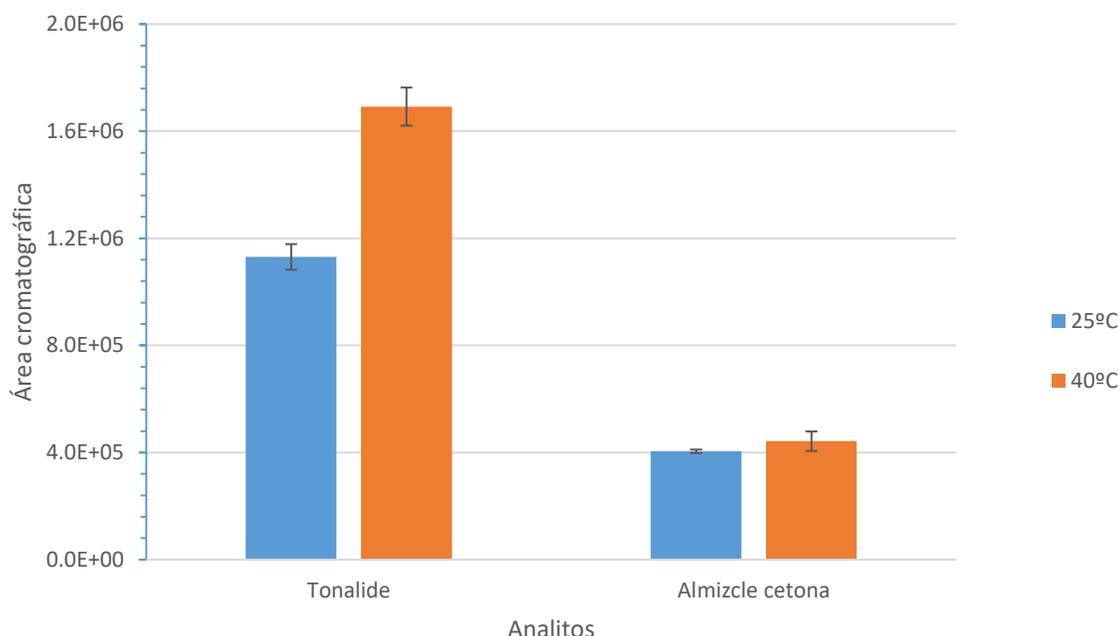


Gráfico 9. Efecto de la temperatura en la extracción de los analitos con SPME.

La obtención de una mayor respuesta analítica a 40 °C se puede atribuir a que el incremento en la temperatura aumenta la difusión de los analitos, lo que resulta en una mayor de transferencia de masa a la fibra (20-21).

7.5.4. Efecto del pH de extracción

Una de las variables que se puede modificar para aumentar la sensibilidad del método es el ajuste de pH. Por tal motivo, se realizó un estudio en el que se evaluó la influencia en la extracción a pH ácido (pH=3) y neutro (pH=7). En el Gráfico 10 se observa que la respuesta analítica para tonalide se redujo en un 0.53 %, en cambio para el almizcle cetona aumento en un 5.47 %, sin embargo, este incremento indica que el uso de un pH ácido (pH=3) no es una variable que influya de manera importante en la extracción de los compuestos, por lo que no se realizó ajuste de pH para los análisis posteriores.

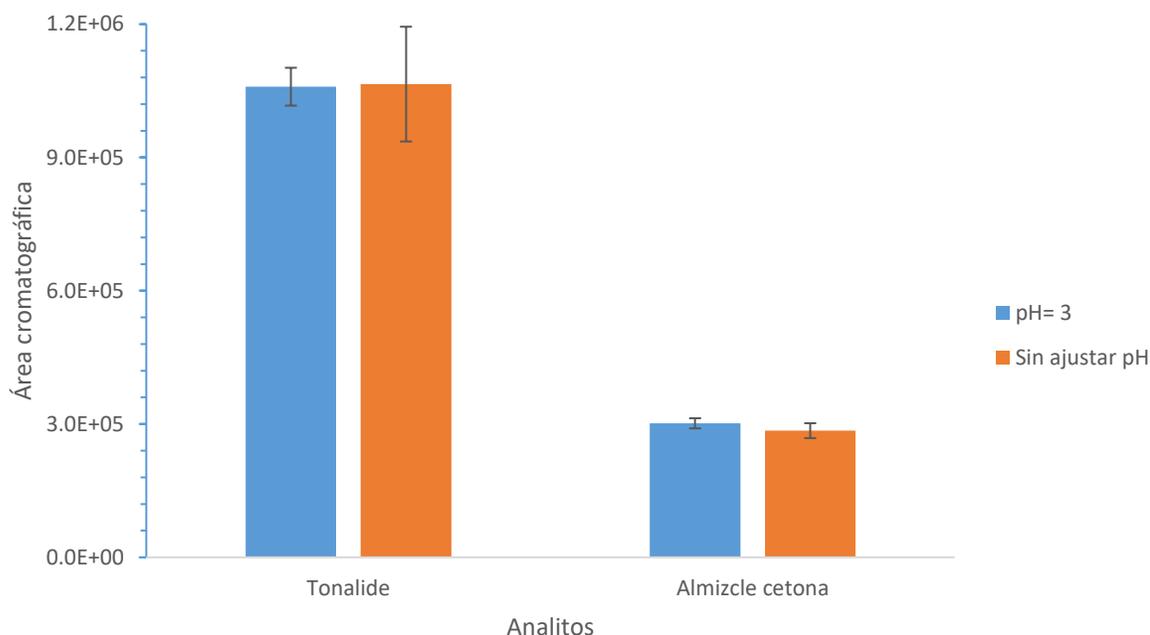


Gráfico 10. Efecto del pH en la extracción de los analitos con SPME.

El ajuste del pH no mejora la extracción, esto se debe, a que los analitos no se encuentran en su forma no disociada, lo cual desfavorece su extracción (21).

7.6. Condiciones seleccionadas para el análisis de tonalide y almizcle cetona en agua desionizada

Se tomó una alícuota de 10.0 mL de una disolución estándar de los analitos con un porcentaje de metanol del 1 % y una concentración de $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, se colocó en un vial de 15 mL el cual se introdujo en un baño de agua a una temperatura de 40°C con agitación constante durante 30 min., para posteriormente realizar la extracción con SPME utilizando la fase polimérica de PDMS ($100 \mu\text{m}$) por inmersión directa.

