



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

Determinación de ingredientes de productos de cuidado personal en  
músculo de pescado mediante cromatografía de líquidos de alta  
resolución

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA**

**P R E S E N T A:**

**GABRIELA LEÓN ROMERO**

**ASESOR:**

DR. JOSÉ DE JESÚS OLMOS ESPEJEL

**COASESOR:**

DRA. ALMA LUISA REVILLA VÁZQUEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Determinación de ingredientes de productos de cuidado personal en músculo de pescado mediante cromatografía de líquidos de alta resolución.

Que presenta la pasante: Gabriela León Romero

Con número de cuenta: 411011552 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Química

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de Octubre de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Pablo Hernández Matamoros	
VOCAL	Q. María del Carmen Campo Garrido Moreno	
SECRETARIO	Dr. José de Jesús Olmos Espejel	
1er. SUPLENTE	M. en C. Miriam Aidé Castillo Rodríguez	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Claudia Pérez Garrido	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga\*

Este trabajo de tesis se desarrolló en el laboratorio L-112 del Campo 1 FES  
Cuautitlán

Parte de este trabajo se presentó en:

Segundo Congreso de Ciencia, Educación y Tecnología del 27 al 30 de junio  
del 2016. Se otorgó el primer lugar en la sección Ciencias Químicas en  
modalidad cartel.

VI Congreso Iberoamericano de Química Analítica y Encuentro Nacional de  
Química Ambiental del 15 al 18 de noviembre de 2016.

1<sup>er</sup>. Congreso Nacional De Química Siglo XXI: “Los retos de la Química en el  
Cuidado de la Salud” del 23 al 25 de noviembre de 2017

## **Agradecimientos**

*A la Universidad Nacional Autónoma de México y en especial a la que por mucho tiempo fue mi segunda casa a la Facultad de estudios superiores Cuautitlán que me dieron la oportunidad de formar parte de ellas y formarme como profesionalista. ¡Gracias!*

*Investigación realizada gracias a los Programas de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) <<IA204717>> y Programa de Apoyo a Proyectos para la Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza <<PE205416>> la Dirección General de asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM).*

*A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por el apoyo al Programa Interno de Apoyo a Proyectos de Investigación FESC-PIAPI (1651) por el financiamiento otorgado.*

*A Dios, por todo lo que me ha dado, vida, familia, amor y felicidad.*

*A mi asesor de tesis, Dr. José de Jesús Olmos gracias por confiarme este proyecto de tesis, por su apoyo y dirección para concluir este trabajo, gracias por compartir conmigo parte de su sabiduría, por las buenas experiencias compartidas y sobre todo por su infinita paciencia.*

*A la Dra. Alma Luisa Revilla, gracias por todo el apoyo brindado, por la confianza otorgada y por alentarme a concluir este ciclo.*

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

*A mi madre Flor María Romero Pérez por estar a mi lado en cada paso que doy, por ser el pilar más importante en mi vida y mi ejemplo a seguir pues es la persona más valiente, amorosa, trabajadora e invencible que conozco. Porque me has dado todo lo que está a tu alcance y a veces más de lo que merezco, por la oportunidad de tener una profesión que amo, gracias porque siempre alentarme a seguir adelante, gracias mamá, te amo.*

*A mis hermanos, Adrián León por siempre brindarme tu apoyo, por escucharme, por ser mi confidente y confiar también en mí, por ser una persona protectora, noble, persistente, gracias por inspirarme a seguir tus pasos. Emiliano León gracias por darme tantas alegrías en los momentos más complicados con cada travesura y ocurrencia tuya, porque llegaste a mi vida cuando más te necesitaba y por ser la alegría más grande de la familia.*

*A el amor de mi vida, José María Dávila por estar siempre a mi lado en los buenos momentos y sobre todo en los malos momentos, porque siempre haces lo que está en tí para apoyarme aun sin ser tu obligación, siempre impulsándome a lograr mis metas, porque eres la persona que siempre cree y confía en mí, gracias por tenerme tanta paciencia y por tu amor incondicional.*

*A mis papis, Lourdes Pérez porque incluso sin ser su responsabilidad siempre me brinda su apoyo por todos los medios posibles, porque siempre se preocupa por mi bienestar y por todo el amor que me brinda. Rigoberto Romero gracias por ser una parte fundamental en*

*mi vida, por esa alegría que le caracteriza y que siempre me transmite, por ser un ser amoroso, gracias a los dos por existir.*

*A mi padre, Marcos León por ser parte de mi vida, porque indirectamente gracias a ti he aprendido mucho de la vida por medio circunstancias difíciles que me han hecho una persona fuerte y madura, y porque ahora sé que las segundas oportunidades sí existen.*

*A toda mi familia, tíos, tías, primos etc. Que directa e indirectamente han sido parte de este proceso, gracias por sus oraciones, su protección y por ser una familia unida y amorosa.*

*A mis amigas, que quiero muchísimo con las que he vivido experiencias que nunca olvidare y que espero tener a mi lado siempre. Elizabeth Castro porque siempre estuviste a mi lado, gracias por brindarme tu amistad, tu confianza, tu cariño, y porque siempre fuiste mi mejor equipo. Miriam Jiménez, porque de ti he aprendido el valor de la amistad, gracias por siempre estar para mí, por tus consejos y tus motivaciones. Montserrat Zárate por las increíbles experiencias que hemos compartido, por transmitirme tu perseverancia y dedicación. Sandra Corona, gracias por hacer más amena mi estancia en el laboratorio, por tu apoyo, tu cariño, por brindarme tu amistad y porque siempre es un gusto conversar contigo. A Francisco Hernández (pancho), por todas las vivencias compartidas, por brindarme tu amistad, por tu nobleza, confianza y por la amistad de antaño que nos une.*

*A todos mis compañeros de carrera y generación con los que tuve la oportunidad convivir y aprender juntos, a el Sr. Ángel† gracias por las pláticas que hacían más agradables las tardes en el laboratorio, porque siempre fue una persona atenta y amable. Al Sr. Eric por el buen humor que siempre transmite y por brindarme su amistad. A todos mis compañeros con los que conviví y trabaje en el laboratorio L-112 y finalmente gracias a todos los profesores que fueron parte de mi formación académica.*

*A todos ustedes mi más sincero agradecimiento, cariño y admiración.*



# INDICE

AGRADECIMIENTOS .....	III
INDICE .....	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
ABREVIATURAS.....	XIII
INTRODUCCIÓN .....	1
RESUMEN .....	3
OBJETIVOS.....	4
CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES .....	5
1.1 CONTAMINANTES EMERGENTES .....	5
1.1.1 CLASIFICACIÓN DE LOS CONTAMINANTES EMERGENTES.....	6
1.1.2 PRODUCTOS DE CUIDADO PERSONAL.....	6
1.2 PROPIEDADES DE LOS PRODUCTOS DE CUIDADO PERSONAL (PCPS) Y SU TOXICIDAD .....	10
1.2.1 PARABENOS.....	10
1.2.2 N,N-DIETIL-META-TOLUAMIDA .....	12
1.2.3 BENZOFENONA-3 .....	13
1.3 ORGANISMO DE ESTUDIO: TILAPIA MOJARRA.....	14
1.3.1 PRODUCCIÓN DE TILAPIA MOJARRA EN MÉXICO .....	15

<b>1.4 DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA .....</b>	<b>18</b>
<b>1.4.1 METODOLOGÍA GENERAL DE LA DMFS .....</b>	<b>18</b>
<b>1.4.2 FACTORES A CONSIDERAR EN LA DMFS.....</b>	<b>20</b>
<b>1.5 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS.....</b>	<b>22</b>
<b>1.5.1 CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR) .....</b>	<b>22</b>
<b>1.5.2 PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS. ....</b>	<b>26</b>
<b>1.6 METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS DE PCPS EN MUESTRAS DE MÚSCULO DE PESCADO. 28</b>	
<b>CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA.....</b>	<b>34</b>
<b>2.1 REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS .....</b>	<b>34</b>
<b>2.2 SISTEMA CROMATOGRÁFICO .....</b>	<b>35</b>
<b>2.3 MUESTRA.....</b>	<b>35</b>
<b>2.4 PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES ESTÁNDAR. ....</b>	<b>36</b>
<b>2.5 ACONDICIONAMIENTO Y ALMACENAMIENTO DE LOS ADSORBENTES .....</b>	<b>36</b>
<b>2.6 OBTENCIÓN DE LOS ESPECTROS UV.....</b>	<b>36</b>
<b>2.7 OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.....</b>	<b>38</b>
<b>2.8 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO .....</b>	<b>39</b>
<b>2.9 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN .....</b>	<b>39</b>
<b>2.10 PARÁMETRO VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE EXTRACCIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>2.11 EVALUACIÓN DEL MÉTODO DMFS-CLAR-UV CON MUESTRAS REALES.....</b>	<b>42</b>

<b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 DETERMINACIÓN DE LOS ESPECTROS UV DE LOS ANALITOS. ....</b>	<b>43</b>
<b>3.2 OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS ANALITOS .....</b>	<b>44</b>
<b>3.3 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO .....</b>	<b>48</b>
<b>3.4 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN POR DMFS. ....</b>	<b>49</b>
<b>3.5 PARÁMETROS VALIDACIÓN DEL MÉTODO DMFS-CLAR-UV .....</b>	<b>51</b>
<b>3.6 EVALUACIÓN DEL MÉTODO DMFS-CLAR-UV CON MUESTRAS REALES.....</b>	<b>52</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXO III.....</b>	<b>60</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>64</b>

## Índice de Figuras

Figura 1. Contaminantes emergentes de interés para México .....	6
Figura 2. Ciclo de los productos de cuidado personal en el ambiente .....	9
Figura 3. Estructura química de los parabenos más utilizados en productos de cuidado personal.....	11
Figura 4. Estructura química de DEET.....	12
Figura 5. Estructura química de la Benzofenona-3 .....	13
Figura 6. Tilapia mojarra ( <i>Oreochromis urolepis homorum</i> ) .....	14
Figura 7. Consumo nacional aparente de productos pesqueros en el año 2013 .....	17
Figura 8. Serie histórica de la producción de mojarra, peso vivo en toneladas. ....	17
Figura 9 Representación gráfica de la técnica DMFS. ....	19
Figura 10 Fotografía del cromatógrafo de líquidos de alta resolución utilizado en el desarrollo de la tesis.....	23
Figura 11. Cromatograma y sus partes. ....	25
Figura 12. Esquema general de la metodología experimental.....	37
<i>Figura 13. Esquema que muestra las condiciones óptimas para la extracción de los analitos por DMFS. ....</i>	<i>41</i>
Figura 14 Espectros de absorción a una concentración de 10 ppm en MeOH.....	43
Figura 15. Cromatogramas obtenidos de una disolución estándar a una concentración de 7.5 ppm. Compuestos: 1. MPB, 2. EPB, 3. PPB, 4. DEET y 5. BP-3. Condiciones cromatográficas en el texto.....	45
Figura 16. Cromatograma obtenido para la curva de calibración de una disolución estándar de los 5 contaminantes a 30 ppm. 1. MPB, 2. EPB, 3. PPB, 4. DEET y 5. BP-3 .....	47
Figura 17. Optimización de la DMFS.....	49
Figura 18. Cromatogramas obtenidos con las condiciones óptimas de extracción y análisis para: (A) disolución estándar a 15 ppm, (B) muestra fortificada a 15 ppm y (C) muestra blanco. Compuestos: 1. MPB, 2. EPB, 3. PPB, 4. DEET y 5. BP-3. ....	51
<i>Figura 19. Cromatogramas obtenidos del análisis de diferentes muestras con el método DMFS-CLAR-UV. (A) Muestra 1: Mercado 19 de noviembre, (B) supermercado Wal-Mart y (C) supermercado Soriana, (D) Disolución estándar a 10 ppm. *PPB en muestra.....</i>	<i>53</i>
Figura 20 Curvas de calibración de metilparabeno, etilparabeno y propilparabeno de cinco niveles de concentración 0.5, 1.0, 2.5, 10.0 y 30.0 ppm.....	56
Figura 21 Curvas de calibración de DEET y benzofenona-3 de cinco niveles de concentración 0.5, 1.0, 2.5, 10.0 y 30.0 ppm. ....	56
Figura 22 Curva de calibración de metilparabeno, de cinco niveles de fortificación 2.5, 5,10, 12.5 y 15 µg agregados.....	57

Figura 23 Curva de calibración de Propilparabeno, de cinco niveles de fortificación 2.5, 5,10, 12.5 y 15 µg agregados.....	57
Figura 24 Curva de calibración de Etilparabeno, de cinco niveles de fortificación 2.5, 5,10, 12.5 y 15 µg agregados.....	58
Figura 25 Curva de calibración de DEET, de cinco niveles de fortificación 2.5, 5,10, 12.5 y 15 µg agregados. ....	58
Figura 26 Curva de calibración de oxibenzona, de cinco niveles de fortificación 2.5, 5,10, 12.5 y 15 µg agregados.....	59

## Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de los Productos de Cuidado Personal .....	7
Tabla 2. Tipos de Tilapia cultivados en México. ....	16
Tabla 3. Estudios donde se utiliza la DMFS como método de preparación de músculo de pescado como muestra .....	30
Tabla 4 Métodos recientes de análisis de parabenos, filtros UV y DEET en pescado.....	32
Tabla 5. Proporción de los disolventes para la fase móvil en una elución isocrática. ....	38
Tabla 6. Proporción de la fase móvil para una elución en gradiente lineal. ....	38
<i>Tabla 7. Proporciones de adsorbente sólidos utilizados en la optimización de la DMFS. ....</i>	<i>40</i>
<i>Tabla 8. Parámetros cromatográficos de los PCPs a diferentes proporciones de la fase móvil. ....</i>	<i>46</i>
Tabla 9 Tiempo de retención de los PCP's en minutos a 7.5 ppm.....	47
Tabla 10. Resultados de los parámetros de validación del sistema cromatográfico CLAR-UV .....	48
Tabla 11 Condiciones de extracción por DMFS y análisis CLAR-UV para músculo de Tilapia. .....	50
Tabla 12. Resultados de la validación del método DMFS-CLAR-UV.....	52

## Abreviaturas

PCPs: Productos de cuidado personal

DEET: N,N-Dietil-meta-toluamida

FPS: Factor de protección solar

BP-3: Benzofenona-3

EFS: Extracción en fase sólida

DMFS: Dispersión de matriz en fase sólida

CLAR: Cromatografía de líquidos de alta resolución

ACN: Acetonitrilo

C.V.: Coeficiente de variación porcentual

Rs: Resolución

tr: Tiempo de retención

t<sub>0</sub>: Tiempo muerto

tr': Tiempo de retención ajustado

W<sub>b</sub>: Ancho a la base

W<sub>1/2</sub>: Ancho a mitad de la altura del pico

K': factor de capacidad o de retención

α: Factor de selectividad

H: altura equivalente del plato teórico

N: Número de platos teóricos

MeOH: Metanol

LD: Límite de detección

LC: Límite de cuantificación

S/N: Relación Señal / ruido

CE: contaminantes emergentes

PTAR: plantas de tratamiento de aguas residuales

DE: disruptores endocrinos

MPB: metil parabeno

EPB: etilparabeno

PPB: propilparabeno

## Introducción

Los productos de cuidado personal (PCPs) son un grupo de contaminantes emergentes (CE) que en los últimos años han aumentado su introducción en el ambiente debido a la creciente preocupación por el mejoramiento del aspecto físico y la salud de las personas. El aumento en el consumo de artículos como cosméticos, jabones, fragancias sintéticas, plastificantes, agentes tensosactivos, protectores solares, repelentes, artículos del hogar, etc., provoca una excesiva generación de descargas de PCPs a los diferentes cuerpos de aguas tanto urbanas como naturales.

Los PCPs son arrastrados a los desagües domésticos después de su uso y las descargas llegan hasta las plantas de tratamiento de aguas residuales en niveles elevados. En la actualidad, la mayoría de estas plantas no están diseñadas para la eliminación completa de los PCPs y éstos terminan regularmente en los efluentes continuando con su ciclo de distribución en el ambiente.

Aunque la concentración de PCPs en los efluentes de aguas residuales sea relativamente baja, estos analitos se consideran como contaminantes pseudo-persistentes debido a su constante introducción en los ambientes acuáticos y generan graves impactos ecológicos sobre los organismos ya que algunos tienden a bioacumularse. Por lo anterior, es de suma importancia generar métodos sensibles que permitan su identificación y cuantificación en las diferentes matrices ambientales lo cual se puede lograr con el uso de métodos de preparación de muestras que faciliten el análisis de matrices complejas. La preparación de la muestra asegura la extracción, limpieza y preconcentración de los analitos de interés lo cual es importante para la determinación de analitos como los PCPs que se encuentran en concentraciones traza en el ambiente.

Actualmente, los métodos de preparación de muestra se enfocan en el respeto por el ambiente y la disminución de los costos mediante la miniaturización, automatización y simplicidad de las metodologías. [1-3]



De esta forma, en la presente tesis se aborda el desarrollo de una metodología analítica para la extracción y análisis de PCPs en muestras de músculo de pescado utilizando como método de preparación de muestra a la técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) y como técnica de análisis la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).

En el capítulo uno se presentan los antecedentes teóricos del trabajo como las propiedades de los analitos estudiados, la descripción de la muestra utilizada, los fundamentos básicos de las técnicas de extracción y análisis empleadas; así como una revisión general de los trabajos publicados recientemente que se relacionan con el tema de este trabajo.

En el capítulo dos se presentan las condiciones experimentales que se desarrollaron hasta obtener las condiciones óptimas de extracción y análisis de los PCPs, así como las condiciones con las que se probó el método analizando diferentes muestras comerciales.

En el capítulo tres se presentan y discuten los resultados más relevantes de la investigación, desde la optimización de la separación cromatográfica de los analitos hasta la aplicación del método con las condiciones óptimas de extracción y análisis.

En el capítulo cuatro se presentan las conclusiones de este trabajo y las perspectivas que se tienen con los resultados generados.

Finalmente, en la siguiente sección se presenta un resumen del trabajo desarrollado en esta tesis.