El análisis se llevó a cabo con la desorción de los analitos exponiendo la fibra en el inyector del CG-MS a 250°C durante 3 min.

7.7. Análisis del estándar de tonalide y almizcle cetona por UAE-SPME-GC-MS

7.7.1. Límites de cuantificación y detección

Los límites de detección y cuantificación se determinaron de manera experimental considerando una respuesta analítica de 3 y 10 veces la relación señal/ruido del instrumento. El límite de detección del método tuvo un valor de $0.15 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$, mientras que el valor del límite de cuantificación de los analitos fue de $0.5 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$.

El Gráfico (Gráfico 15) y los cromatogramas (Figuras 11 y 12) por monitoreo selectivo de iones (SIM) de las respuestas analíticas correspondientes a los límites de detección y cuantificación se muestran en el Anexo 11.1.

7.7.2. Curva de calibración para tonalide y almizcle cetona

La curva de calibración de 6 puntos se preparó en un intervalo de concentración de 0.5 a $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n=3$) para los analitos. Se evaluó la linealidad del método llevando a cabo la regresión lineal utilizando el promedio de las áreas cromatográficas de cada concentración, además, se calculó la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (%CV).

Los Gráficos 11 y 12 muestran las curvas estándar promedio de cada analito. En ellos se observa que la linealidad en el intervalo de concentración estudiado fue aceptable, ya que, se obtuvieron coeficientes de correlación (R) mayores a 0.99 para ambos analitos, demostrando que el modelo lineal de calibración fue adecuado para la determinación de tonalide y almizcle cetona en lodo, además, la variabilidad de los datos es aceptable debido a que los C.V. de la calibración fueron menores de 20 % en ambos casos.

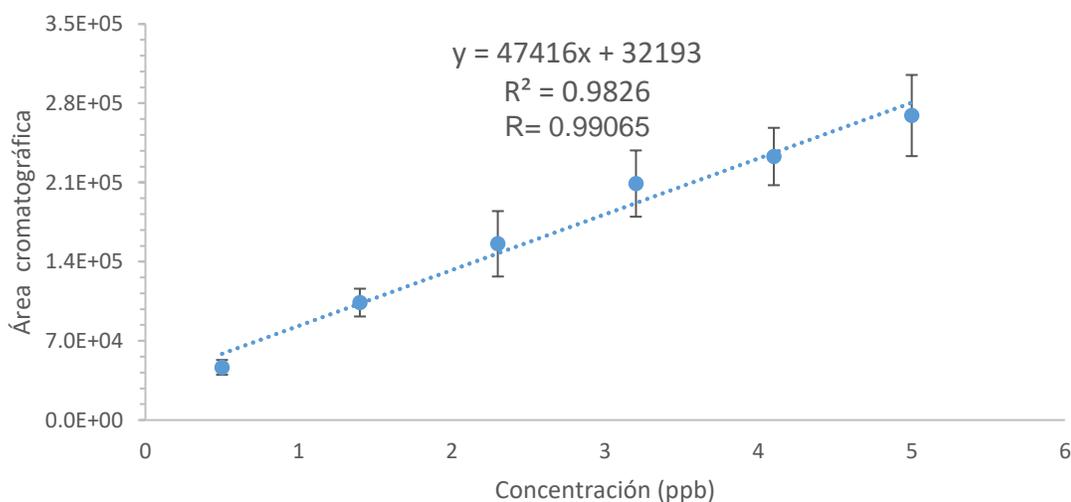


Gráfico 11. Curva de calibración de tonalide.

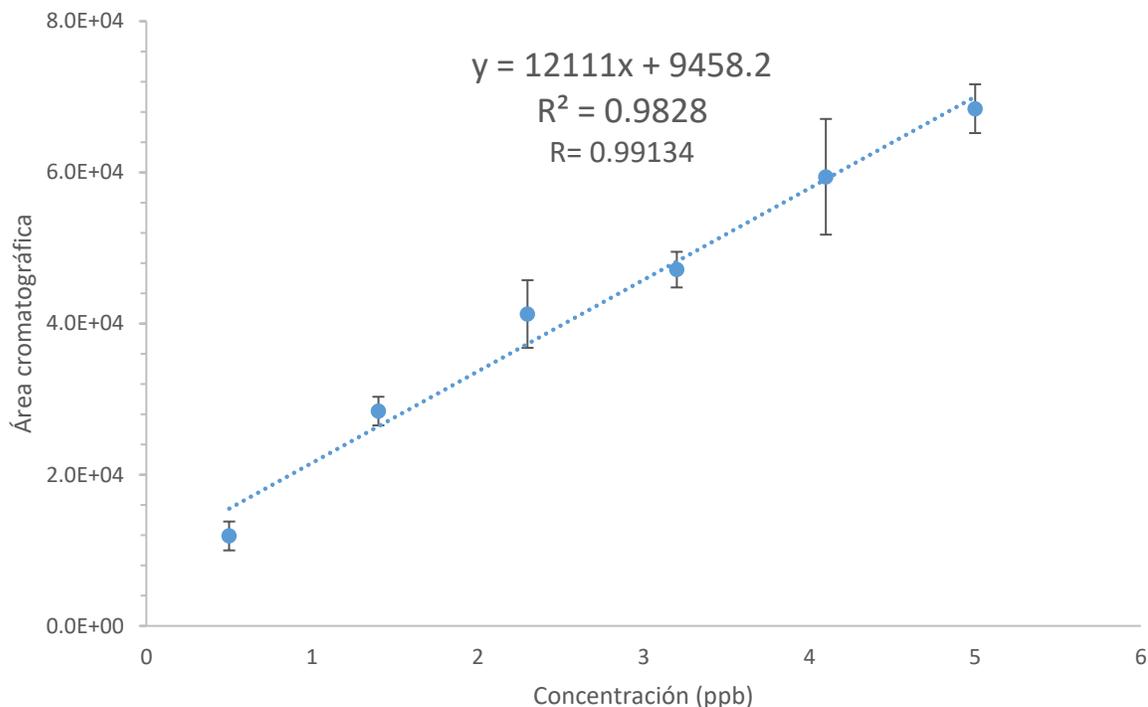


Gráfico 12. Curva de calibración para almizcle cetona.

En el anexo 11.2 se muestran las Tablas (Tablas 12 y 13) en las que se encuentran los resultados obtenidos de la linealidad del sistema para cada analito junto con su desviación estándar y C.V., además, se presentan las curvas de calibración de cada analito con su respectiva regresión lineal (Gráficos 16 y 17).

7.8. Análisis de lodo activado de la planta de tratamiento de Cerro de la estrella, Iztapalapa, Ciudad de México.

7.8.1. Blanco de reactivos

Antes de hacer la determinación de tonalide y almizcle cetona por UAE-SPME-GS-MS, se realizaron los blancos de reactivos. En dicho análisis no se observó ninguna respuesta cromatográfica.

En el anexo 11.3 (Figura 13) se encuentra el cromatograma por monitoreo selectivo de iones (SIM) del blanco de reactivos.

7.8.2. Blanco de lodo activado

En el blanco de lodo, se observó la presencia de los dos analitos. El tonalide se encontró por debajo del límite de cuantificación, mientras que el almizcle cetona está por debajo del límite de detección. El cromatograma por SIM correspondiente a este estudio se encuentra en el anexo 11.4 (Figura 14).

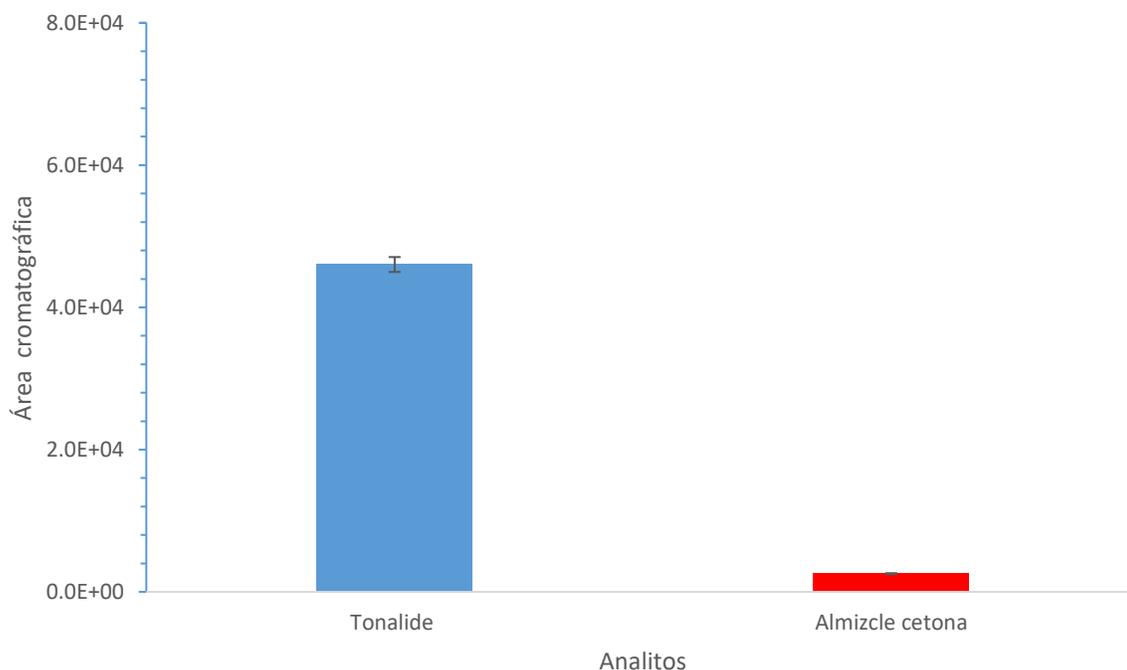


Gráfico 13. Extracción de los analitos en lodo aplicando la metodología desarrollada.

7.8.3. Determinación de Tonalide y Almizcle cetona por UAE-SPME-GC-MS en muestra de lodo activado fortificado

El análisis de lodo fortificado se llevó a cabo en las condiciones descritas en el apartado 6.12.3. La concentración aproximada de la muestra disolución fortificada es de $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

En el Gráfico 15 se muestran las áreas promedio obtenidas para cada analito. Se observó que el área cromatográfica del lodo incrementó en un 30 y 369 % para tonalide y almizcle cetona respectivamente con respecto al blanco de lodo.

En el anexo 11.5. (Figura 15) se encuentra el cromatograma por monitoreo selectivo de iones (SIM) correspondiente a la determinación de tonalide y almizcle cetona en lodo fortificado.

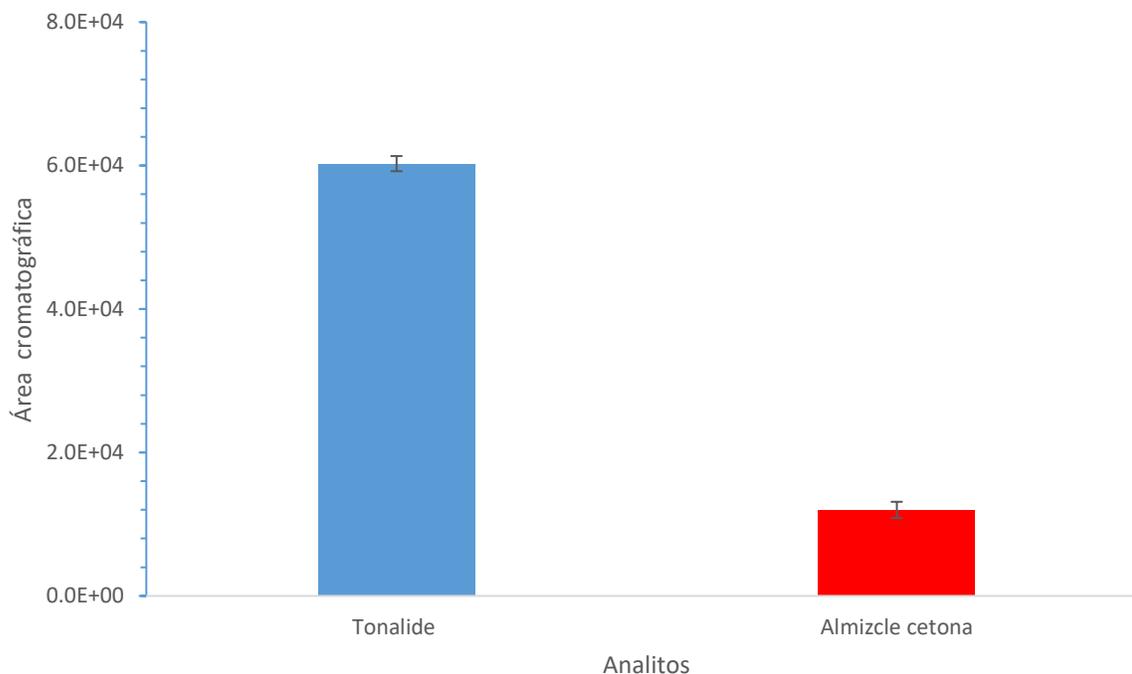


Gráfico 14. Extracción de los analitos en lodo fortificado.