## Resumen

Actividades comunes como la higiene personal o el cuidado de la salud provocan alteraciones sobre nuestro entorno y el medio ambiente, dado que incorporamos a éste una serie de sustancias de diferente origen y naturaleza química, denominados “contaminantes emergentes”, de los cuales se sabe relativamente poco respecto a su incidencia en el ambiente ya que se encuentran a niveles traza, por lo cual se necesitan métodos analíticos sensibles capaces de determinar estos compuestos en matrices complejas. Este grupo de compuestos incluye a los productos de cuidado personal (PCPs) los cuales son ingredientes de jabones, cremas, perfumes, etcétera. Entre los PCPs que se estudiarán en el presente trabajo están los parabenos (conservadores), el N,N-dietil-meta-toluamida (repelente de insectos) y la benzofenona-3 (agente de protección solar) ya que son disruptores endócrinos.

Se desarrolló un método por Dispersión de la Matriz en Fase Solida (DMFS) seguida de un análisis de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) con detección UV/VIS para la cuantificación de contaminantes PCPs en músculo de pescado como matriz.

La DMFS se realizó en un paso previo al análisis cromatográfico, optimizando las cantidades de dos diferentes adsorbentes sólidos como florisil y C18, y la elución se realizó probando diferentes volúmenes de disolventes. Como método de cuantificación se empleó curva de calibración directa. El método desarrollado presentó buena sensibilidad permitiendo alcanzar límites de detección entre 0.5 y 0.7 mg/L y recobros globales entre 66.03-79.15% para todos los analitos.

Con esta metodología fue posible determinar de manera eficiente a los analitos en el músculo de pescado como matriz. Esta metodología tiene las ventajas de: utilizar la muestra sin ninguna preparación previa, necesitar un bajo consumo de disolventes y minimizar la presencia de interferentes en los extractos analizados.

# Objetivos

## Objetivo General

- Desarrollar una metodología analítica para la extracción de los analitos metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, N,N-dietil-meta-toluidina y benzofenona-3 en muestras de músculo de pescado mediante Dispersión de Matriz en Fase Sólida y su determinación por medio de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución que pueda aplicarse como método de monitoreo de los analitos en muestras comerciales.

## Objetivos Particulares

- Determinar las condiciones óptimas para la separación cromatográfica de los analitos y evaluar el desempeño del sistema.
- Realizar las pruebas de desempeño del sistema cromatográfico para el análisis de los compuestos en estudio
- Optimizar las condiciones de extracción de los contaminantes en músculo de pescado mediante la técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida.
- Realizar la validación del método desarrollado evaluando la linealidad, exactitud, precisión y límites de detección y cuantificación.
- Aplicar la metodología desarrollada al análisis de muestras comerciales de músculo de *Tilapia mojarra*.

# Capítulo 1. Antecedentes

## *1.1 Contaminantes emergentes*

Los contaminantes emergentes (CE) son compuestos que anteriormente no estaban considerados como tal o que aún no son regulados por las diferentes agencias ambientales en el mundo. En este grupo de compuestos se consideran a las sustancias que son introducidas al ambiente causando efectos negativos a los ecosistemas y/o la salud humana, por lo que son candidatos a ser incluidos en futuras regulaciones. Se tiene escasa información acerca de su presencia e impacto en el medio ambiente, razón por la cual todavía no existen normativas sobre ellos.

Una característica de estos contaminantes es que son pseudo-persistentes debido a su constante introducción en el ambiente por el elevado consumo y fácil acceso de los productos que contienen CE entre la población mundial, causando efectos adversos a los ecosistemas [4, 5]. Se ha establecido que estos compuestos entran en el ambiente a través de aguas residuales de tipo doméstico, industrial, efluentes hospitalarios, actividades agrícolas y ganaderas, de tal forma que los efluentes de estas actividades humanas llevan estos compuestos hacia las plantas de tratamiento de aguas residuales en las cuales no son eliminados completamente puesto que la mayoría de éstas no son diseñadas para la remoción de los CE.

La liberación de efluentes de aguas residuales ha sido considerada una de las principales causas de la presencia de CE en aguas superficiales en comparación con otras fuentes. A raíz de los procesos de tratamiento, algunos CE están sometidos a diversos grados de atenuación natural (por ejemplo, la dilución en agua superficial, adsorción sobre los sólidos en suspensión y los sedimentos, la fotólisis directa e indirecta y la biodegradación aeróbica) siendo su persistencia en aguas superficiales a niveles de al menos un orden de magnitud inferior a los niveles de contaminación de las aguas residuales. Sin embargo, ciertos CE son capaces de generar alteraciones principalmente a organismos acuáticos aún en concentraciones muy bajas [6].

La gran mayoría de los CE son una preocupación ecotoxicológica considerable, ya sea como compuestos únicos o también cuando están presentes en mezclas complejas. [7]

### **1.1.1 Clasificación de los contaminantes emergentes.**

Dentro del término contaminantes emergentes se engloban una gran variedad de compuestos químicos de diverso origen y naturaleza. Aunque no existe un listado oficial de contaminantes emergentes, en la figura 1 se muestra una clasificación general de los contaminantes emergentes de interés en nuestro país.[8]

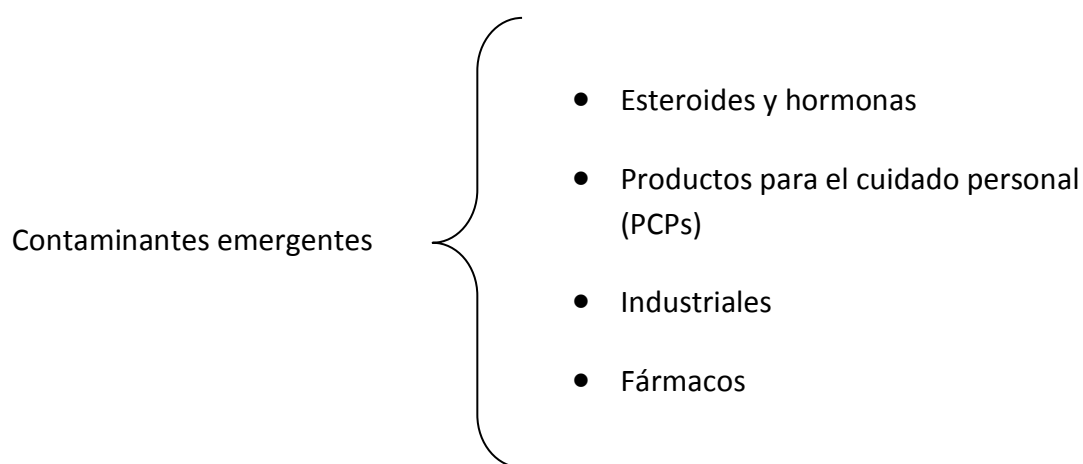


Figura 1. Contaminantes emergentes de interés para México (8)

Uno de los grupos de interés dentro de los contaminantes emergente, son los productos de cuidado personal (PCPs) en los cuáles se centra la investigación del presente trabajo.

### **1.1.2 Productos de Cuidado Personal.**

Los productos de cuidado personal (PCPs) son un grupo de contaminantes emergentes que provienen principalmente de los productos cosméticos, entre los que se incluyen: cremas, lociones, jabones, perfumes, maquillajes, labiales, desodorantes, anti transpirantes, pastas dentales, protectores solares, champús y muchos otros. Se utilizan principalmente para mejorar la calidad de vida y el aspecto de las personas convirtiéndose en productos indispensables para la sociedad moderna.[7]

Los PCPs se pueden clasificar en diversos grupos de compuestos, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de los Productos de Cuidado Personal [9-11]

<b>Productos de cuidado personal</b>	<b>Almizcles sintéticos/ Fragancias</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Xileno almizclado</li> <li>○ Cetona de almizcle</li> <li>○ Galaxolida</li> </ul>
	Repelentes de insectos	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ DEET (N,N-dietil-m-toluamida)</li> <li>○ Icaridina</li> </ul>
	Compuestos antimicrobianos/ desinfectantes	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Triclosan</li> <li>○ 2-Fenilfenol</li> <li>○ 4-clorocresol</li> <li>○ Cloropreno</li> <li>○ Bromopreno</li> <li>○ 4 - cloroxilenol</li> </ul>
	Protectores solares	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Benzofenona-3</li> <li>○ 4-MBC (4-metilbencilideno alcanfor)</li> <li>○ EHMC (2 - etil-hexil-4-trimetoxicinamato)</li> </ul>
	Antioxidantes y conservadores	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Fenoles</li> <li>○ Parabenos</li> </ul>

Una de las principales preocupaciones planteadas por la presencia de PCPs en el ambiente acuático es su capacidad para interferir con el sistema endócrino para producir efectos indeseados como pueden ser: alteración de las funciones sexuales en los animales, causando la feminización, disminución de la fecundidad y anomalías en el desarrollo algunos organismos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) define los compuestos disruptores endocrinos (DE) como aquella "sustancia o mezcla exógena que altera la(s) función(es) del sistema endocrino y en consecuencia, provoca efectos adversos a la salud

en un organismo, su progenie o sub-población”. Entre los DE se pueden incluir un amplio grupo de sustancias químicas de origen natural o sintético que son utilizados ampliamente como productos de consumo para el cuidado personal. [12, 13]

La movilidad de los PCPs en el ambiente comienza desde las descargas de aguas residuales domésticas o industriales y se convierte en un ciclo donde los contaminantes pueden regresar a los humanos a través de otras vías de exposición. En la figura 2 se presenta el ciclo que la mayoría de los analitos considerados como PCPs puede presentar.

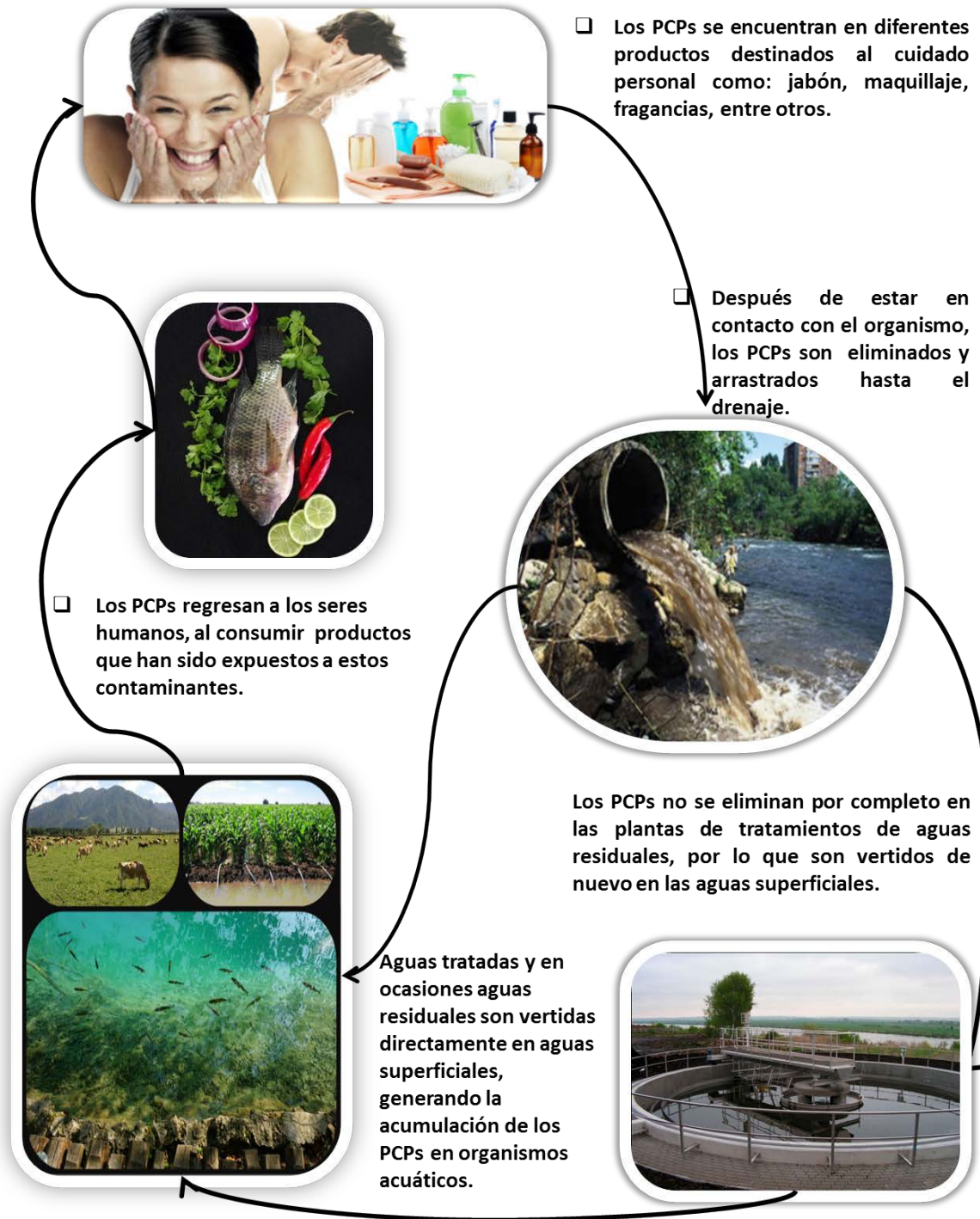


Figura 2. Ciclo de los productos de cuidado personal en el ambiente [14].



## 1.2 Propiedades de los Productos de Cuidado Personal (PCPs) y su toxicidad

### 1.2.1 Parabenos

Los parabenos son una familia de ésteres del ácido p-hidroxibenzoico, todos los miembros de esta familia tienen en común en su estructura un anillo de benceno, un grupo hidroxilo y un grupo éster en la posición *para* del anillo de benceno. Los compuestos difieren en la longitud de la cadena alquílica del grupo éster el cual puede ser un metil, etil, propil, butil, etc. [15]

Los parabenos son compuestos con una gran estabilidad química, estabilidad térmica, son resistentes a la hidrólisis en soluciones ácidas, mientras que la hidrólisis es apreciable en soluciones alcalinas ( $\text{pH} \geq 7$ ) formando ácido p-hidroxibenzoico y el alcohol correspondiente. [16, 17]

Estos compuestos son ampliamente utilizados como agentes antimicrobianos y conservadores en productos como: cosméticos, alimentos, preparaciones farmacéuticas, etc. Las principales características por las cuales en la industria de los productos de cuidado personal son ampliamente utilizables los parabenos son:

- Amplio espectro de actividad contra levaduras, mohos y bacterias.
- Estabilidad química en un intervalo de pH entre 4.5 y 7.5
- Inertes
- Suficiente solubilidad en agua (permite obtener la concentración efectiva)
- Bajos costos de producción
- No añaden olor o sabor
- No provocan cambio en la coloración o consistencia de los productos. [16]

A medida que aumenta la cadena del grupo éster, la actividad antimicrobiana es mayor, por ejemplo, el butilparabeno es cuatro veces más eficaz inhibiendo el crecimiento microbiano que el etilparabeno [16-18]

Diversos estudios han reportado que los parabenos con cadenas lineales largas por lo general tienen mayor persistencia en el ambiente, por tal motivo los parabenos más utilizados son metilparabeno y etilparabeno. Anteriormente se había considerado que los parabenos tenían baja toxicidad pero, algunos estudios han sugerido que pueden perturbar el sistema endocrino y afectar las funciones de ambos sistemas reproductivos masculino y femenino, aumentando el riesgo de cáncer de mama en las mujeres.

La eliminación del grupo éster de los parabenos no elimina su actividad estrogénica por lo que su principal metabolito es el ácido p-hidroxibenzoico que también puede ser tóxico. Es de suma preocupación el hecho de que estos compuestos se han detectado en los seres humanos en orina, sangre, suero e incluso leche materna, cuando han estado expuestos a los parabenos. Los cuatro parabenos que son más detectados comúnmente en medios acuáticos son metilparabeno (MPB), etilparabeno (EPB), propilparabeno (PPB) y butilparabeno (BPB) [19-21]

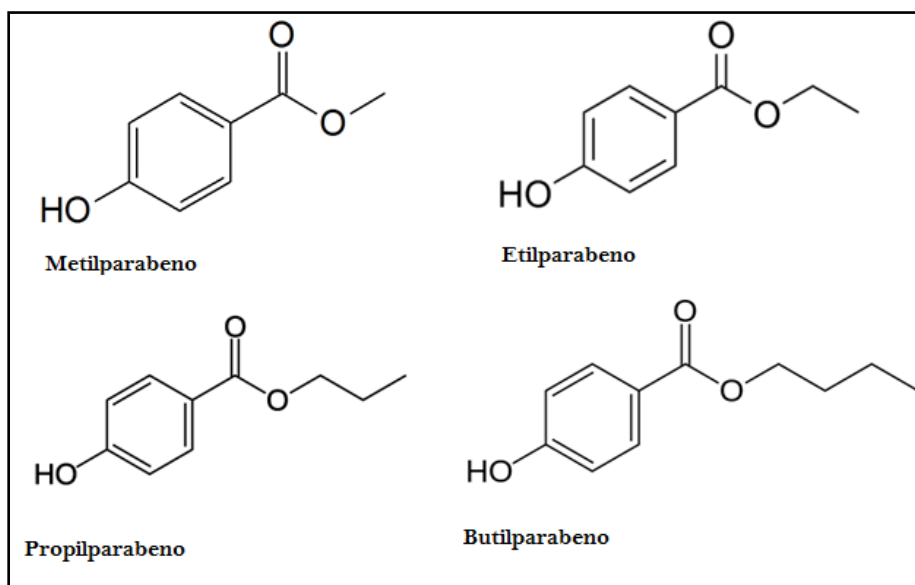


Figura 3. Estructura química de los parabenos más utilizados en productos de cuidado personal.

### 1.2.2 *N,N*-Diethyl-*meta*-toluamida

El compuesto *N,N*-diethyl-*meta*-toluamida (DEET) ha sido utilizado como uno de los repelentes de insectos más efectivos durante décadas. Su estructura química se muestra en la figura 4. El DEET fue desarrollado por el ejército de los EE.UU. en el año de 1946 con el fin de proteger a los soldados en zonas infestadas de insectos y desde 1957 los repelentes de insectos que contienen DEET son ampliamente utilizados por el público en general. Este compuesto ha sido considerado de gran importancia para la salud pública porque repele los insectos que son portadores de enfermedades tales como las garrapatas de los venados asociados con la enfermedad de Lyme, los mosquitos que transmiten paludismo, la encefalitis, la fiebre del dengue, el virus del Nilo Occidental y el Zika. [22] El DEET está disponible en varios tipos de formulaciones como aerosoles, en forma líquida, cremas y materiales impregnados como pulseras, por lo que su uso no se ve regulado y es de libre uso.