Tabla 11. Comparación de métodos para la determinación de tonalide y almizcle cetona.

Analito	Muestra	Preparación de muestra	Análisis	LD	Referencia
Tonalide	Lodo activado	UAE-SPME	GC/MS	0.15 ng·L ⁻¹	Método desarrollado
Almizcle cetona	Agua residual	SPME	GC/MS	0.5 ng·L ⁻¹	[10]
	Pescado	Soxhelt	GC/MS	10 mg·kg ⁻¹	
Tonalide	Sólidos suspendidos	Soxhelt	GC/MS	0.05 mg·kg ⁻¹	[10]
	Lodo	Soxhelt	GC/MS	0.01 mg·kg ⁻¹	
Tonalide y Almizcle cetona	Agua superficial	SPE	GC/MS	ND- 59.2 y ND- 13.6 ng·L ⁻¹	[12]
	Sedimentos	Soxhlet		3.06 -14.5 y 1.33-18.8 ng·g ⁻¹	

En la Tabla 11. se encuentran algunos métodos para la determinación de tonalide y almizcle cetona en diferentes matrices ambientales, los cuales fueron comparados con el método desarrollado en este trabajo.

En la mayoría de los métodos descritos, la preparación de muestra, utiliza la técnica de extracción Soxhlet que requiere de un volumen grande de disolventes y de mucho tiempo de extracción. Pocos son los métodos que utilizan técnicas miniaturizadas para la preparación de muestra (SPME, SPE, UAE, etc.) y ninguno las ha aplicado en muestras sólidas como durante el desarrollado de este trabajo, que minimiza el uso de disolvente (1 mL) en la UAE y, además, en conjunto con SPME, reduce los errores en la manipulación de la muestra por parte del analista.

De manera general GC-MS es la técnica más utilizada para la determinación de estos compuestos debido a las características de los mismos, además, de tener la capacidad de separar y determinar analitos en mezclas complejas a niveles de trazas a un menor costo en comparación a otras técnicas de análisis (HPLC o GC-MS/MS).

Al comparar los límites de detección se observa que el obtenido en este trabajo es menor con respecto a los otros, por lo cual, este método representa una alternativa de utilidad para su determinación a niveles de traza y ultra traza en diferentes matrices ambientales.

8. Conclusiones

1. En este trabajo se desarrolló una metodología analítica basada en la extracción asistida con ultrasonido (UAE) y la microextracción en fase sólida (SPME), seguido del análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) para la determinación de fragancias sintéticas (tonalide y almizcle cetona) en lodo activado.
2. Se obtuvieron los límites de detección y cuantificación con valores de 0.15 y 0.5 ng·Kg⁻¹ respectivamente. Se evaluó la linealidad de la metodología propuesta para ambos analitos y se obtuvieron coeficientes de correlación (R) y determinación (R²) mayores a 0.99 y 0.98 respectivamente.
3. El método desarrollado utiliza una cantidad de muestra reducida (mg), la preparación de la muestra es selectiva para los analitos y el consumo de reactivos es reducido, por lo cual la metodología resulta ser una alternativa analítica rápida, sencilla y amigable con el medio ambiente para la determinación de estos compuestos.
4. La propuesta metodológica (basada en UAE y SPME) para la determinación, de tonalide y almizcle cetona se aplicó a una muestra de lodo activado de la planta de tratamiento de agua residual de Cerro de la Estrella logrando establecer la presencia de estas fragancias por debajo del LC en el caso de tonalide y por debajo del LD para el almizcle cetona.

9. Perspectiva

Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se propone la siguiente perspectiva para complementar los aspectos experimentales en el análisis de almizcle cetona y tonalide.

- Optimizar y validar los parámetros evaluados en cada uno de los procedimientos de extracción y análisis para la determinación de tonalide y almizcle cetona en lodo activado.

10. Referencias

1. Norma Oficial Mexicana NOM-001-ECOL-1996 [en línea]. Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Diario Oficial de la Federación.1997 [consulta: 19 noviembre 2019].
2. Reporte de Plantas de Tratamiento de Aguas Residuales [en línea]. Ciudad de México: Secretaria del Medio Ambiente: 2015 [consulta: 19 noviembre 2019].
3. Limón JC. Tratamiento de Aguas Residuales, ¿Problema o Recurso? [Especialidad]. Jalisco. Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Occidente; 2013.
4. Norma Oficial Mexicana NOM-004-SEMARNAT-2002 [en línea]. Lodos y biosólidos. Especificaciones y límites máximos permisibles de contaminantes para su aprovechamiento y disposición final. Diario Oficial de la Federación. 2003 [consulta: 20 noviembre 2019].
5. Gil M, Usma JI, Soto AM, Gutiérrez OD. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. Producción + Limpia. 2012; 7(2): 52-73.
6. García C, Gortáres P, Droguí P. Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remoción. Química Viva. 2011; 10(2): 96-105.
7. Tumov J, Golovko O, Koba O, Roman U, Jana G, Kroupov HK. Effect of polycyclic musk compounds on aquatic organisms: A critical literature review supplemented by own data. Science on The Total Environment. 2019; 651(2): 2235-2246.
8. Carlsson G, Norrgren L. Synthetic Musk Toxicity to Early Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*). Arch Environ Contam Toxicol. 2004; 46(1): 102-105.
9. European Union. European Union Risk Assessment Report 2. butoxyethanol [Internet]. Report on AHTN. Luxemburg: 2006 [consulta: 22 noviembre 2019].
10. Balk F, Ford RA. Environmental risk assessment for the polycyclic musk AHTN and HHCB in the EU: I. Fate and exposure assessment. Toxicology Letters. 1999; 111 (1-2): 57-79.
11. Moreno EM, Núñez A. Disruptores endocrinos, un posible riesgo toxico en productos de consumo habitual. Unirevista. 2012.
12. Jiang S, Wang L, Zheng M, Lou Y, Shi L. Determination and environmental risk assessments of the Jiaozhou Bay wetland, China. Environ Sci Pollut Res. 2008; 25: 4915-4923.
13. Schmeiser HH, Gminski R, Mersch-sundermann V. Evaluation of health risks caused by musk ketone. International Journal of Hygiene and Environmental Health. 2001; 203(4): 293-299.
14. Carlsson G, Orn S, Andersson PL, Soderstrom H, Norrgren L. The impact of musk ketone on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). Marine Environmental Research. 2000; 50 (1-5): 237-241.

15. Tumov J, Steibach C, Kurman V, et al. Effect of tonalide on early life stages of common carp. *Toxicology Letters*. 2014; 229 (Supplement): S116.
16. Li W, Wang S, Li J, Wang X, Fan B, Gao X. Developmet of aquatic life criteria for tonalide (AHTN) and the ecological risk assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2020; 189: 109960.
17. Diario Oficial de la Unión Europea. DIRECTIVA 2004/88/CE DE LA COMISION de 7 de septiembre de 2004 por la que se modifica la Directiva 76/768/CE del Consejo, relativa a los productos cosméticos. 2004: 5-6.
18. Diario Oficial de la Federación [en línea]. Acuerdo por el que se determinan sustancias prohibidas y restringidas en la elaboración de productos de perfumería y belleza. DOF. 21 junio 2010 [consulta: 12 junio 2020].
19. Jiménez – Díaz I, Zafra-Gómez A, Ballesteros O, Navalón A. Analytical methods for the determination of personal care products in human samples: An ver view. *Talanta*. 2014; 129 (1): 448-458.
20. Pawliszyn J. Handbook of solid phase microextraction. Ontario, Canada: Elsevier Inc; 2012.
21. Risticovic S, Vuckovic D, Pawliszyn J, Lord H. Solid-Phase Microextraction. Ontario, Canada: Elservier Inc; 2012: 420-457.
22. Priego-Capote F, Luque de Castro M. Analytical uses of ultrasound I. Sample preparation. *TrAC-Trends Anal Chem*. 2004; 23 (9): 644-653.
23. Pilli S, Bhunia P, Yan S, Leblanc RJ, Tyagi RJ, Suram PY. Ultrasonic pretreatment of sludge: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2011; 18 (1): 1-18.
24. Capelo-Martinez JL. Ultrasound in chemistry: Analytical Appplications. Caparica, Portugal. Wiley-VCH; 2009.
25. Karasenk FW, Clement RE. BASIC GAS CHROMATOGRAPHY – MASS SPECTROMETRY: Principles and techniques. Ontario, Canada. ELSEVIER.1988.
26. Harris D. Análisis químico cuantitativo. 3ª Edición (sexta edición original). USA: Reverte; 2013. Cap. 25, Cromatografía de líquidos de alta eficiencia; p. 612-614.

11. Anexos

11.1. Límites de detección y cuantificación

11.1.1. Gráfico de los límites de detección y cuantificación

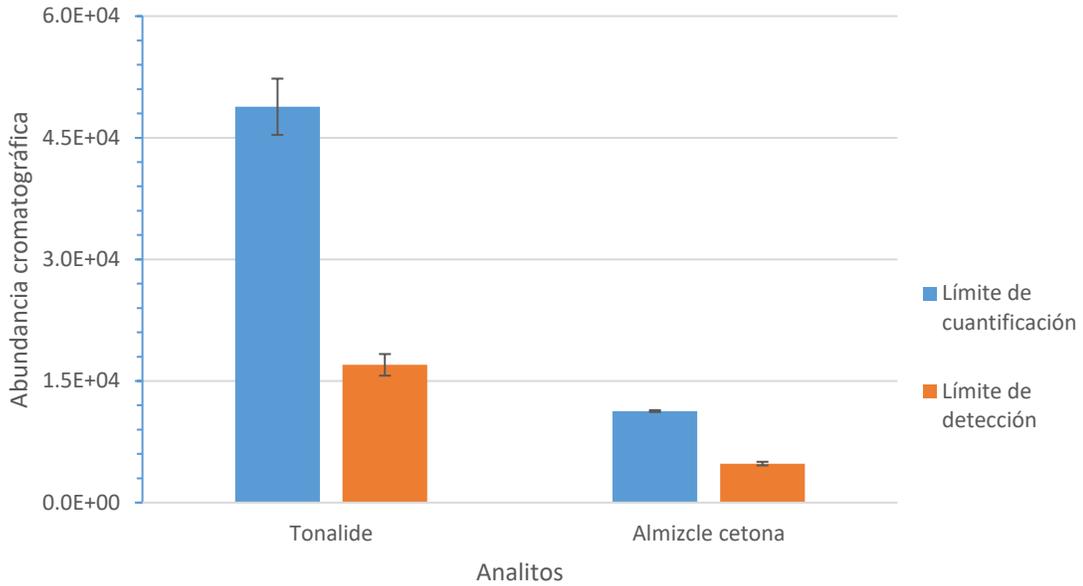


Gráfico 15. Límites de detección ($150 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$) y cuantificación ($500 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$).