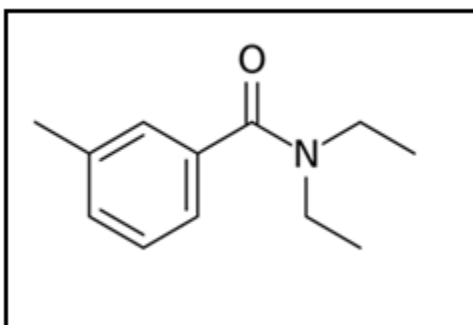


Figura 4. Estructura química de DEET

A pesar de su amplia utilización y eficacia, existen preocupaciones por la comunidad científica sobre la elevada exposición de los seres humanos a este compuesto debido a que se ha observado que presenta una elevada absorción cutánea permitiendo la entrada de grandes cantidades en el torrente sanguíneo, los cuales están asociados a posibles repercusiones a la salud e incluso podría ocasionar toxicidad a nivel del sistema nervioso central de algunos individuos produciendo desde convulsiones hasta encefalopatía en niños.

Es más preocupante el hecho que el uso simultáneo de DEET y benzofenona-3 (BP-3), ingrediente activo en los productos de protección solar, potencia la absorción percutánea de ambos compuestos aumentando los niveles de exposición al organismo. [23]

### **1.2.3 Benzofenona-3**

Los filtros UV son compuestos orgánicos o inorgánicos usados en la elaboración de diversos productos con el propósito de filtrar la radiación ultravioleta.

La benzofenona-3 (BP-3) o 2-hidroxí-4-metoxi benzofenona puede absorber y disipar la luz solar en regiones de los rayos UVA y UVB con limitada foto-transformación constituyendo así una de las sustancias más utilizadas como filtros de protección UV en productos como: cremas, perfumes, champús, productos de revestimientos para prevenir la decoloración, en polímeros, adhesivos. Con el fin de impedir la foto-degradación, también la BP-3 es utilizada en plásticos y cartones, para evitar la degradación de polímeros, por lo que en los productos alimentarios empaquetados es común la migración de BP-3 a los alimentos.[24]

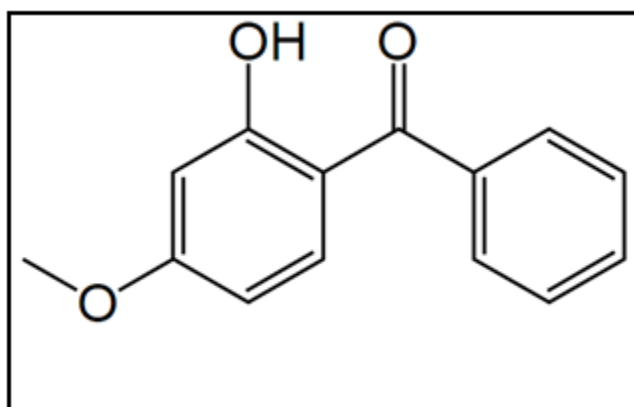


Figura 5. Estructura química de la Benzofenona-3

En los últimos años, se ha incrementado la preocupación por el aumento de la radiación ultravioleta a la que los seres humanos están expuestos ya que las radiaciones de longitudes de onda de los rayos UVA y UVB son suficientemente fuertes para dañar el ADN, causando desde quemaduras solares hasta riesgo de cáncer de piel, convirtiéndose así, en una amenaza y generando un aumento exponencial en el uso de protectores solares. Incluso, varios de los productos de cuidado personal los han incluido en sus formulaciones siendo

BP-3 uno de los principales ingredientes. Los productos de cuidado personal que contienen un factor de protección solar (FPS) alto han ganado gran popularidad entre los consumidores, generando un incremento a la exposición de la población a los filtros UV propiciando su introducción en las aguas marinas, residuales y por consiguiente en ríos, lagos y océanos. Por lo anterior, no es sorprendente que los filtros UV se encuentren dispersos en el ambiente.

Estudios recientes indican que los agentes de protección solar, incluida la BP-3 son persistentes, bioacumulables y muestran actividad de alteración endócrina en los seres humanos, otros mamíferos, anfibios y en varias especies de peces. BP-3 ha sido detectada en varias matrices como aguas superficiales, sedimentos, en leche humana y en pescados por lo cual se considera como vía de exposición humana la ingesta de alimentos contaminados con BP-3. [18, 24, 25]

### 1.3 Organismo de estudio: Tilapia mojarra

La Tilapia o Tilapia mojarra es un pez de origen africano perteneciente a la familia *Cichlidae*, la palabra Tilapia proviene de la palabra nativa de Bechuana (África) “thlape” que tiene por significado “pez”.



Figura 6. Tilapia mojarra (*Oreochromis urolepis homorum*)

Su distribución geográfica comprende América Central, sur del Caribe, sur de Norteamérica, sudeste asiático, medio Oriente y África. Su ciclo de vida empieza con la incubación la cual es bucal y dura de 3 a 6 días, los machos maduran de los 4-6 meses y las hembras de 3-5 meses. Esta especie habita en aguas dulces (ríos, embalses,

arroyos y lagos) y tolera amplios intervalos de salinidad así que puede habitar ambientes acuáticos salobres (lagunas costeras y estuarios). La Tilapia es un organismo omnívoro ya

que se alimenta consumiendo plancton, invertebrados, larvas de peces, plantas acuáticas, algas e incluso materia orgánica en descomposición.

La Tilapia posee una gran capacidad de adaptación a diferentes temperaturas, rápido crecimiento, alta eficiencia en la conversión del alimento, mayor tolerancia a condiciones de baja calidad del agua y además es resistente a parásitos y enfermedades. Tales características permiten cultivarla y manejarla con relativa facilidad en comparación con otras especies de peces [26-28].

### ***1.3.1 Producción de Tilapia mojarra en México***

El cultivo de la Tilapia se inició en México en 1964, con la importación de los primeros ejemplares procedentes de los Estados Unidos, Alabama y Auburn, los cuales fueron depositados en la estación piscícola de Temascal, Oaxaca. Las primeras especies introducidas fueron la Tilapia herbívora, Tilapia naranja y Tilapia mozambique, las cuales se distribuyeron ampliamente en una gran cantidad de cuerpos de agua naturales y artificiales pertenecientes a las zonas tropical y templada del país. Posteriormente, en 1978 se introdujo la especie Tilapia de Nilo en el mismo sitio, procedente de Panamá. Con la llegada al país de la Tilapia roja en 1981, proveniente de los Estados Unidos, se implementaron programas de reproducción controlada en jaulas flotantes, distribuyéndose a los centros acuícolas de Zacatepec y el Rodeo, en el estado de Morelos.

A partir de 1987 tanto el Gobierno Federal, como los Gobiernos Estatales y algunos productores privados, introducen algunas nuevas variedades, como la Tilapia híbrido rojo, procedente de Puerto Rico, la Tilapia blanca conocida como Rocky Mountain y la Tilapia mojarra entre otras. [27]

En México se cultivan ocho tipos de Tilapia principalmente las cuales se presentan en la tabla 2. [29]

Tabla 2. Tipos de Tilapia cultivados en México.

<b>NOMBRE COMÚN</b>	<b>NOMBRE CIENTÍFICO</b>
<b>Tilapia herbívora</b>	Tilapia rendalli
<b>Tilapia del Nilo</b>	Oreochromis niloticus
<b>Tilapia Stirling</b>	Oreochromis niloticus variedad. Stirling
<b>Tilapia blanca</b>	Oreochromis niloticus variedad Rocky Mountain
<b>Tilapia de Mozambique</b>	Oreochromis aureus
<b>Tilapia naranja</b>	Oreochromis mossambicus variedad naranja
<b>Tilapia mojarra</b>	Oreochromis urolepis homorum
<b>Tilapia roja de Florida (híbrido)</b>	Oreochromis sp

El cultivo de Tilapia ha sido popularizado debido a las cualidades que presenta este organismo ya que su carne posee un excelente sabor, el organismo tiene un crecimiento rápido, gran resistencia física, alta capacidad reproductora y adaptación para vivir en condiciones de cautiverio. En los últimos años el consumo de mojarra se ha posicionado en el lugar 4 (Figura 7), siendo uno de los productos pesqueros de mayor consumo en México.

A nivel mundial, México ocupa el décimo lugar en producción de Tilapia, con más de 120 mil toneladas al año y es Jalisco el estado líder en producción, seguido por Chiapas y Veracruz. La Tilapia que se produce en México tiene dos destinos: el repoblamiento de embalses y el consumo humano.

## Consumo de productos pesqueros en México

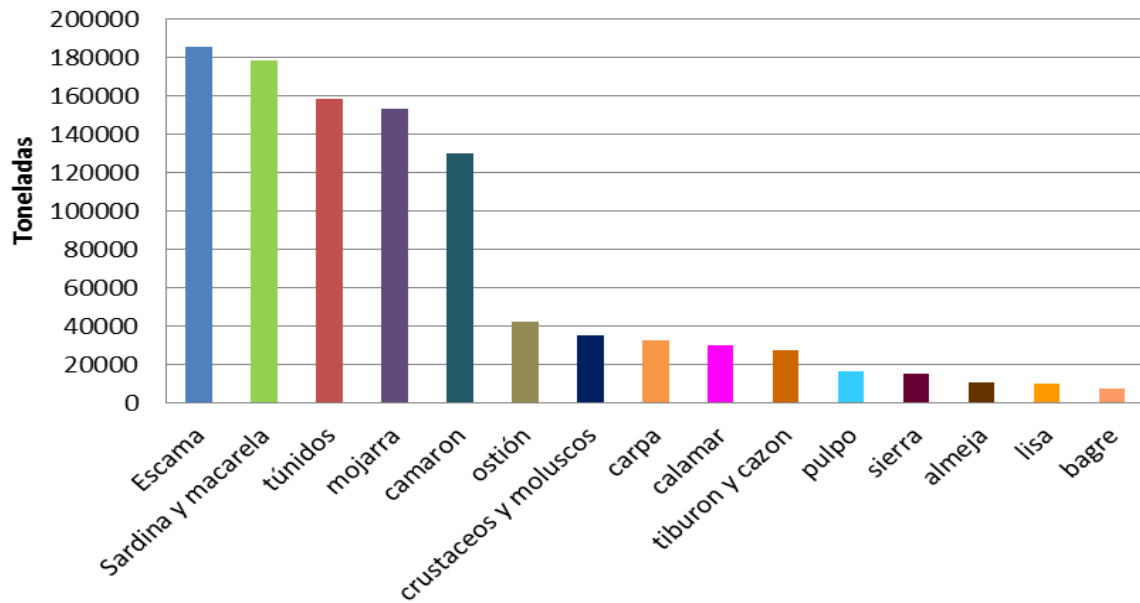


Figura 7. Consumo nacional aparente de productos pesqueros en el año 2013 [30]

El cultivo de Tilapia mojarra tiene una gran importancia en México, que es de esta actividad de la cual se obtiene mayoritariamente este producto que de su captura, lo anterior se representado en la figura 8.

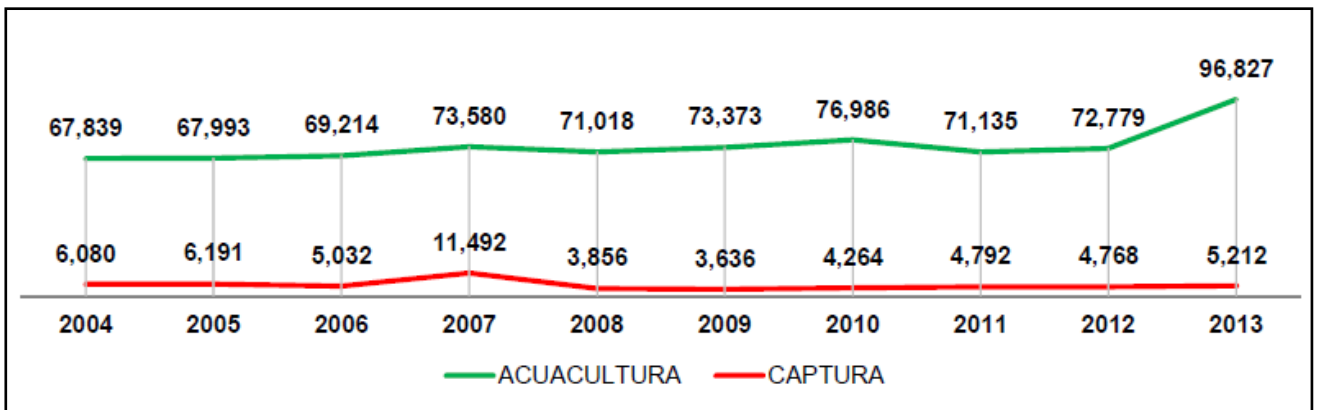


Figura 8. Serie histórica de la producción de mojarra, peso vivo en toneladas.[30]



## **1.4 Dispersión de matriz en fase sólida**

La dispersión de matriz en fase sólida (DMFS) es una técnica desarrollada en 1989 por S. Barker y colaboradores. Inicialmente la técnica se utilizaba para la preparación, extracción y fraccionamiento de muestras sólidas. Sin embargo, su uso se ha extendido a muestras semisólidas, viscosas e incluso muestras líquidas. La DMFS ha encontrado aplicación en numerosos campos, pero ha demostrado ser particularmente aplicable para el análisis de fármacos, contaminantes, pesticidas y otros componentes de matrices muy diversas.

El fundamento de la DMFS consiste en homogenizar la muestra con un agente dispersante con el objetivo de garantizar el proceso de disrupción de la muestra y al mismo tiempo generar una nueva fase que posee características particulares las cuales permitirán la extracción de los compuestos de interés de una muestra dada. La selectividad de la técnica depende básicamente de la naturaleza del agente dispersante y de las propiedades del solvente utilizado para la elución. [31]

### ***1.4.1 Metodología general de la DMFS***

El procedimiento general de la DMFS consiste de tres pasos:

I. Dispersión de la muestra en el material de soporte sólido.

La dispersión de la muestra sólida o semisólida se realiza en un mortero no poroso, puede ser de vidrio o ágata, junto con el material de soporte sólido y con ayuda del pistilo se realiza la homogenización. En este paso la dispersión de la muestra puede variar dependiendo del analista, por lo general se logran resultados con buena precisión y exactitud.

II. Empaque de la columna.

La mezcla resultante del paso anterior, es transferida y empacada en su totalidad en una columna de material inerte, generalmente se utiliza una jeringa vacía o un cartucho para extracción en fase sólida (EFS) con un frit en el fondo el cual ayuda a contener el material dentro del cartucho. La mezcla transferida se cubre con otro frit y se comprime con un

émbolo de jeringa. Se debe evitar la formación de canales en la columna y no se debe sobre comprimir o compactar el material ya que es preferible una estructura porosa que permita mayor contacto entre disolvente de extracción y los analitos.

En ocasiones se utilizan co-columnas de otro tipo de materiales sólidos, que puede incorporarse dentro de la columna de dispersión o en una columna aparte y se utilizan como etapas adicionales de limpieza mejorando el aislamiento de los analitos del resto de componentes de la matriz.

### III. Elución selectiva de los analitos de interés

Para la extracción de los analitos, los cuales ya se encontrarán adsorbidos en la superficie de las partículas de la fase sólida, se aplica el disolvente adecuado o una secuencia de disolventes puede usarse para la limpieza de la columna previa a la elución del compuesto en primera instancia. En este punto es importante lograr un flujo adecuado del paso de los disolventes por la columna por medio de la gravedad, aplicando presión o con bombas de vacío. [32, 33]

En la figura 9. Se representa gráficamente los pasos comunes que suele incluirse en los métodos desarrollados con la técnica de DMFS.

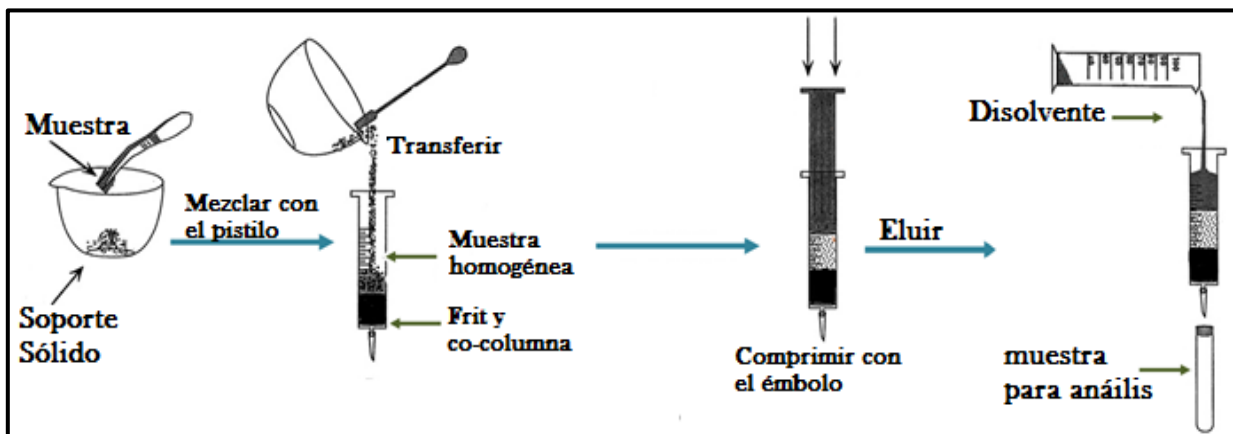


Figura 9 Representación gráfica de la técnica DMFS.[33]

### ***1.4.2 Factores a considerar en la DMFS***

- La columna de DMFS: Al tener carácter cromatográfico único debido a las interacciones analito-soporte-matriz, se rige por los principios de la cromatografía convencional, este sistema no solo depende de las interacciones dinámicas que involucran a la fase estacionaria, al soporte sólido y a la fase móvil, sino también de las interacciones que involucran a los componentes de la matriz. Es importante tener en cuenta que la muestra dispersa forma parte de la columna misma y en sentido estricto es parte del sistema cromatográfico. En DMFS las interacciones dinámicas involucradas no se comprenden del todo, sin embargo, se conocen varios factores que han mostrado afectar la eficiencia del proceso, los cuáles se mencionan a continuación.[32]
- Naturaleza del soporte sólido: El uso de fases a base de sílice como soporte para la DMFS es el más utilizado. Un aspecto positivo al usar este tipo de adsorbente es la presencia de grupos silanoles sin derivatizar, los cuales son capaces de formar puentes de hidrógeno con las moléculas de agua, lo que permite obtener una mezcla homogénea seca lo que facilitará el empaque del cartucho y la elución. Al homogenizar la fase sólida con la muestra por medio del mortero y pistilo se ejerce la acción abrasiva del soporte sobre la muestra, pero las fases enlazadas son las que permiten la ruptura y dispersión completa de los componentes de la muestra con base en interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas obedeciendo a sus polaridades relativas. Al utilizar materiales como C18 unidas a la sílice se promueve a la ruptura celular y por lo tanto la dispersión total de la muestra es evidente.
- La naturaleza de la muestra: Debido a que la matriz de la muestra forma parte de la fase cromatográfica, existe interacción de esta en el sistema por lo que se esperaran variaciones en los recobros de los analitos al cambiar de una matriz a otra. Los componentes de la matriz eluyen dependiendo del solvente que se emplea y de las interacciones dinámicas entre los componentes de la matriz dispersa y la fase sólida. De esta forma los analitos no prioritarios pertenecientes a la matriz también tienden a eluir en fracciones que no son del todo predecibles por su distribución relativa en la

fase sólida o el disolvente de elución. Lo anterior permite explicar el hecho de que analitos de ciertas clases químicas co-eluyen con los componentes de la matriz, en las mismas fracciones de interés, en muchos casos estos componentes interferentes provenientes de la matriz pueden ser removidos aplicando disolventes de fuerza eluyente baja.

- Relación muestra/adsorbente: La relación más utilizada es una parte de muestra y cuatro de adsorbente (1:4) propuesta por Barker, pero esta relación tiende a variar y depende de la aplicación y debe ser evaluada la mejor posible durante el desarrollo del método.
- La naturaleza del disolvente de elución y la secuencia de elución: Según la naturaleza del disolvente respecto a la de los compuestos unidos al soporte sólido se determinará si los analitos permanecerán en el cartucho de extracción o si serán eluidos. El diseño de un perfil de elución debe enfocarse principalmente en incrementar lo más posible la retención de los componentes de la matriz (interferentes) mientras que se eluye a los analitos de interés con un alto grado de especificidad o por el contrario eliminar las sustancias interferentes para la posterior recuperación de los compuestos de interés. El extracto obtenido puede llegar a ser lo suficientemente limpio para llevarse directamente a un análisis, aunque en otras ocasiones se deberá aplicar alguna otra técnica de limpieza. [32-34]

## 1.5 Cromatografía de líquidos

A principios de la década de 1900, Mikhail Tswett botánico ruso condujo al descubrimiento de lo que hoy conocemos como cromatografía, por medio de un experimento cuyo objetivo era demostrar su capacidad de separar diferentes extractos vegetales por medio de una columna de vidrio rellena de  $\text{CaCO}_3$  finamente dividido.

El nombre de cromatografía que Tswett utilizó para describir esta técnica se deriva del griego *chroma* “color” y *graphein* que significa “escribir” por lo tanto se define como: “escribir en color”, debido a que observó bandas coloreadas en sus columnas de carbonato de calcio, aunque puntualizo que no solo se podían separar sustancias coloreadas, actualmente se sigue utilizando el nombre de cromatografía por motivos históricos.

La cromatografía en sus orígenes era una técnica únicamente de separación que se transformó en una técnica de análisis cuando ésta se acopló con un dispositivo para monitorear a las especies químicas que se iban separando. De esta forma, la cromatografía se ha convertido en un método que permite separar, identificar y cuantificar uno o más componentes presentes en una mezcla [35, 36].

### 1.5.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

Como consecuencia de la cromatografía líquida clásica surge la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR), técnica que se optimizó al incrementar la eficiencia de las columnas mediante la disminución del tamaño de partícula del adsorbente utilizado como fase estacionaria hasta tamaños del orden de los micrómetros para conseguir un aumento de la superficie de contacto del analito con la fase estacionaria. La disminución del tamaño de partícula de la fase estacionaria aumenta la presión del sistema lo que implicó el desarrollo de sistemas capaces de distribuir la fase móvil en la columna de manera constante. Estos cambios requirieron de instrumentación especial que permita el análisis en esas condiciones de altas presiones.

El equipo de CLAR convencional debe contar con:

- contenedores de la fase móvil.
- un sistema de bombeo de la fase móvil.
- un sistema de inyección para introducir la muestra.
- una columna cromatográfica en donde se lleve a cabo la separación de los componentes de la muestra.
- un detector que registre la respuesta de los analitos en función del tiempo de análisis.
- un dispositivo para procesar y visualizar los resultados.[37]

En la figura 10, se muestra una fotografía del sistema cromatográfico utilizado en el desarrollo de esta tesis.

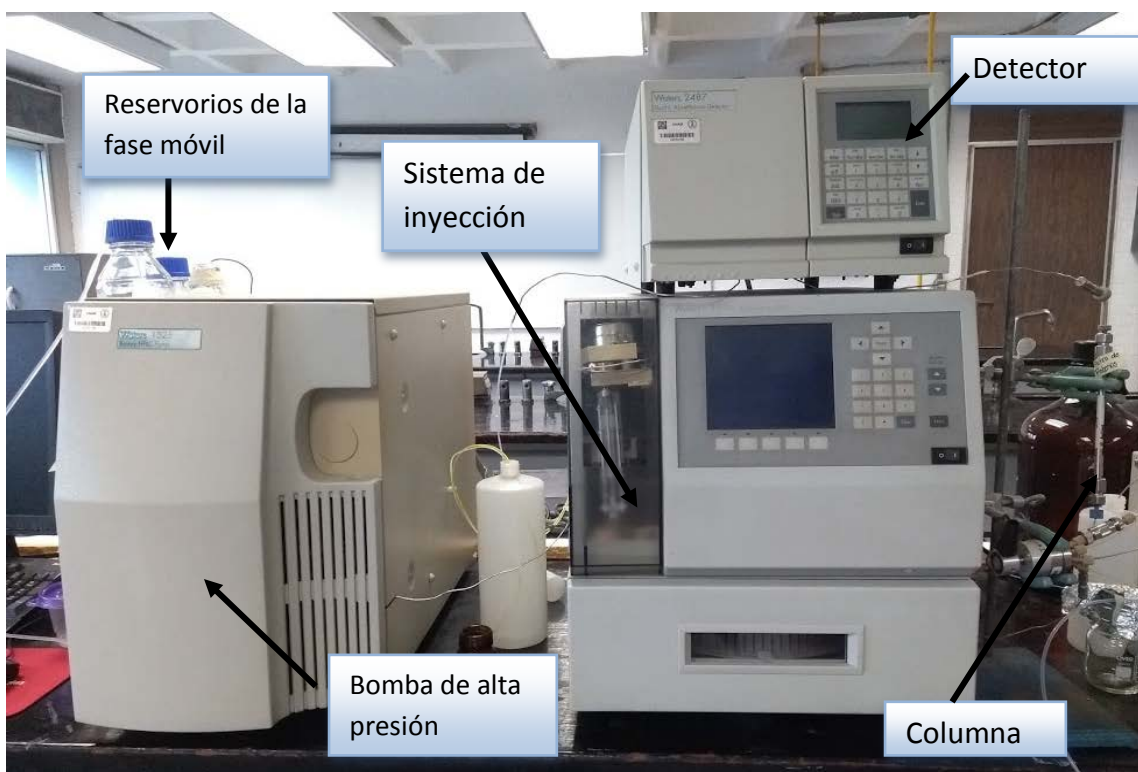


Figura 10 Fotografía del cromatógrafo de líquidos de alta resolución utilizado en el desarrollo de la tesis.

La CLAR se puede clasificar de acuerdo a la polaridad relativa de la columna cromatográfica utilizada en dos grandes grupos que son:

*Cromatografía de fase normal.* Fue el primer tipo de cromatografía de líquidos desarrollado. En este método se usa una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar, como hexano, tetracloruro de carbono, benceno, etc. La adsorción del analito depende de su polaridad, afectando directamente el tiempo de elución. Los disolventes polares ayudarán a disminuir este tiempo de retención, mientras que los disolventes no polares lo aumentan.

*Cromatografía de fase reversa:* Este tipo de cromatografía es la más común. En esta técnica se usa una fase estacionaria no polar y una fase móvil moderadamente polar. La fase estacionaria típica es sílice químicamente modificada con grupos como hidrocarburos saturados C18 (octadecil), C8 (octil), C4 (tetrametil), C2 (dimetil). Mientras que la fase móvil de naturaleza polar puede ser: agua, acetonitrilo, soluciones amortiguadoras de pH, metanol o mezclas de agua con disolventes orgánicos. El mecanismo de la separación en cromatografía de fase reversa depende de interacciones hidrofóbicas entre las moléculas de soluto en fase móvil y el ligando hidrofóbico inmovilizado en la fase estacionaria. [35, 38]

El proceso de separación cromatográfica se da como resultado de la capacidad de la fase estacionaria para retener a los diferentes componentes de una muestra y se realiza en repetidos procesos de interacción durante el movimiento de los componentes de una mezcla arrastrados por adición sucesiva de la fase móvil (eluyente). Estas adiciones sucesivas a lo largo de la fase estacionaria (elución) producen la separación debido a las diferencias en las constantes de distribución de los componentes de la mezcla entre la fase estacionaria y la fase móvil.

La elución de los analitos se puede realizar de dos formas: Elución isocrática, cuando se emplea un único disolvente o una mezcla de disolventes de composición constante y elución en gradiente, cuando se emplea una mezcla de disolventes cuya concentración se hace variar a lo largo del proceso.[39]

Finalmente con ayuda de un dispositivo (detector) que responda a la medida de alguna de las propiedades de las moléculas de la muestra se puede registrar el resultado de la separación denominado como cromatograma.

Un cromatograma es un gráfico que representa la respuesta del detector a la señal de la concentración del soluto en función del tiempo de elución, representada idealmente de picos gaussianos y cada pico corresponde a un componente de la muestra original (figura11), por medio del cromatograma se puede obtener tanto información cualitativa como cuantitativa por medio de diferentes parámetros que se mencionan a continuación.

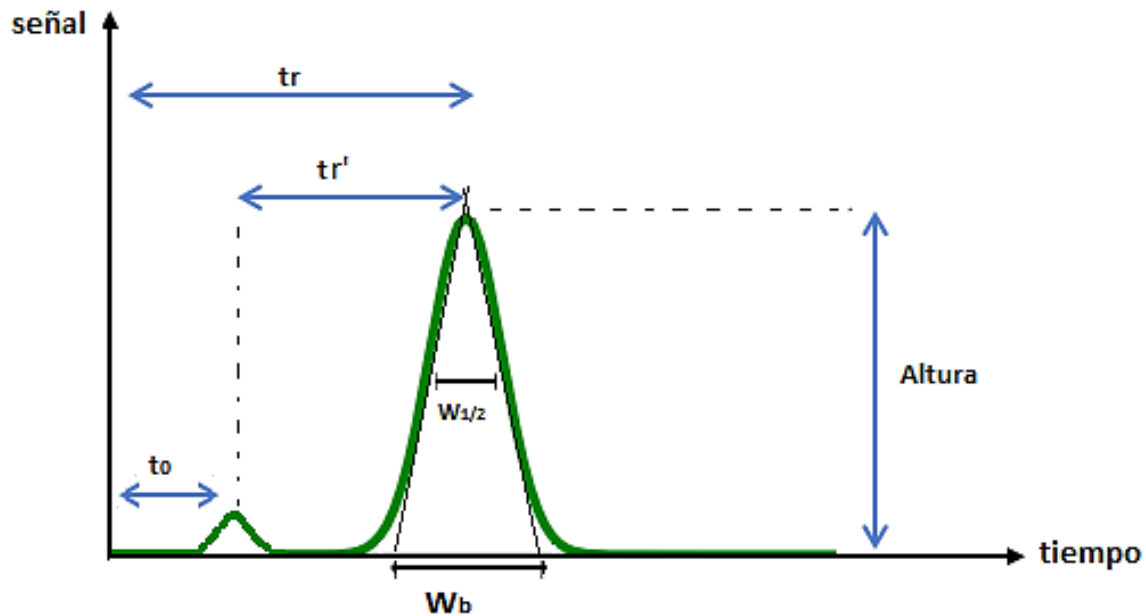


Figura 11. Cromatograma y sus partes. [40]



### 1.5.2 Parámetros cromatográficos.

*Tiempo de retención,  $t_r$* : tiempo en el que un soluto permanece en la columna, este se mide desde el momento de la inyección de la muestra hasta la elución y detección del analito.

*Tiempo muerto,  $t_0$* : tiempo que pasa un analito que no es retenido por la columna en el sistema cromatográfico desde la inyección hasta su paso por el sistema de detección.

*Tiempo de retención ajustado,  $t_r'$* : Tiempo efectivo en el que el analito permanece en la fase estacionaria. Se calcula con la relación:

$$t_r' = t_r - t_0 \dots\dots\dots \text{Ec. 1}$$

*Ancho a la base,  $W_b$* : es la posición de la línea base intersectada por las tangentes al pico cromatográfico.

*Ancho a mitad de la altura del pico  $W_{1/2}$* : la anchura del pico medida a la mitad de la altura [40]

*Factor de capacidad o de retención ( $k'$ )*: Parámetro utilizado para describir las velocidades de migración de los analitos en la columna. Es una medida del tiempo transcurrido de los analitos en la fase estacionaria en relación con el tiempo transcurrido en la fase móvil y se interpreta considerando que mientras mayor sea el valor de este factor menor es la velocidad de migración de los solutos en la columna, es generalmente recomendable que los valores de  $k'$  de los compuestos de interés se encuentren en un intervalo de 2 a 10. En términos experimentales los cuales pueden ser tomados de un cromatograma, este factor se calcula de la siguiente manera:

$$k' = \frac{(t_r) - t_0}{t_0} \dots\dots\dots \text{Ec. 2}$$

*Factor de selectividad ( $\alpha$ ):* Es una medida de la capacidad que tiene el sistema para diferenciar los picos correspondientes a cada compuesto de la mezcla. Es un término que define la efectividad de la separación de dos compuestos.

El factor de selectividad se define como:

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{t'_B}{t'_A} \dots\dots\dots Ec. 3$$

*Eficiencia de la columna:* Si en el análisis cromatográfico no se toma en cuenta los factores que afectan el ancho de un pico para la separación cromatografía no se podría lograr una buena separación aun cuando se tenga un factor de selectividad alto para estos picos en una columna en particular. Es decir, mientras mayor es la capacidad de la columna de producir picos más estrechos mayor es su eficiencia.

La eficiencia de la columna está relacionada con el ensanchamiento del pico y se calcula:

$$N=16 \left( \frac{t_R}{W_b} \right)^2 = 5.54 \left( \frac{t_R}{W_h} \right)^2 \dots\dots\dots Ec. 4$$

La eficiencia de la columna cromatográfica aumenta cuando mayor es el número de platos.

*Resolución ( $R_s$ ):* Constituye una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos. Los parámetros que contribuyen en la resolución de los picos son la selectividad, la eficiencia o número de platos teóricos y el factor de retención. Estos parámetros se relacionan en una ecuación de la siguiente manera.

$$R_s = \frac{(\sqrt{N})}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k_2}{1 + k_2} \right) \dots\dots\dots Ec. 5$$

La resolución mínima aceptable en mezclas sencillas es 1.0, una resolución 1.5 representa separación a la línea base. [40, 41]

## **1.6 Metodologías de análisis de PCPs en muestras de músculo de pescado.**

En la tabla 3, se resumen algunos de los trabajos publicados sobre el análisis de PCPs en músculo de pescado. En estos trabajos se utiliza la DMFS como método de preparación de muestra. En general dichos estudios se llevaron a cabo con una cantidad de muestra relativamente baja entre 0.1 y 2 gramos. En la mayoría de los estudios se utilizaron materiales apolares como fase dispersante siendo la C18 la más utilizada. Recientemente se han incorporado nuevos materiales como los polímeros molecularmente impresos que extraen selectivamente a los analitos de interés.

La proporción utilizada de muestra /material dispersante varía dentro de una proporción que va de 1: 1 a 1: 4 tal como lo sugiere la técnica de DMFS descrita por Barker[33]. La elución de los analitos se realiza con volúmenes que varían de los 1.5 a los 20 mL de disolvente. El volumen depende generalmente de la proporción dispersante/muestra aumentando proporcionalmente.

En cuanto a la limpieza del extracto obtenido, fue innecesaria para aquellos trabajos en los que se utilizó una co-columna con un adsorbente diferente a la fase dispersante. En estos estudios también es notable la selectividad de la técnica DMFS pues le es posible extraer hasta 8 analitos de interés con recobros que varían desde 40 a 100 % y dependiendo del tipo de detección utilizada, los analitos son determinados hasta niveles desde  $\text{pg g}^{-1}$  hasta  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

La preparación de la muestra para un análisis es un paso de suma importancia ya que en la mayoría de las ocasiones es la etapa que consume mayor tiempo y tiene gran impacto en la rapidez y costo de los análisis así como en la calidad de los resultados. En general, la DMFS requiere un bajo consumo de disolventes orgánicos, muestra y adsorbentes sólidos ya que se puede miniaturizar por lo que resulta una excelente opción para la extracción de los analitos estudiados en este trabajo.

Para la mayoría de los estudios de este tipo las técnicas de análisis son la CLAR y la UPLC obteniendo límites de detección que van desde los  $\text{ng mL}^{-1}$  hasta  $\text{mg L}^{-1}$ .