11.1.2. Límites de detección y cuantificación

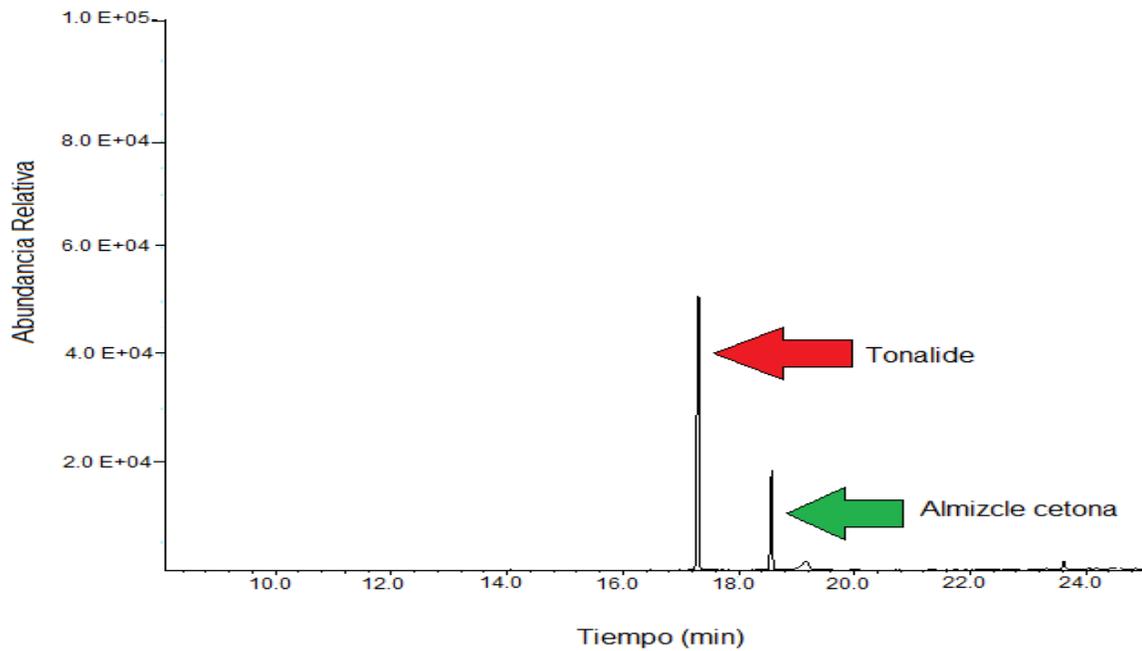


Figura 11. Cromatograma por monitoreo selectivo de iones (SIM) del límite de detección de los analitos (Disolución estándar de 150 ppt).

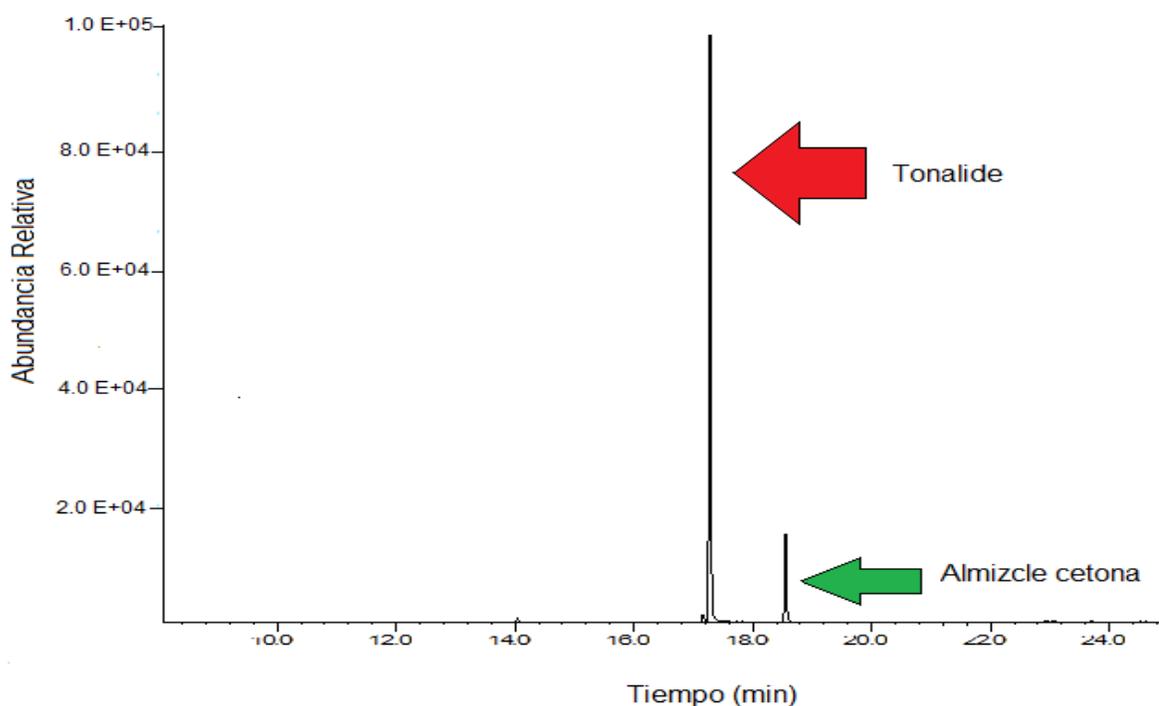


Figura 12. Cromatograma por monitoreo selectivo de iones (SIM) del límite de cuantificación de los analitos (disolución estándar a 500 ppt).

11.2. Curvas de calibración

11.2.1. Linealidad del sistema de cada analito

Tabla 12. Resultados obtenidos de la linealidad del sistema de tonalide.

Concentración (ng·mL ⁻¹)	Área ± DE (n=3)	%CV
0.5	44182± 6532.06	14.8
1.4	101055.75± 12282.35	12.2
2.3	147937± 28906.62	19.5
3.2	200199.25±29281.58	14.6
4.1	222654.5±25356.34	11.4
5	259489± 35876.87	13.8

Tabla 13. Resultados obtenidos para la linealidad del sistema de almizcle cetona.

Concentración (ng·mL ⁻¹)	Área ± DE (n=3)	%CV
0.5	11902.33±1910.82	16.1
1.4	28425.33±1893.03	6.7
2.3	41267.67±4475.59	10.8
3.2	47136±2359.71	5.0
4.1	59420±7653.65	12.9
5	68432.33±3228.56	4.7