En la tabla 4 se presentan algunos de los trabajos más recientes sobre el análisis de los analitos de interés en este trabajo, en muestras de pescado, principalmente. Los métodos de extracción se basan principalmente en técnicas miniaturizadas que buscan disminuir el uso de disolventes en comparación con las técnicas convencionales. Los trabajos se enfocan en extraer de forma específica entre 6 y 16 compuestos simultáneamente con recobros que varían desde 1.27 a 107.8%. Mientras que el análisis químico para estos estudios se realizó utilizando como método de separación alguna técnica cromatográfica potencializando el análisis con el acoplamiento de a una técnica de detección, identificación y cuantificación como Espectrometría de Masas que es una potente técnica instrumental de análisis, de alta sensibilidad, obteniendo límites de detección que van desde  $0.2 \text{ pg g}^{-1}$  hasta  $3.09 \text{ ng g}^{-1}$ .

Tabla 3. Estudios donde se utiliza la DMFS como método de preparación de músculo de pescado como muestra

Autor (año)	Muestra (cantidad)	Analitos	Adsorbente	Limpieza del cartucho	Elución	Análisis	Recobros	L. D.
(Chien-Liang Chen, 2014)[42]	1.0 g Tilapia naranja ( <i>Oreochromis mossambicus</i> )	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ dechlorane 602,</li> <li>○ dechlorane 603</li> <li>○ dechlorane 604</li> <li>○ dechlorane plus syn</li> <li>○ dechlorane plus anti</li> </ul>	2,0 g de sílice gel Co-columna 1,0 g de Florisil		20 ml de n-hexano	GC-ECNICI-MS	71-85%	5-3 pg/g
(Dung-Ying Tsai, 2014) [43]	Tilapia 0.5 g	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Ethylhexyl salicylate (EHS),</li> <li>○ 3,3,5-trimethylcyclohexyl salicylate (HMS),</li> <li>○ 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (BP-3)</li> <li>○ 2,4-dihydroxybenzophenone (BP-1)</li> <li>○ 2,20-dihydroxy-4-methoxybenzophenone (BP-8)</li> </ul>	1,0 g de Florisil  1,0 g de Silice C18, como co-columna		7 ml de acetonitrilo	GC-MS/MS	71-81 %	0.02 -0.03 ng/g
(Yanfei Tao, 2014)[44]	Carpa 1.0 g	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Florfenicol (FF)</li> <li>○ Florfenicol (FF)</li> <li>○ Florfenicol-amina, (FFA)</li> <li>○ Tiamfenicol (TAP)</li> <li>○ Cloranfenicol (CAP)</li> </ul>	1g slice C18		10 ml Acetato de etilo-ACN-25% de hidróxido de amonio, (10/88/2, v/v/v)	LC-MS / MS	N.E	0.01-0.09 µg/kg

Tabla 3. Estudios donde se utiliza la DMFS como método de preparación de músculo de pescado como muestra (continuación)

<b>(Xiao-Dong Pan, 2015)[45]</b>	2.0 g corvina amarilla grande (Pseudosciaena crocea)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Cloranfenicol (CAP)</li> <li>○ Tiamfenicol (TAP)15</li> <li>○ Florfenicol (FF)</li> </ul>	3 g sílice C18	8 ml de n-hexano	Los analitos se eluyeron con 10 ml de acetonitrilo / agua (50:50, v / v)	UPLC-MS/MS	N.E	0.02-0.06 µg/kg
<b>(M.C. Cela-Pérez, 2015)[46]</b>	0.2 g de músculo pescado	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Inosina (INO)</li> <li>○ hipoxantina (HYP)</li> </ul>	0.4 g de MIP 0.05 g MIP co-columna	2 ml de hexano	4.0 ml de hidróxido de amonio (5,55 106 M, pH 9)	UPLC-PDA	103.1% 113.4%	1.702-1.785µg/mL
<b>(Xiaoli Sun, 2014)[47]</b>	0.2 mg músculo de pescado	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Leroxacina</li> <li>○ Ofloxacina,</li> <li>○ Norfloxacina</li> <li>○ Pefloxacina</li> <li>○ Ciprofloxacina</li> <li>○ Lomefloxacina</li> <li>○ Enrofloxacina</li> <li>○ Gatifloxacina</li> </ul>	150mg de DMIP2  50 mg de DMIP2 co-columna	3.0 ml de metanol-agua (20:80, v / v),	4.0 ml de acetonitrilo-trifluoroacético  Ácido (99: 1, v / v)	HPLC-FLD	64.4- 99.4%	0.05-0.22 ng/g

GC-ECNI-MS-CI: Cromatografía de gases-captura de electrones de iones negativos, espectrometría de masas de ionización química. GC-MS/MS: Cromatografía de gases-Espectrometría de masas en tándem.

LC-MS/MS: Cromatografía líquida -Espectrometría de masa en tándem UPLC-MS / MS: Cromatografía líquida de ultra rendimiento - Espectrómetro de masas en tándem. GC(ECD):

Cromatografía de gases con detector de captura de electronesUPLC-PDA: Cromatografía líquida de ultra rendimiento con detección de matrices de fotodiodos

HPLC-FLD: Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con una detección de fluorescencia (FLD).

N.E: No especificado, DMIP2: (dummy molecularly imprinted polymers) Polímero ficticio impreso molecularmente, MIP(polímero compatible con agua molecularmente impreso).

Tabla 4 Métodos recientes de análisis de parabenos, filtros UV y DEET en pescado

Autor (Año)	Muestra	Analitos	Método de Extracción	Método De Análisis	Recobros	L. D.
Chao Han, 2016.[48]	Pez hairtail Corvina amarilla Camarón	BP-1 BP -2 BP-3 MPB,EPB, PPB,BPB	PLE y Limpieza MCX en cartuchos de extracción en fase sólida.	LC-QqLIT- MS/MS	80.6 a 107.8%	N.E.
Anna Jakimska, 2013[49]	Pez <i>Barbus graellsii</i> , <i>Micropterus salmoides</i> , <i>Cyprinus carpio</i> , <i>Salmo trutta</i> , <i>Silurus glanis</i> , <i>Anguilla anguilla</i> , <i>Lepomis gibbosus</i> , <i>Gobio gobio</i> , <i>Luciobarbus sclateri</i> , <i>Aburnus alburnus</i> y <i>Pseudochondrostoma willkommii</i>	1H – benzotriazol, Cafeína, Progesterona, Lenovogestrel, Toliltriazol, TCEP Tris (2-cloroetil) fosfato, TBEP Tris (2 - butoxietil) fosfato, TCPP Tris(2-cloroisopropil)fosfato, Estrona, 17β-Estradiol, Estriol, 17α-Etinilestradiol, Estrona-3-sulfato, Bisfenol A Triclosan, MPB, EPB, PPB, BPB	QuEChERS	UHPLC-MS / MS	40% a 103%	0.002 - 3.09 ng / g
Joon-WooKim, 2011.[50]	Músculo de pescado de la especie <i>V. buchanani</i> , <i>E. corallicola</i> y <i>M. cephalus</i>	TCS, TCC, UV-P, UV-9, UV-234, UV-320, UV-326, UV-327, UV- 328, UV-329, MPB, RPB, PPB, BPB,	HSSE	UFLC - MS / MS	1.27 a 99.8%	0.2-15 pg/g

Tabla 4 Métodos recientes de análisis de parabenos, filtros UV y DEET en pescado (continuación)						
Babu Rajendran Ramaswamy, 2011. [51]	20 especies de peces de las familias	Triclosán, triclocarban, MPB, EPB, PPB, BPB	HSSE	LC-MS / MS	79 a 89%	0.001- 0.015 ng / g
<p>(PLE): Extracción en líquido presurizado. (MCX) intercambio catiónico de modo mixto. (LC-QqLIT-MS/MS): cromatografía líquida en tándem-espectrometría de masas-cuadrupolo con trampade iones Lineal. (BP-1): 2,4-dihydroxy-benzophenone. (BP - 2): 2,2', 4, 4'-tetrahydroxibenzofenona. (BP-3): 2-hydroxy - 4methoxybenzophenone. (MP): metilparabeno.(EPB): etilparabeno.( PPB): ptopilparabeno. (BPB): butilparabeno. (BPB): Bencilparabeno. (QuEChERS): Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto y Seguro. (UHPLC-MS / MS): cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada con espectrometría de masas en tándem, (TCS): Triclosan, (TCC): Triclocarban, (UV-P): 2-(2H-5-methylphenyl)benzotriazole. (UV-9): 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-metil-6-(2-propenyl)fenol, (UV-234): 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-4,6-bis(1-metil-1-phenylethyl)fenol. (UV-320): 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-4,6-di-tert-butilfenol. (UV-326): 2-tert-butil-6-(5-cloro-2H-benzotriazol-2-yl)-4-methylphenol. (UV-327) de 2,4-di-tert-butil-6-(5-cloro-2H-benzotriazol-2-yl) fenol. ( UV-328): 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-4,6-di-tert-pentylphenol. (UV-329): 2-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)fenol.</p> <p>(TCP): fosfato de tritolilo. (TEP): Trietil fosfato. (TEHP): Tris (2 - etilhexil) fosfato. (TBEP): Tris (2 - butoxietil) fosfato. (TPhP): Trifenil fosfato. (TBP): Fosfato de tributilo. (TPrP): Tripropil fosfato. (EHDPP): Fosfato de 2-etilhexil difenilo. ( TPeP) tripentil fosfato. (HSSE): Extracción con disolvente de alta velocidad.</p> <p>(UFLC - MS / MS): cromatografía líquida ultrarrápida acoplada con espectrometría de masas en tándem. (LC-MS / MS): cromatografía líquida de alta resolución en espectrometría de masas en tándem. (N.E.): no especificado.</p>						



## Capítulo 2 Metodología.

### 2.1 Reactivos, materiales y equipos

- Metanol grado cromatográfico marca J. T. Baker
- Acetonitrilo grado cromatográfico marca J. T. Baker
- Agua grado cromatográfico
- Estándares de metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, DEET, benzofenona-3, todos marca Sigma Aldrich
- Adsorbente Chromabond C18-PAH marca Macherey-Nagel
- Florisil marca Sigma-Aldrich
- Nitrógeno de ultra alta pureza > 99.99 % marca Praxair
- Procesador de alimentos electrónico Hamilton beach
- Mortero y pistilo de ágata
- Cartuchos de polipropileno de 6 mL para EFS y frits de teflón marca Macherey–Nagel
- Matraz kitasato 250 ml con tapón de caucho #8
- Aguja de acero
  
- Ultra sonido marca Brason modelo 2510E-MT
  
- Micropipeta de volumen variable de 100-1000µL marca Transferpette
  
- Micropipeta de volumen variable de 20-200µL Transferpette
  
- Balanza electrónica de precisión modelo HRB103
  
- Recipiente de acero inoxidable
  
- Desecador de vidrio
  
- Soporte universal con pinzas y nuez
  
- Parrilla de calentamiento

- Estufa de secado BLUE M modelo SW-17TA
- Vasos de precipitado 10 mL y 50 mL
- Matraz aforado de 2 mL, 10 mL
- Espátula
- Pipeta volumétrica 6 mL

## 2.2 Sistema Cromatográfico

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución de la marca Waters que consta de:

- Bomba binaria modelo 1525
- Detector UV modelo 2487
- Automuestreador modelo 717 plus

Columna analítica ZORBAX SB C18 de 5µm de diámetro de partícula y dimensiones de 46 x 250 mm de la marca Agilent.

## 2.3 Muestra

La muestra utilizada fue músculo de Tilapia mojarra (*Oreochromis urolepis homorum*) obtenido de tiendas de autoservicio.

Antes de realizar las extracciones, la muestra se mantuvo en congelación hasta conseguir una consistencia firme. Posteriormente, se homogenizó con ayuda de un procesador de alimentos hasta obtener porciones pequeñas.

La muestra homogénea se guardó en bolsas de cierre hermético y se almacenó en el congelador hasta su posterior uso.

## 2.4 Preparación de las disoluciones estándar.

Se prepararon soluciones stock individuales de cada uno de los analitos, (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, DEET y benzofenona-3) todos, en metanol grado cromatográfico de 1000 ppm a partir de las cuales se preparó una mezcla de los analitos a una concentración de 100 ppm. Las disoluciones se mantuvieron a 4°C.

## 2.5 Acondicionamiento y almacenamiento de los adsorbentes

La metodología seguida para el acondicionamiento de la sílice C18 fue:

1. Se empacó 3 g de adsorbente en un cartucho de EFS colocándolo en un matraz kitazato el cual se conectó al vacío.
2. Se adicionaron al cartucho en el siguiente orden: 5 mL de agua desionizada y 5 mL de metanol grado cromatográfico.
3. Finalmente se aplicó vacío durante 5 minutos.
4. El adsorbente ya acondicionado se colocó en un vial de vidrio ámbar con tapa de rosca y se almacenó a temperatura ambiente para su futuro uso.

Para acondicionar el florisil se realizaron los siguientes pasos:

1. Se pesó 5 g de florisil en un vaso de precipitado.
2. Se mantuvo en una estufa a 130 ° C durante 24 horas previas a su uso.
3. Se enfrió a temperatura ambiente en un desecador.

## 2.6 Obtención de los espectros UV.

Se obtuvo el espectro de absorción en un intervalo de 200 nm a 400 nm para cada analito utilizando un espectrofotómetro UV-VIS marca Perkin Elmer modelo lambda 18. Se utilizaron disoluciones de 10 ppm de cada analitos disuelto en MeOH.

Una vez determinada la longitud de onda a la cual la mayoría los analitos presentan una absorbancia adecuada, se prosiguió con el desarrollo de la metodología analítica para la extracción de los productos de cuidado personal en muestras comerciales de músculo de Tilapia mediante DMFS y su determinación por medio de CLAR. La metodología se describe de forma general en la figura 12.

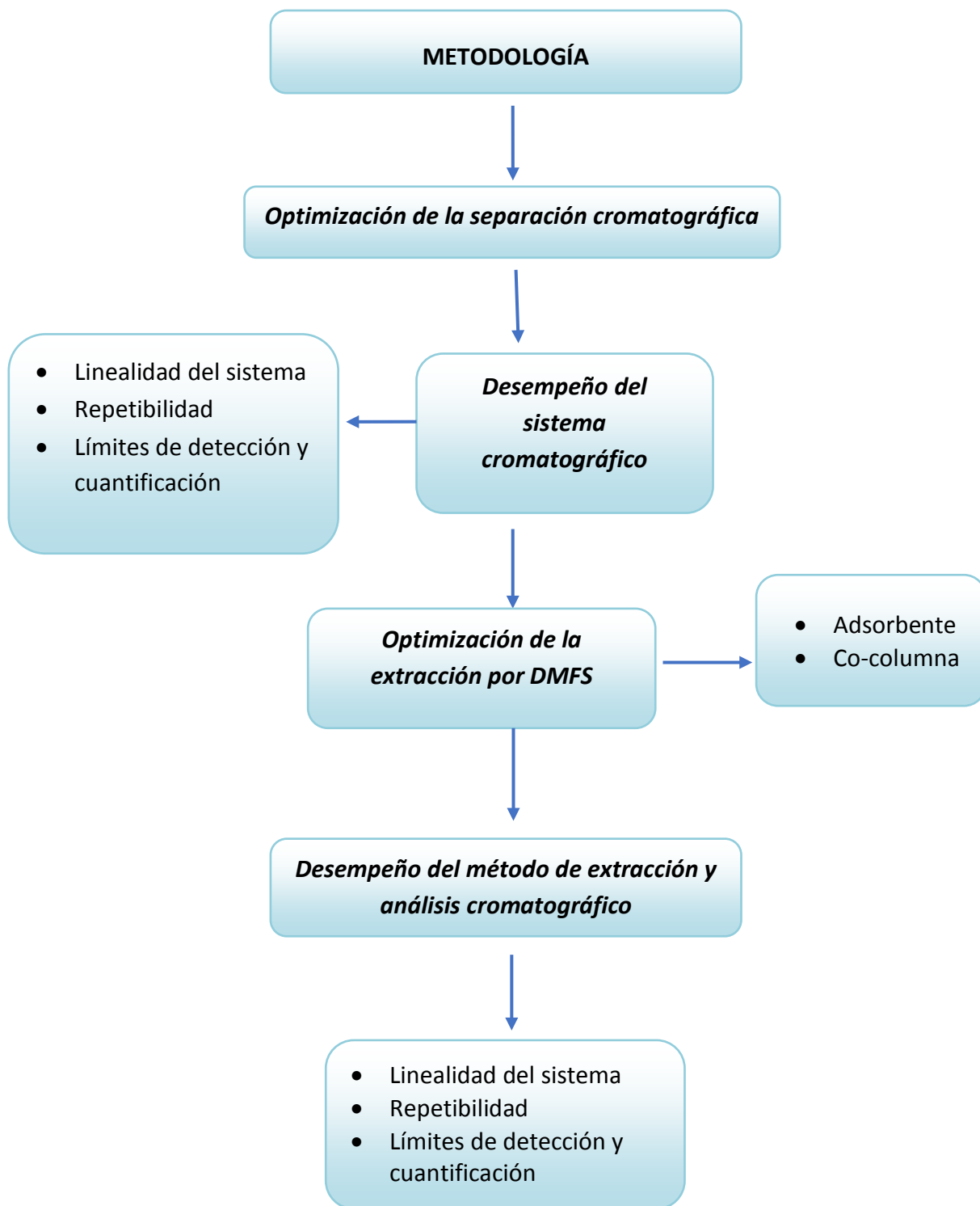


Figura 12. Esquema general de la metodología experimental.

## 2.7 Optimización de la separación cromatográfica

En todos los análisis se estableció un volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$ , flujo de la fase móvil de 1  $\text{mL min}^{-1}$  y detección a 240 nm.

Para optimizar la separación cromatográfica, en ensayos por separado, se inyectó al sistema una mezcla de los diferentes estándares de los contaminantes a una concentración de 7.5 ppm utilizando como fase móvil diferentes mezclas metanol/agua en las proporciones mostradas en la tabla 5.

Tabla 5. Proporción de los disolventes para la fase móvil en una elución isocrática.

	Proporción %	
Ensayo	Metanol	Agua
1	100	0
2	90	10
3	80	20
4	70	30
5	65	35
6	60	40

Con el fin de mejorar las condiciones cromatográficas para la separación de los contaminantes se optimizó la elución con un gradiente lineal mostrado en la tabla 6.

Tabla 6. Proporción de la fase móvil para una elución en gradiente lineal.

	Tiempo(Minutos)	% Metanol	% Agua
Gradiente	0	50	50
	10	90	10
	15	90	10
Equilibrio	17	50	50
	22	50	50

Para cada ensayo se calcularon los parámetros de  $k'$ ,  $N$ ,  $R_s$  para determinar cuáles fueron las mejores condiciones.

## 2.8 Parámetros de validación del sistema cromatográfico

### ○ **Linealidad**

Para evaluar la linealidad del sistema cromatográfico, a partir de la mezcla de estándares de concentración 100 ppm de los analitos, se preparó una curva a las concentraciones de 0.5, 1.0, 2.5, 10.0 y 30.0 ppm. Cada estándar fue inyectado por triplicado y se graficó el área del pico cromatográfico contra la concentración de cada analito. Se obtuvo el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y la ecuación de la curva.

### ○ **Repetibilidad**

La repetibilidad se evaluó inyectando por triplicado en días diferentes las disoluciones estándar de 1.0 y 10.0 ppm, obteniendo a partir de éstas el promedio del área del pico de cada analito, la desviación estándar (D.E.) y el coeficiente de variación porcentual (C.V. %).

### ○ **Límites de detección y cuantificación**

Los límites de detección (LD) y de cuantificación (LC) se obtuvieron a partir de la relación señal/ruido (S/N) utilizando para el LD la concentración que proporciona una señal 3.3 veces la S/N y para el LC la concentración que produce una señal 10 veces la S/N.

## 2.9 Optimización de la extracción

Se fortificaron con 250  $\mu$ L de la disolución estándar de los analitos en estudio a diferentes muestras de 1 g de músculo (peso húmedo) a una concentración de 25  $\mu$ g/g. La muestra se deja secar 1h a temperatura ambiente antes de realizar la extracción. Como se muestra en la tabla 7, para la DMFS se probaron los adsorbentes florisil y sílice C18 en diferentes proporciones.

Tabla 7. Proporciones de adsorbente sólidos utilizados en la optimización de la DMFS.

	<b>Ensayo 1</b>	<b>Ensayo 2</b>	<b>Ensayo 3</b>
<b>Columna</b>	1 g de florisil	1 g de C18	1 g C18
<b>Co-columna</b>	---	---	0.2 g de florisil

Las muestras de pescado fortificadas se colocaron en un mortero de ágata con la proporción adecuada de adsorbente según lo muestra la tabla anterior (tabla 7) y con ayuda del pistilo se homogeneizó durante un minuto. Después, la mezcla resultante se empacó en un cartucho de EFS y de ser necesario según el ensayo se colocó una co-columna previamente empacada en el mismo cartucho.

Los analitos fueron recuperados del cartucho en ensayos separados utilizando 5 mL de Acetonitrilo grado cromatográfico al 100 %. El extracto se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se llevó a evaporación a temperatura ambiente bajo corriente de N<sub>2</sub>. Después se re-suspendió con un volumen de 1 mL de una disolución MeOH/Agua 50:50 v/v y se analizó por CLAR-UV. Finalmente, se calculó el porcentaje de recobro para cada ensayo comparando el área obtenida para cada analito contra el área obtenida con una disolución estándar a 25 ppm.

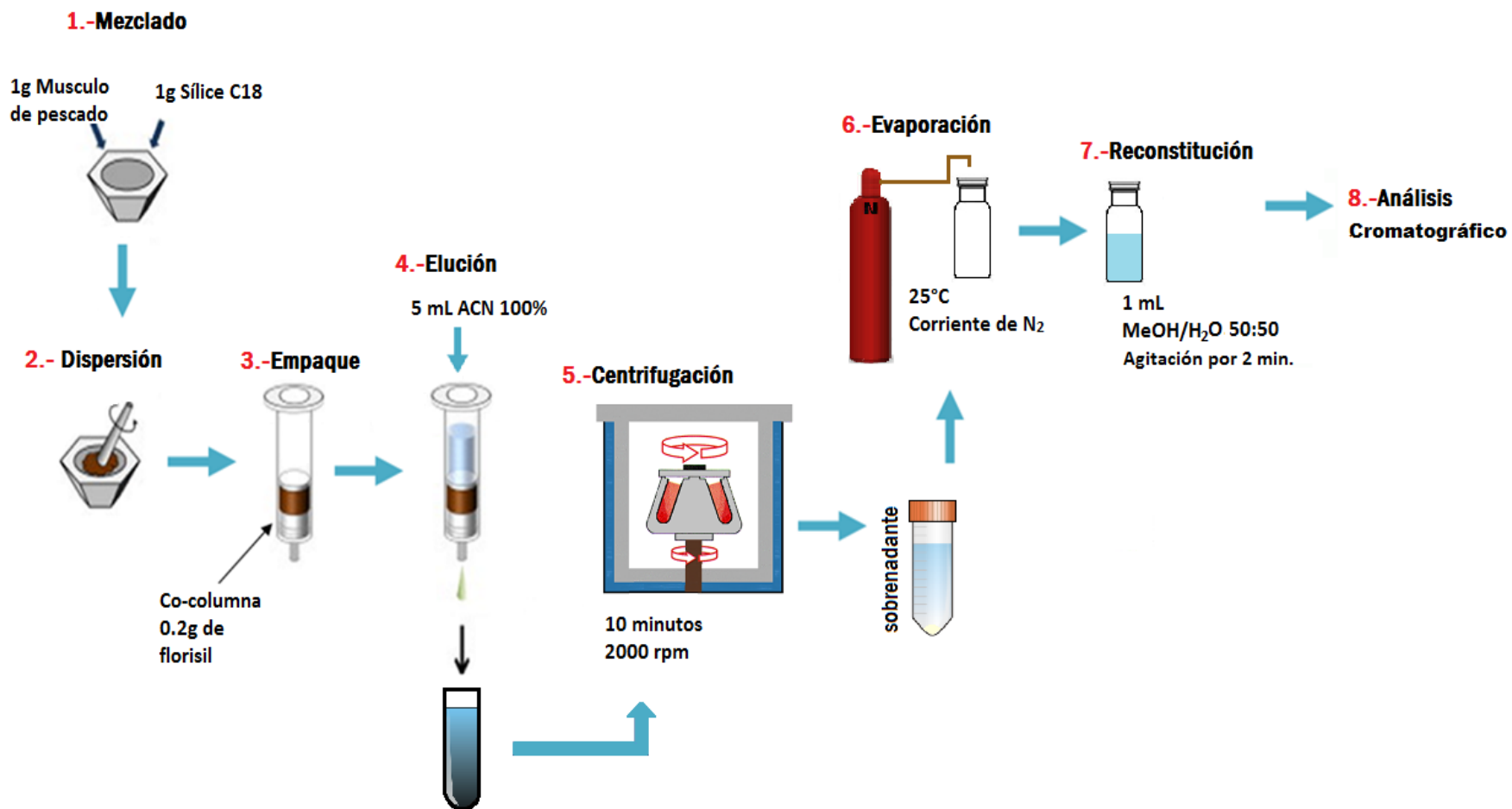


Figura 13. Esquema que muestra las condiciones óptimas para la extracción de los analitos por DMFS.



## 2.10 Parámetro validación del método de extracción

### ○ Linealidad del método y recobro

Para evaluar la linealidad del método se fortificaron muestras de músculo de Tilapia por triplicado a las concentraciones de 2.5, 5.0, 10.0, 12.5 y 15.0  $\mu\text{g/g}$  para todos los analitos.

Se realizó la extracción y análisis de los compuestos utilizando las condiciones óptimas y se calculó la cantidad recuperada para cada analito. Se graficó la cantidad recuperada en función de la cantidad agregada y se obtuvo el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) y la pendiente de la curva, la cual al multiplicarse por 100 representa el recobro global del método.

### ○ Repetibilidad

La repetibilidad se evaluó por medio de seis ensayos realizados en días diferentes a dos niveles de fortificación de la muestra 5.0 y 10  $\mu\text{g/g}$ , obteniendo a partir de éstas el promedio del área del pico de cada analito, la desviación estándar (D.E.) y el coeficiente de variación porcentual (C.V. %).

### ○ Límites de detección y cuantificación

Los límites L.D. y L. C. se obtuvieron a partir de la relación S/N utilizando para el L.D. la concentración que proporciona una señal 3.3 veces la S/N y para el L. C. la concentración que produce una señal 10 veces la S/N.

## 2.11 Evaluación del método DMFS-CLAR-UV con muestras reales

Con el método desarrollado se analizaron tres muestras de músculo de Tilapia obtenidas en diferentes establecimientos comerciales. La muestra 1 se obtuvo en un mercado local y las muestras 2 y 3 de supermercados. Cada muestra fue analizada por triplicado.

## Capítulo 3. Resultados y Discusión.

### 3.1 Determinación de los espectros UV de los analitos.

Se obtuvieron los espectros de absorción UV para cada estándar de los analitos en estudio, los cuales se presentan en las figura 13. Se determinó que los parabenos presentan un máximo de absorción a 254 nm y la benzofenona-3 tiene tres máximos a 240, 290 y 330 nm. Por otra parte, el DEET no presenta un máximo intenso como el resto de los analitos. Sin embargo, presenta cierta absorción a valores de longitud de onda menores a 250 nm. Con lo anterior, se determinó trabajar a un valor de longitud de onda donde todos los analitos presentaran absorbancias similares y se eligió el valor de 240 nm como la longitud de onda óptima de trabajo.

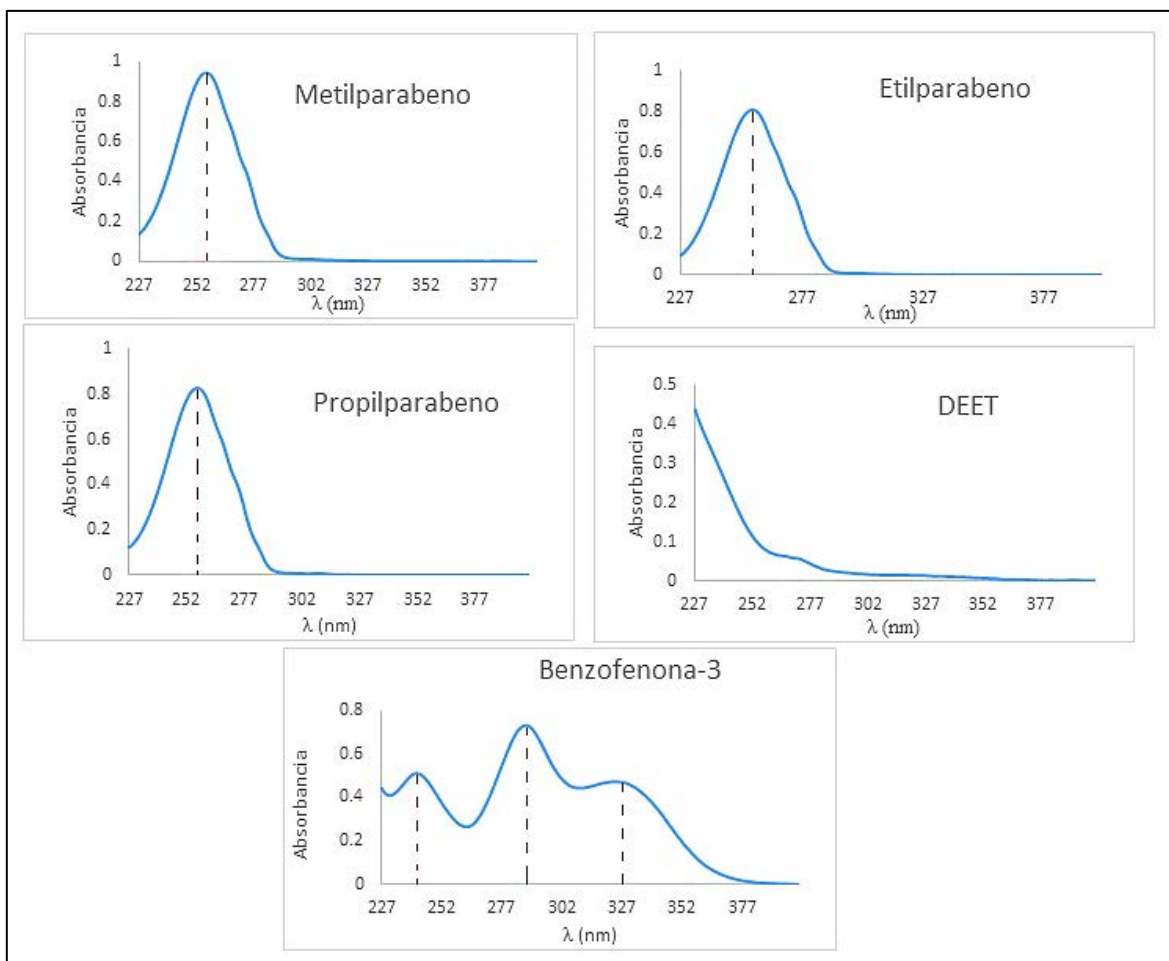


Figura 14 Espectros de absorción a una concentración de 10 ppm en MeOH.

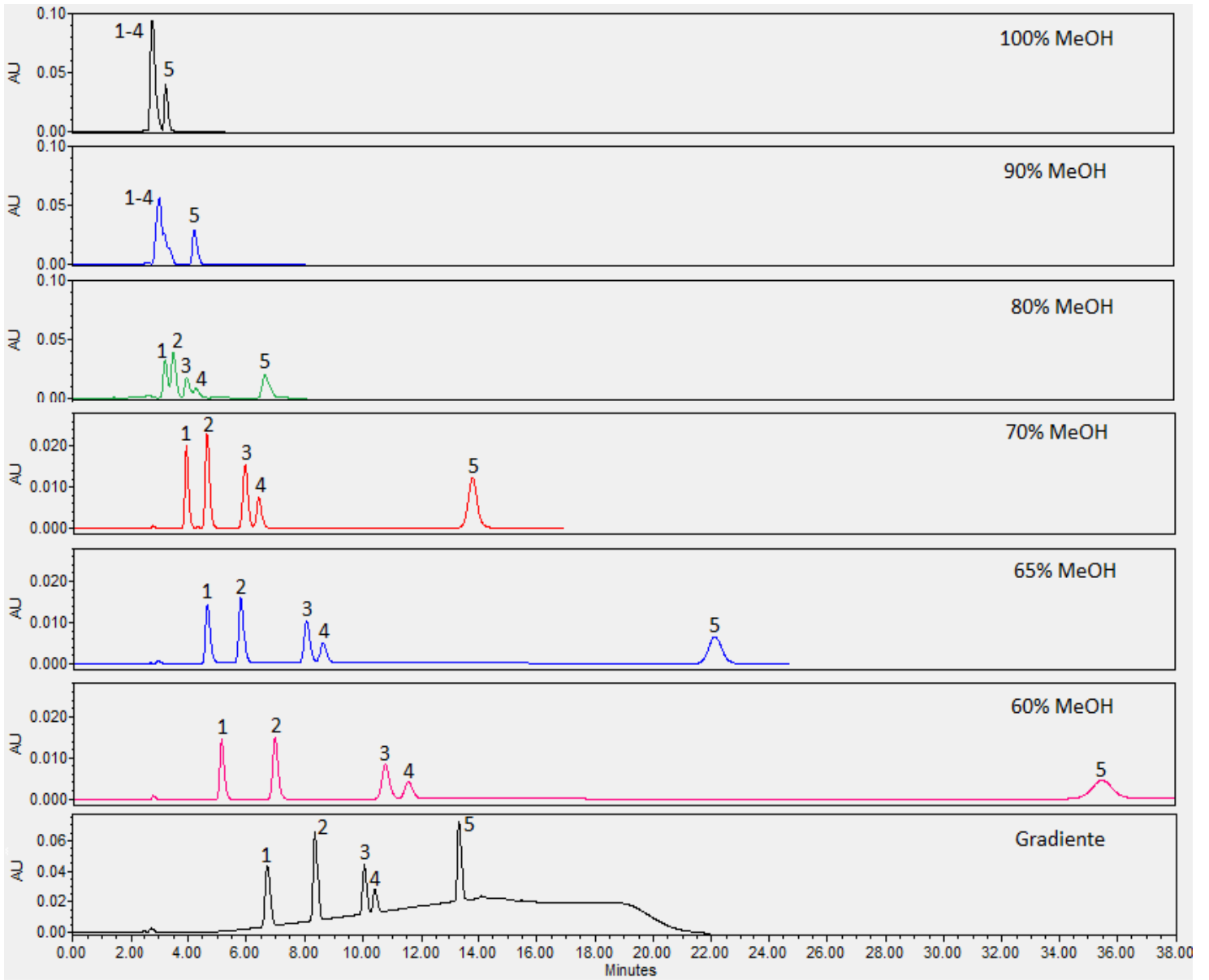
## 3.2 Optimización de la separación cromatográfica de los analitos

En la figura 14, se muestran los resultados obtenidos con las diferentes fases móviles utilizadas para la separación de los contaminantes MPB, EPB, PPB, DEET y BP-3.

Al utilizar una elución isocrática con fase móvil de composición MeOH:Agua 100:0, 90:10 y 80:20 no se obtuvieron resultados satisfactorios en la separación de los analitos ya que la mayoría de los picos cromatográficos no tienen buena resolución. Por otro lado, con las proporciones 70:30, 65:35 y 60:40 mejoró la resolución de los analitos en la mezcla pero se observó ensanchamiento y coleo de los picos cromatográficos. Además, se obtuvieron tiempos de retención para el metilparabeno cercanos a 4 min y para prevenir la coelución con los componentes polares coextraídos del músculo de Tilapia se decidió probar otras condiciones para aumentar su tiempo de retención.

De esta forma, se utilizó un gradiente de elución lineal el cual aumentó el tiempo de retención del metilparabeno a 6.5 min y aumenta la resolución de la mayoría de los analitos a valores mayores de 1.5. El tiempo de análisis se redujo a 22 min en comparación con la elución isocrática que proporciona valores de  $R_s$  equivalentes.