11.2.2. Curvas de calibración independientes del tonalide

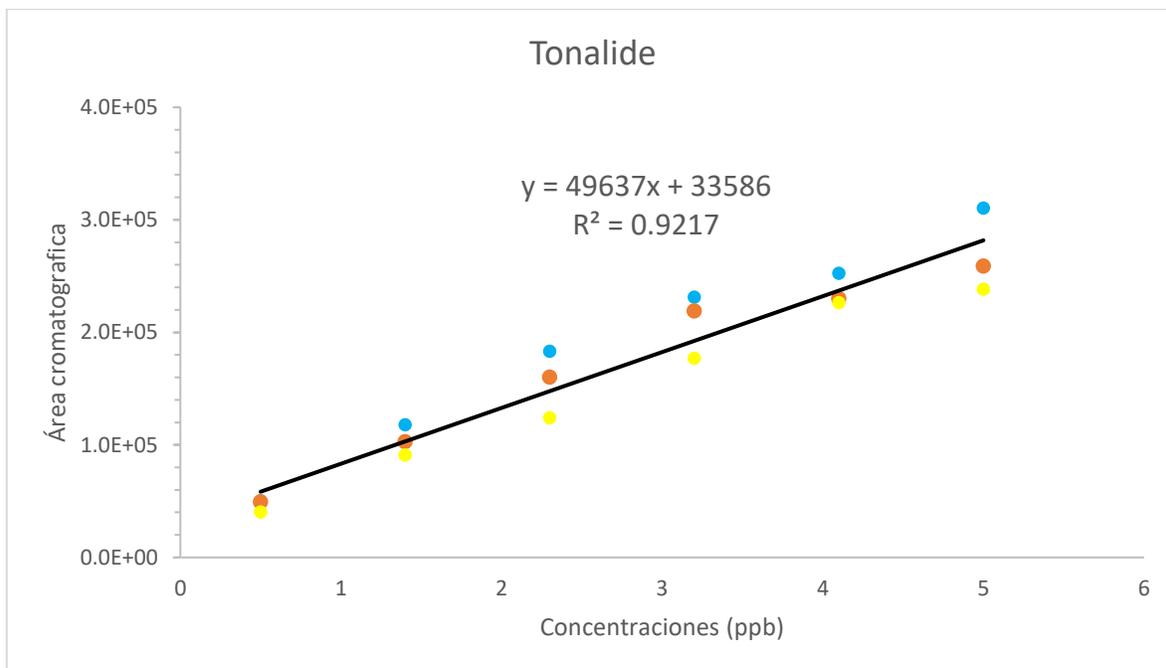


Gráfico 16. Curvas de calibración de tonalide.

11.2.3. Curvas de calibración de almizcle cetona

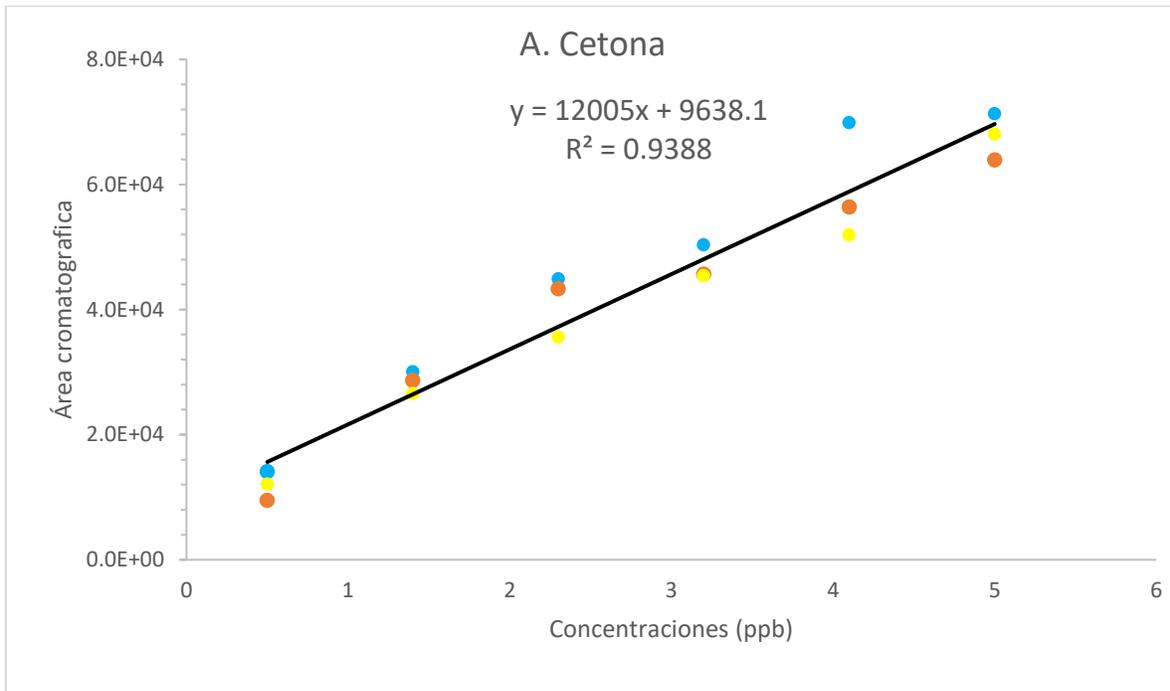


Gráfico 17. Curvas de calibración de almizcle cetona.

11.3. Blanco de reactivos

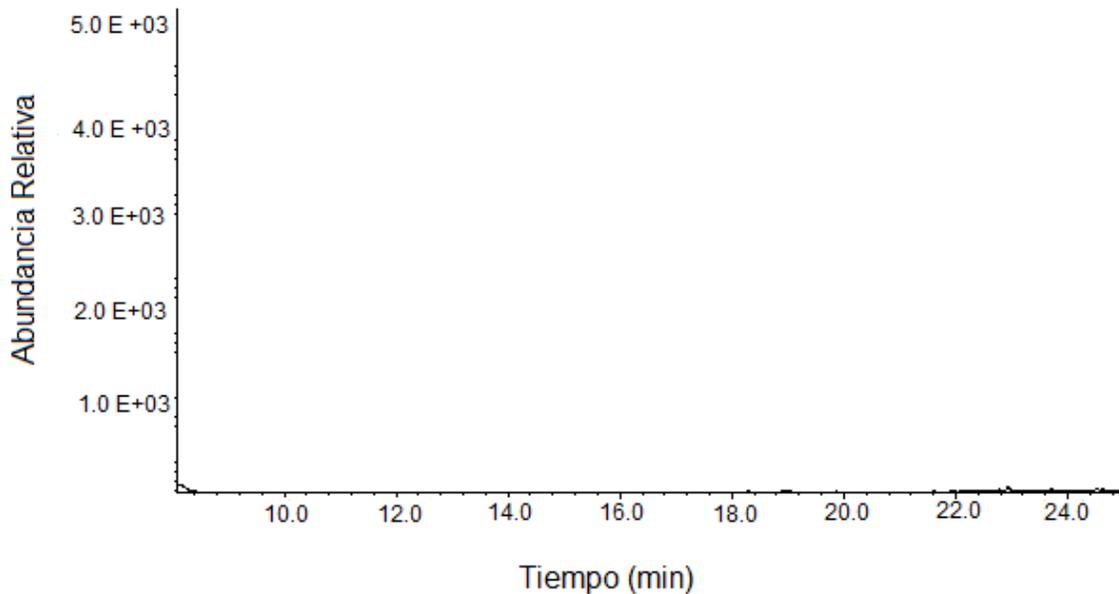


Figura 13. Cromatograma por monitoreo selectivo de iones (SIM) del blanco de reactivos.