En la tabla 8 se resumen los resultados de los parámetros cromatográficos calculados para las proporciones de fase móvil que permitían una separación de los analitos. En dicha tabla se observa que la elución en gradiente mejoró considerablemente los valores de  $R_s$  y  $N$  de la mayoría de los analitos a excepción del par DEET y PPB donde la resolución es menor a 1. Sin embargo, como se verá en la siguiente sección, esto no dificulta la correcta integración de esos picos y permite tener buena linealidad en el sistema cromatográfico.



	Tiempo(Minutos)	% Metanol	% Agua
Gradiente	0	50	50
	10	90	10
	15	90	10

Figura 15. Cromatogramas obtenidos de una disolución estándar a una concentración de 7.5 ppm. Compuestos: 1. MPB, 2. EPB, 3. PPB, 4. DEET y 5. BP-3. Condiciones cromatográficas en la imagen.

Tabla 8. Parámetros cromatográficos de los PCPs a diferentes proporciones de la fase móvil.

Fase móvil MeOH 70%: Agua 30%						
Analito	tr (min)	W (s)	k'	N	$\alpha$	Rs
Metilparabeno	3.73	0.644	0.42	536.002		
Etilparabeno	4.406	0.706	0.7	623.945	1.615	1.5212
Propilparabeno	5.654	0.639	1.15	1253.086	1.703	1.9534
DEET	6.382	0.661	1.43	1491.180	1.241	1.1017
Benzofenona-3	13.20	1.500	4.0	1238.102	2.816	4.5418
Fase móvil MeOH 65%: Agua 30%						
Analito	tr (min)	W (s)	k'	N	$\alpha$	Rs
Metilparabeno	4.17	0.633	0.583	692.299		
Etilparabeno	5.21	0.778	0.981	718.577	1.682	1.345
Propilparabeno	7.25	0.867	1.756	1119.983	1.790	2.352
DEET	8.08	0.872	2.071	1372.717	1.179	0.949
Benzofenona-3	20.01	2.217	6.605	1303.633	3.190	5.382
Fase móvil MeOH 60%: Agua 40%						
Analito	tr (min)	W (s)	k'	N	$\alpha$	Rs
Metilparabeno	4.816	0.817	0.830	556.421		
Etilparabeno	6.498	1.000	1.470	675.584	1.770	1.682
Propilparabeno	9.967	1.200	2.788	1103.790	1.897	2.891
DEET	11.116	1.167	3.225	1452.525	1.157	0.985
Benzofenona-3	32.608	4.017	11.394	1054.476	3.533	5.351
Fase móvil: Gradiente lineal						
Analito	tr (min)	W (s)	k'	N	$\alpha$	Rs
Metilparabeno	6.714	0.550	1.552	2384.280		
Etilparabeno	8.350	0.500	2.174	4462.240	1.401	3.272
Propilparabeno	10.039	0.417	2.816	9288.025	1.295	4.054
DEET	10.401	0.367	2.953	12874.409	1.049	0.987
Benzofenona-3	13.335	0.500	4.068	11380.622	1.378	5.868

El  $t_0$  del sistema fue de 2.631.

En la figura 16, se presenta un ejemplo de un cromatograma obtenido con las condiciones de separación optimizadas.

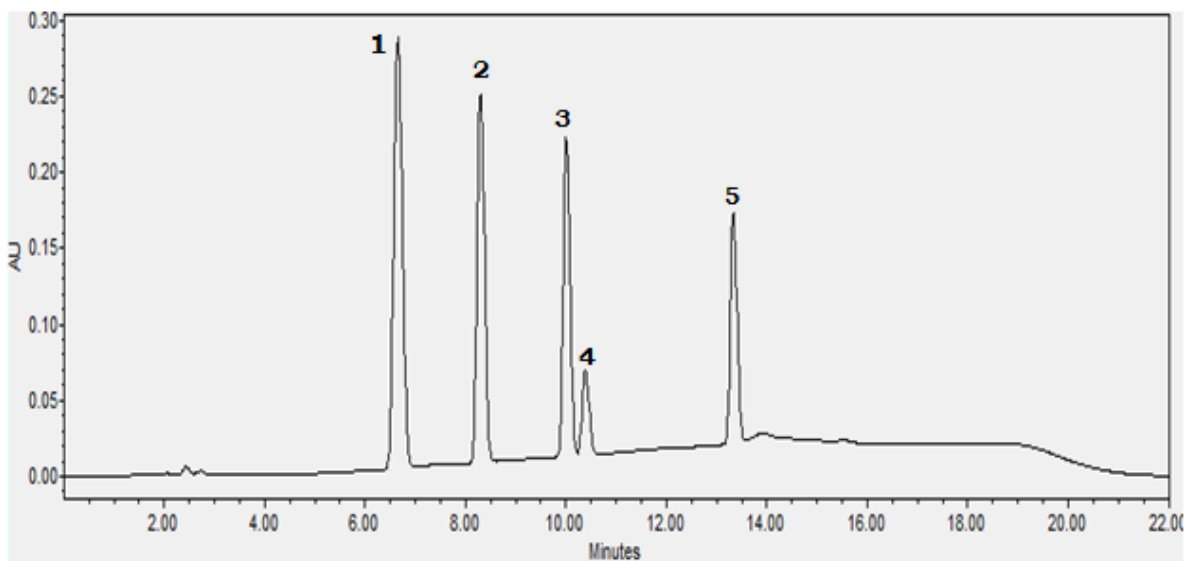


Figura 16. Cromatograma obtenido para la curva de calibración de una disolución estándar de los 5 contaminantes a 30 ppm. 1. MPB, 2. EPB, 3. PPB, 4. DEET y 5. BP-3

La variación de los tiempos de retención entre diferentes inyecciones de los analitos al utilizar la elución en gradiente se muestra en la tabla 9. Se obtuvieron valores de C.V. menores a 0.36 para el promedio de los tiempos de retención, lo que indica una baja dispersión de los datos obtenidos y por consiguiente implica confiable la determinación de los PCP's por medio de su tr.

*Tabla 9 Tiempo de retención de los PCP's en minutos a 7.5 ppm*

Analito	tr (promedio n=3)	Desv. Est.	C.V%
<b>Metilparabeno</b>	6.70	0.025	0.367
<b>Etilparabeno</b>	8.330	0.020	0.240
<b>Propilparabeno</b>	10.040	0.001	0.014
<b>DEET</b>	10.400	0.001	0.014
<b>Benzofenona-3</b>	13.33	0.006	0.044

### 3.3 Parámetros de validación del sistema cromatográfico

En la tabla 10, se resumen los resultados para cada contaminante de los cuales se muestra la ecuación de la línea recta.

Tabla 10. Resultados de los parámetros de validación del sistema cromatográfico CLAR-UV

Analito	Ecuación de la recta	$r^2$	C. V. % 1 ppm	C. V. % 10 ppm	L. D. (ppm)	L. C. (ppm)
Metilparabeno	$y = 111061x - 21773$	0.9998	6.06	2.36	0.12	0.40
Etilparabeno	$y = 84011x + 13453$	0.9955	4.22	2.37	0.11	0.37
Propilparabeno	$y = 58884x + 40384$	0.9921	2.40	2.98	0.10	0.33
DEET	$y = 16484x + 1032.4$	0.9997	3.86	5.68	0.14	0.47
Benzofenona-3	$y = 45355x - 5057.4$	0.9999	2.32	1.99	0.12	0.40

El coeficiente de determinación ( $r^2$ ) obtenido para cada contaminante resultó mayor a 0.9921 para todos los analitos, presentando una buena correlación lineal del sistema cromatográfico en el intervalo de concentración de 0.5 a 30 ppm.

La repetibilidad del sistema fue buena con C.V. % inferiores a 6.06% de acuerdo a los parámetros establecidos según Taverniers [52] 11.3-16% a los dos niveles de concentración utilizados.

Los límites de cuantificación experimentales estuvieron entre 0.33 y 0.47 ppm, mientras que los límites de detección experimentales estuvieron entre 0.10 y 0.14 ppm. El DEET fue el compuesto con los valores mayores de L.D. y L. C. debido a que presentó la menor sensibilidad en el sistema de análisis.

### 3.4 Optimización de la extracción por DMFS.

El primer parámetro optimizado fue el tipo de adsorbente, se probaron sílice C18 y florisil (1 g de cada uno), con el primero se obtuvieron valores de rendimiento mayores al 95% y con el segundo fueron menores al 60% ( Figura 17), por lo cual se seleccionó la sílice C18 como adsorbente de extracción. Sin embargo, el extracto obtenido con sílice C18 presentó turbidez debido a que coeluyen las grasas de la muestra de músculo de Tilapia con los analitos de interés, lo cual no ocurrió con el florisil. De esta forma, se agregó una co-columna de 0.2 g de florisil al cartucho, previo al empaque de la muestra dispersada en la sílice C18. Esto disminuyó los recobros en un 20 % aproximadamente pero se logró eliminar el problema de la turbidez en los extractos obtenidos dejándolos aptos para el análisis por CLAR.

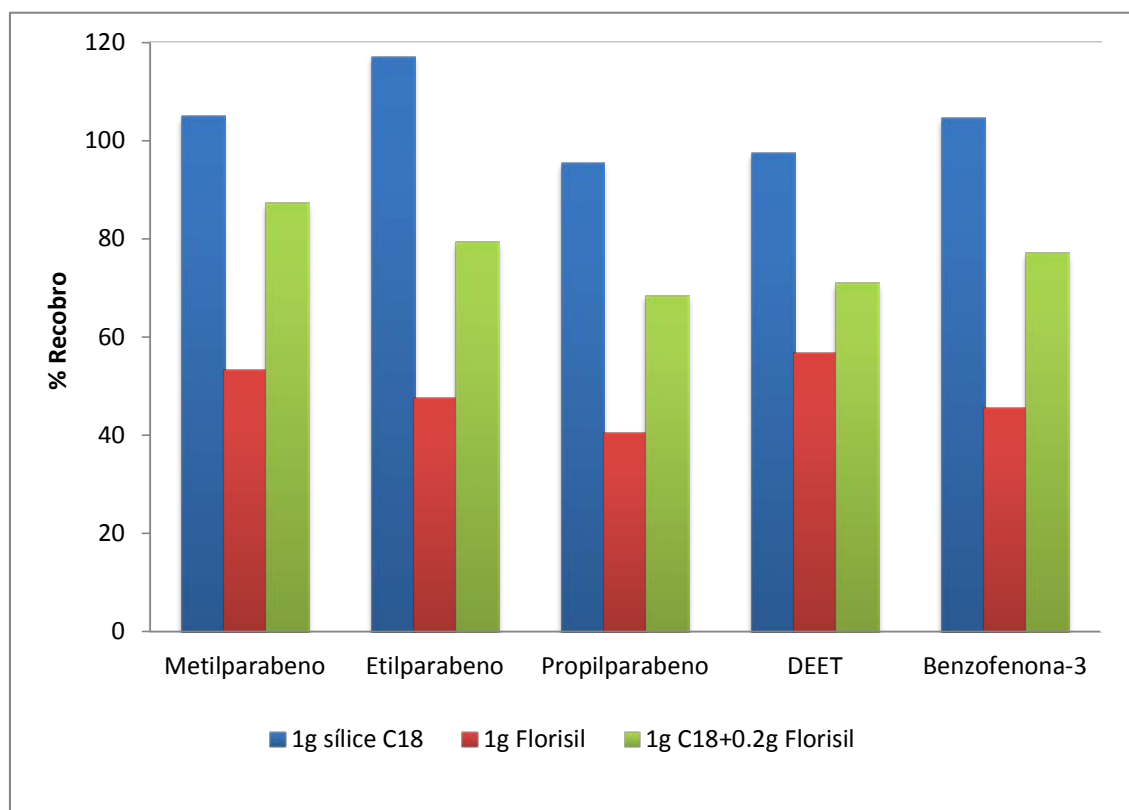


Figura 17. Optimización de la DMFS.



El segundo parámetro optimizado fue el volumen del disolvente de elución. Se utilizó ACN debido a que tiene una menor afinidad por las grasas que el MeOH. Se evaluaron 5 y 10 mL para la recuperación de los compuestos y se obtuvo un recobro similar para todos los analitos. Se eligió el volumen menor para disminuir la cantidad de disolventes utilizados y el tiempo de análisis.

De esta forma, las condiciones óptimas de extracción y análisis de los PCPs estudiados se resumen en la tabla 11.

*Tabla 11 Condiciones de extracción por DMFS y análisis CLAR-UV para músculo de Tilapia.*

<b>Condiciones cromatográficas</b>	
<b>Columna</b>	Tipo: ZORBAX SB C18 Tamaño de partícula: 5 µm Dimensiones: 4.6 x 250 mm
<b>Detección</b>	Tipo: UV Longitud de onda: 240 nm
<b>Fase móvil</b>	A: Metanol y B: Agua
<b>Gradiente</b>	0 min (50 % A), 10 min (90% A), 15 min (90% A)
<b>Tiempo de equilibrio</b>	7 minutos
<b>Velocidad del flujo</b>	1 mL min <sup>-1</sup>
<b>Volumen de inyección</b>	20 µL
<b>Tiempo total de análisis</b>	22 minutos
<b>Condiciones DMFS</b>	
<b>Muestra</b>	1 g de músculo de Tilapia mojarra (peso húmedo)
<b>Adsorbente</b>	1 g Silice C18
<b>Co-columna</b>	0.2 g Florisil
<b>Volumen de elución</b>	5 ml Acetonitrilo 100%

En la figura 17 se presentan cromatogramas típicos para la disolución estándar, muestra blanco y muestra fortificada de músculo de Tilapia. Se puede observar la presencia de compuestos coextraídos de la matriz, los cuales no interfieren con los analitos debido a que son más polares.

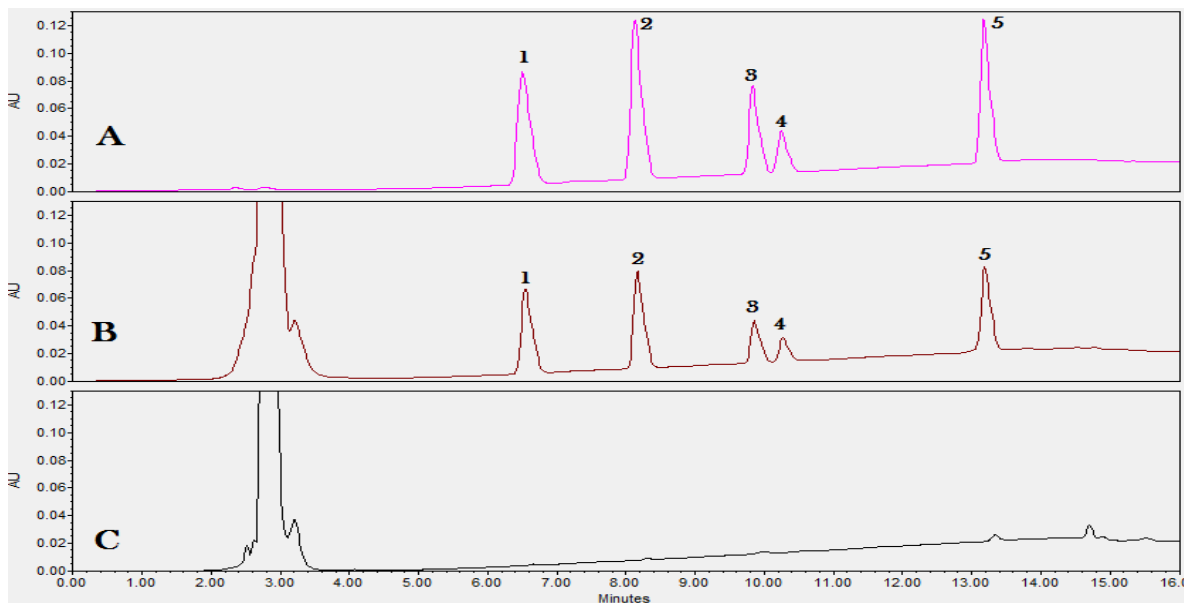


Figura 18. Cromatogramas obtenidos con las condiciones óptimas de extracción y análisis para: (A) disolución estándar a 15 ppm, (B) muestra fortificada a 15 ppm y (C) muestra blanco.

Compuestos: 1. MPB, 2. EPB, 3. PPB, 4. DEET y 5. BP-3.

### 3.5 Parámetros validación del método DMFS-CLAR-UV

La exactitud y linealidad del método se evaluaron al graficar la cantidad adicionada de cada analito contra la cantidad recuperada al aplicar el método desarrollado. Los datos obtenidos se analizaron por el método de mínimos cuadrados y se obtuvieron la ecuación de la recta y  $r^2$ . Las gráficas obtenidas se presentan en el Anexo II.

El recobro se evaluó con el valor de la pendiente de la curva de cantidad recuperada en función de la cantidad agregada como se describe en la página 38. Se obtuvieron recobros entre 66 y 79 % valores aceptables respecto a lo indicado en el trabajo de Taverniers [52] a los valores de concentraciones en las que se trabajó.

Para la linealidad se obtuvieron valores aceptables con  $r^2$  mayor a 0.95 para todos los compuestos de interés.

La repetibilidad fue evaluada a dos niveles de concentración 5 y 10 ppm, obteniéndose C.V. % menores a 15.80 %, por lo que se asegura una buena repetibilidad dado que estos valores de C.V.% se encuentran por debajo de 16% según lo reportado por Taverniers [52]

para estos niveles de contracción. Los L.D. permiten identificar a los analitos a concentraciones entre 0.5 y 0.7 ppm, mientras que los límites de cuantificación permiten determinar concentraciones entre 1.7 y 2.3 ppm.

*Tabla 12. Resultados de la validación del método DMFS-CLAR-UV.*

Analito	r <sup>2</sup>	Recobro global (%)	C. V. % 5 ppm n=3	C. V. % 10 ppm n=3	L. D. (ppm)	L. C. (ppm)
MPB	0.9979	79.15	6.70	1.27	0.5	1.7
EPB	0.9938	74.53	5.51	5.65	0.5	1.7
PPB	0.9549	66.03	0.61	10.28	0.6	2.0
DEET	0.9862	76.79	0.59	15.80	0.7	2.3
BP3	0.9826	66.19	6.59	4.34	0.5	1.7

### **3.6 Evaluación del método DMFS-CLAR-UV con muestras reales**

En la figura 19, se muestran cromatogramas obtenidos de las muestras comerciales de músculo de Tilapia. En las muestras del mercado local 19 de noviembre y del supermercado Wal-Mart no se detectaron los analitos y el perfil cromatográfico fue similar al de la muestra utilizada para la validación del método.