11.4. Blanco de lodo activado

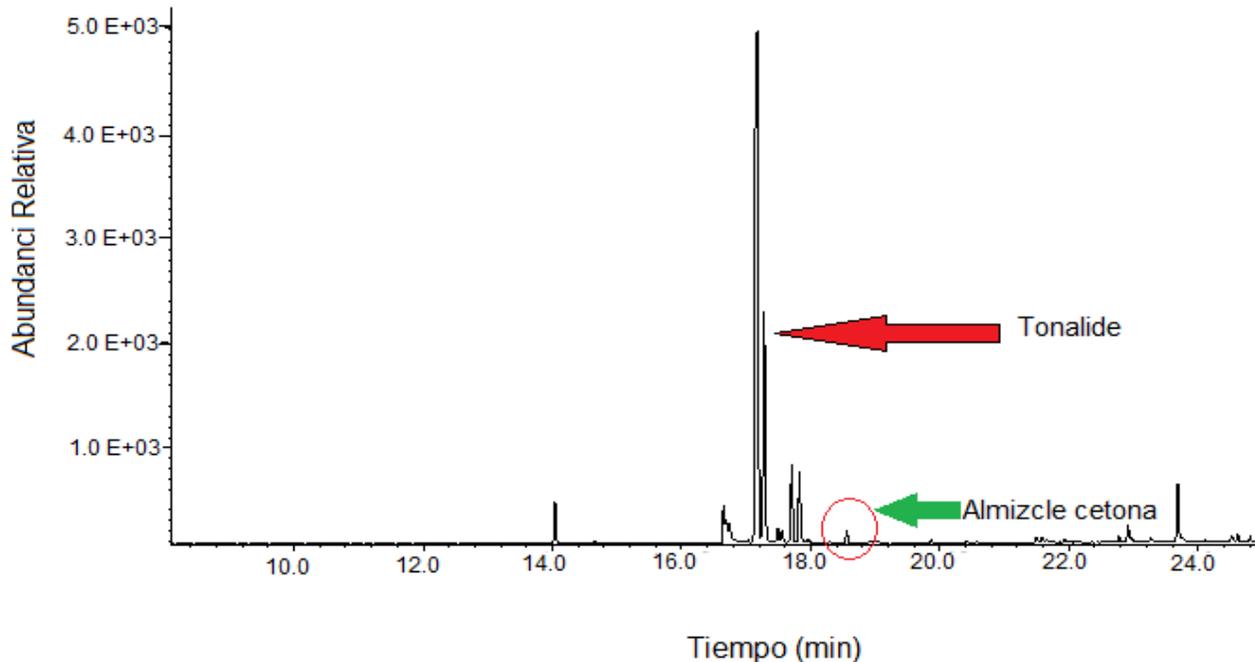


Figura 14. Cromatograma por monitoreo selectivo de iones (SIM) del análisis de blanco de lodo residual.

11.5. Lodo residual activado

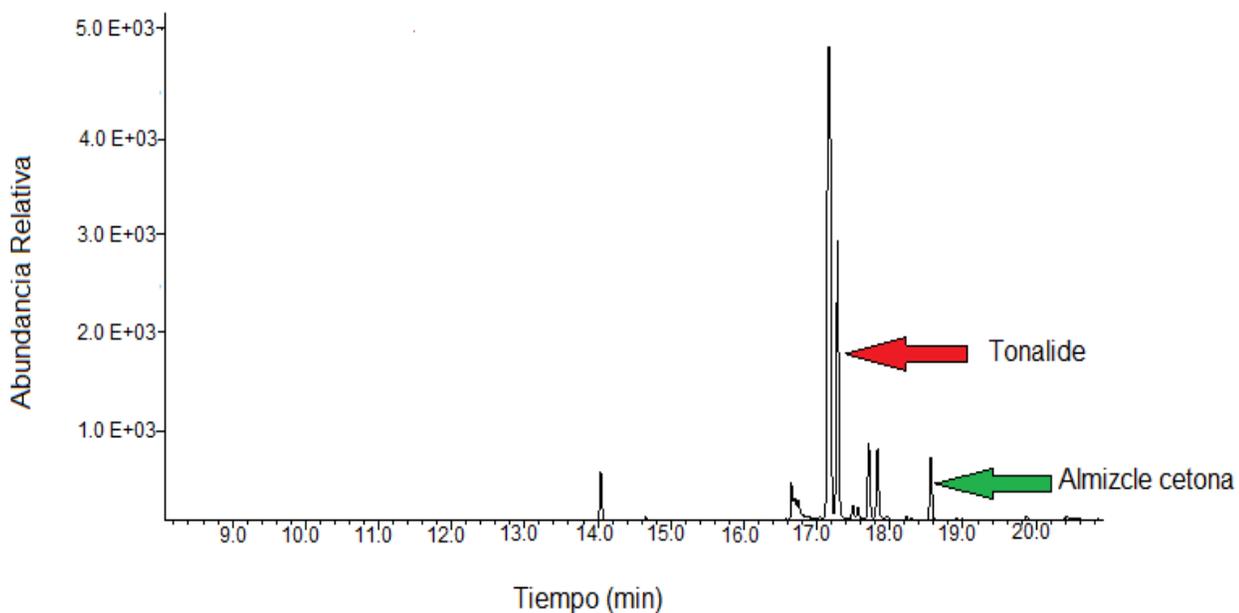


Figura 15. Cromatograma por monitoreo selectivo de iones (SIM) del análisis de lodo activado fortificado.