En el análisis de la muestra del supermercado Soriana se observó un pico con un tiempo de retención cercano al del propilparabeno. Sin embargo, no fue posible cuantificarlo debido a que tuvo una respuesta menor al L.C. del método para este compuesto. Además de esta señal, se observaron otros compuestos coextraídos de la matriz pero ninguna de las señales coincide con los t<sub>r</sub> de los otros analitos estudiados.

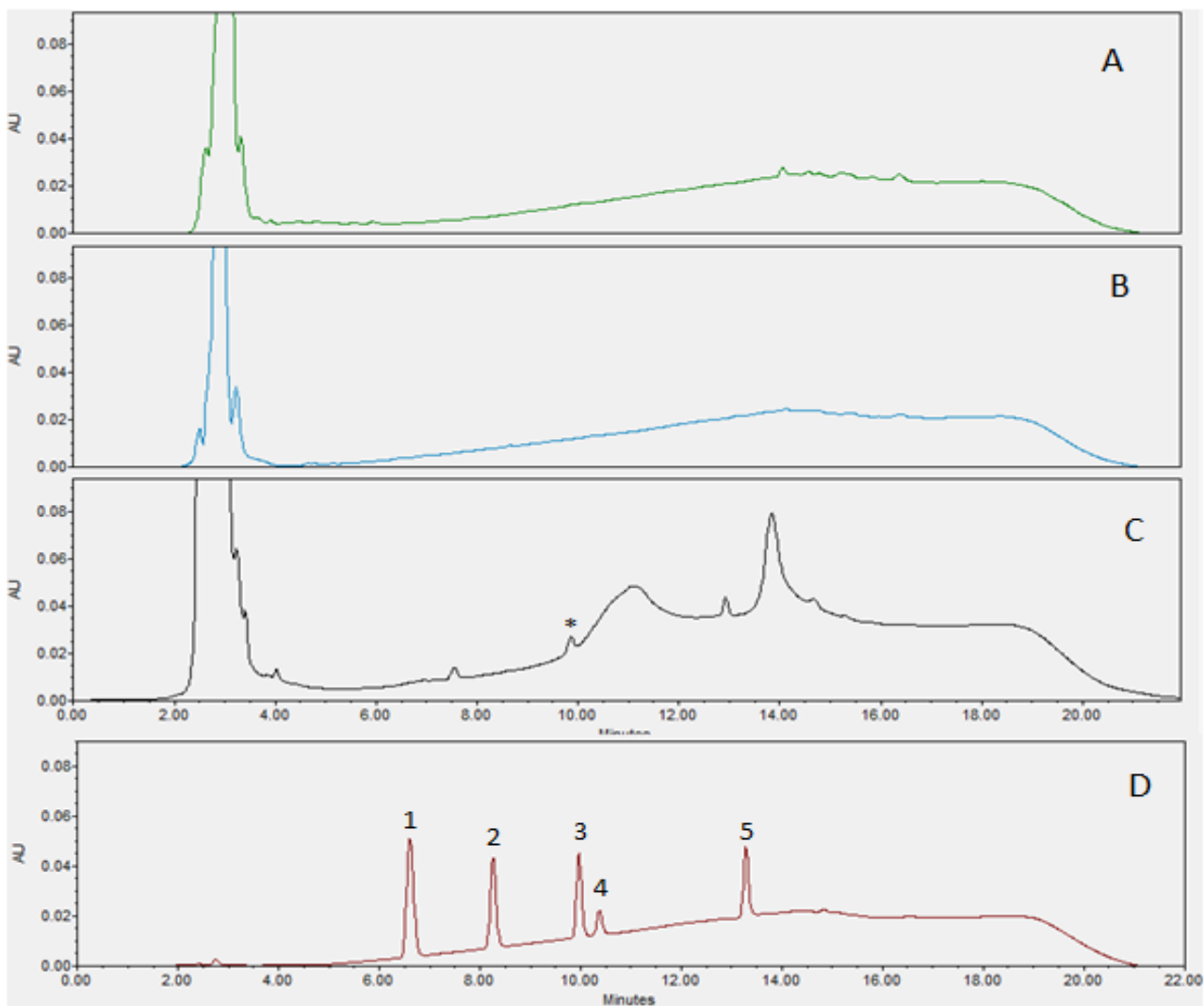


Figura 19. Cromatogramas obtenidos del análisis de diferentes muestras con el método DMFS-CLAR-UV. (A) Muestra 1: Mercado 19 de noviembre, (B) supermercado Wal-Mart y (C) supermercado Soriana, (D) Disolución estándar a 10 ppm. \*PPB en muestra.

## Conclusiones

- Se desarrolló una metodología para la extracción de Metilparabeno, Etilparabeno, Propilparabeno, DEET y Benzofenona-3 en músculo de Tilapia mediante DMFS y su determinación por CLAR-UV.
- Se optimizó la separación cromatográfica de los analitos Metilparabeno, Etilparabeno, Propilparabeno, DEET y Benzofenona-3 utilizando un gradiente de elución con fase móvil metanol y agua. Se obtuvieron buenos valores de eficiencia y factor de retención para todos los analitos y los valores de resolución fueron adecuados con valores mayores a 1.5 a excepción del par de picos del PPB y DEET ( $R_s = 0.98$ ).
- El sistema cromatográfico demostró ser lineal con coeficientes de determinación ( $r^2$ ) mayores a 0.99, preciso con C.V.% menores a 6% y con límites de cuantificación entre 0.33 y 0.47 ppm.
- Las condiciones óptimas de extracción de los analitos fueron: 1 g de músculo de Tilapia mojarra (peso húmedo), 1 g de sílice C18, 0.2 g de florisil como co-columna y elución con 5 mL de ACN 100 %.
- El método DMFS-CLAR-UV fue validado obteniéndose valores aceptables para la linealidad con coeficientes de determinación ( $r^2$ ) mayores a 0.95, buena exactitud con recobros mayores a 66 %, buena precisión con C.V.% < 16 y límites de cuantificación entre 0.5 y 0.7  $\mu\text{g/g}$ .
- El método validado se aplicó a tres muestras comerciales de músculo de Tilapia adquiridos en diferentes establecimientos y solo se detectó al analito Propilparabeno en la muestra adquirida en el supermercado Soriana.

## Perspectivas

- Con el fin de disminuir los límites de cuantificación para los analitos, el método de DMFS desarrollado en esta tesis servirá como base para acoplar un sistema de preconcentración y análisis en línea mediante el uso de la técnica de Extracción en Fase Sólida y el sistema cromatográfico.
- Se espera que el método de DMFS con análisis en línea sea aplicado para el monitoreo de los contaminantes emergentes estudiados en muestras de músculo de pescado en un monitoreo más extenso que incluya tanto muestras comerciales como muestras obtenidas en los sitios de cultivo de Tilapia mojarra.

## Anexo I

- Curvas de calibración para la linealidad del sistema.

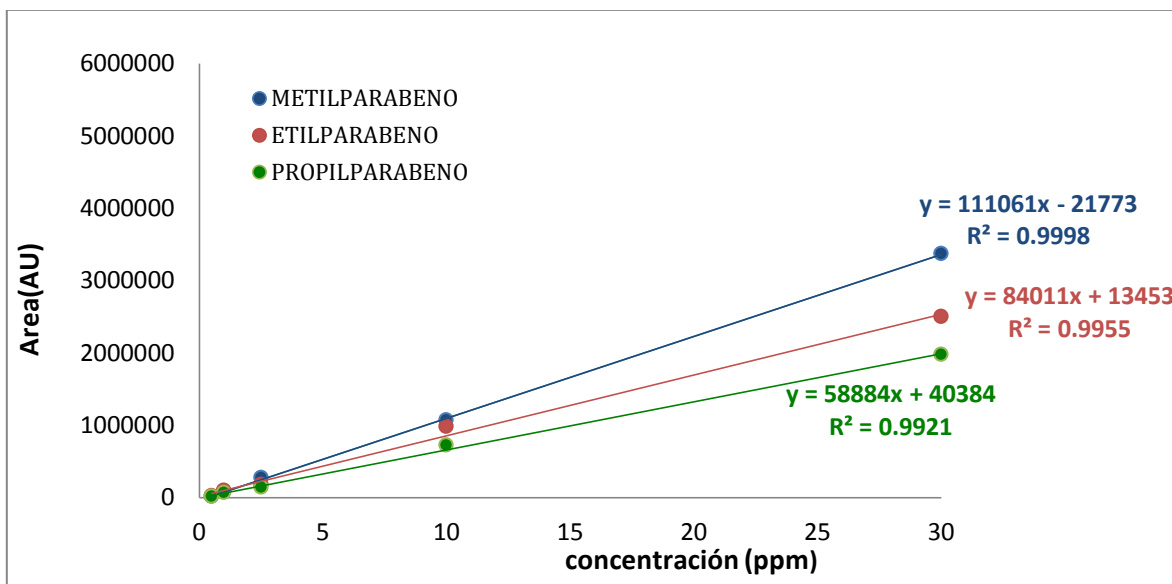


Figura 20 Curvas de calibración de metilparabeno, etilparabeno y propilparabeno de cinco niveles de concentración 0.5, 1.0, 2.5, 10.0 y 30.0 ppm.

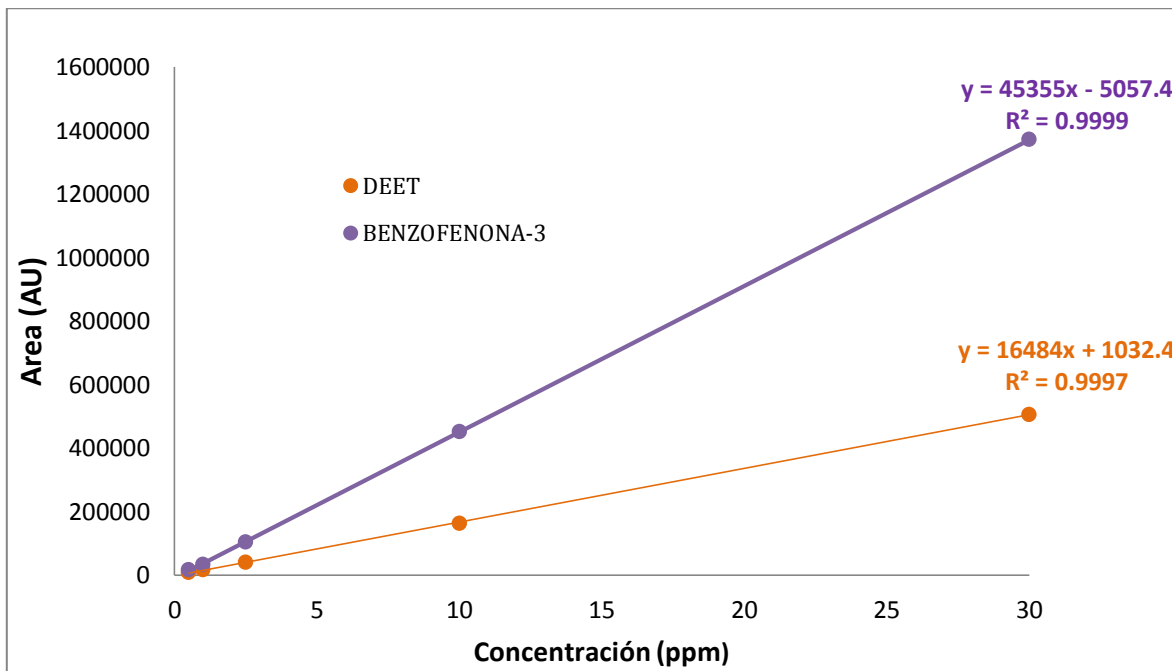


Figura 21 Curvas de calibración de DEET y benzofenona-3 de cinco niveles de concentración 0.5, 1.0, 2.5, 10.0 y 30.0 ppm.

## Anexo II

- Curvas de calibración para la linealidad del método

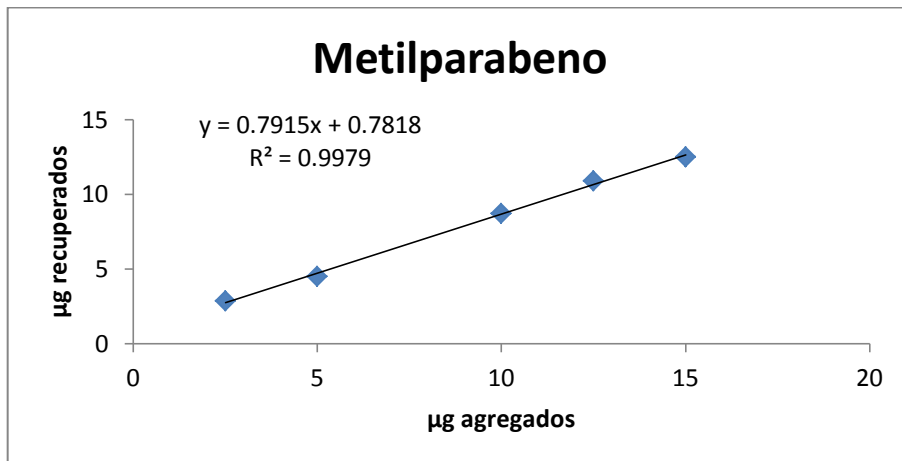


Figura 22 Curva de calibración de metilparabeno, de cinco niveles de fortificación 2.5, 5,10, 12.5 y 15  $\mu\text{g}$  agregados.

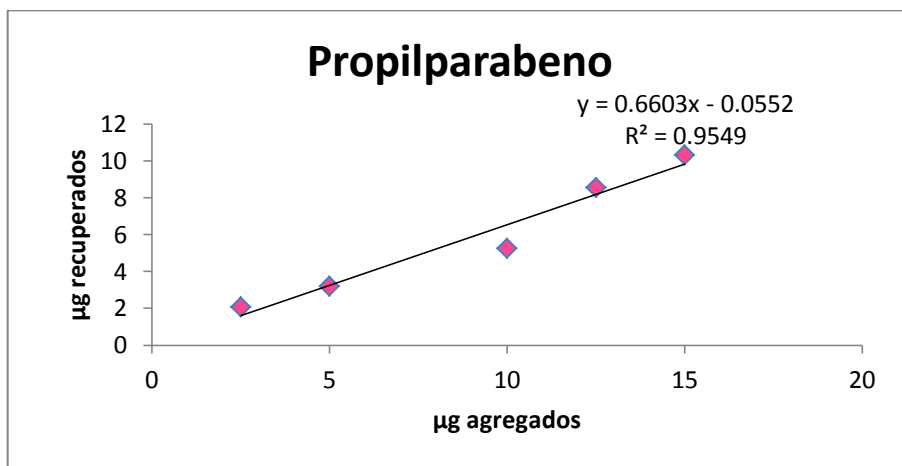


Figura 23 Curva de calibración de Propilparabeno, de cinco niveles de fortificación 2.5, 5,10, 12.5 y 15  $\mu\text{g}$  agregados



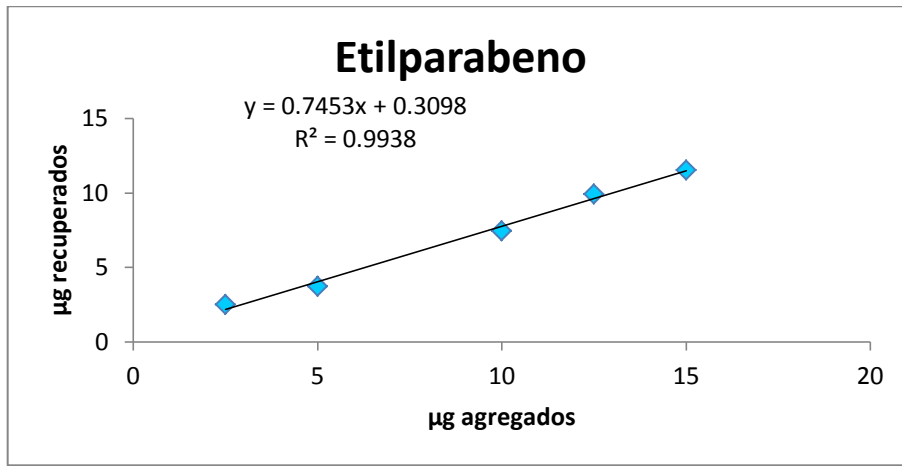


Figura 24 Curva de calibración de Etilparabeno, de cinco niveles de fortificación 2.5, 5,10, 12.5 y 15 µg agregados.

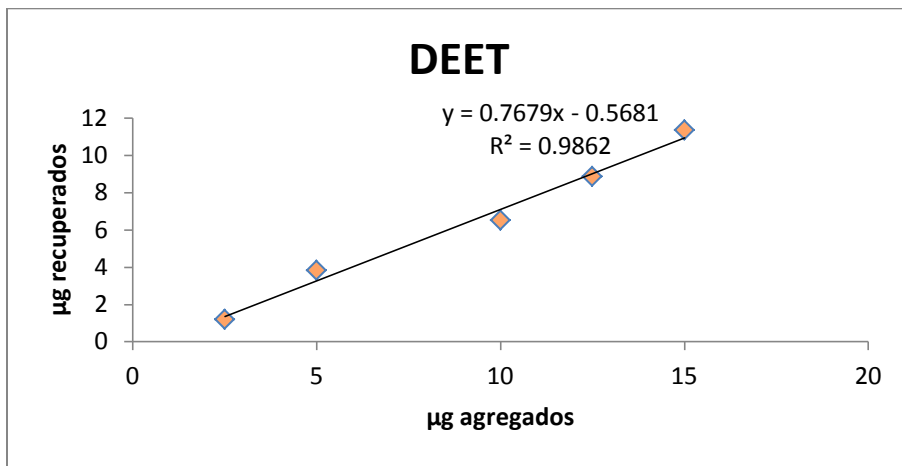


Figura 25 Curva de calibración de DEET, de cinco niveles de fortificación 2.5, 5,10, 12.5 y 15 µg agregados.

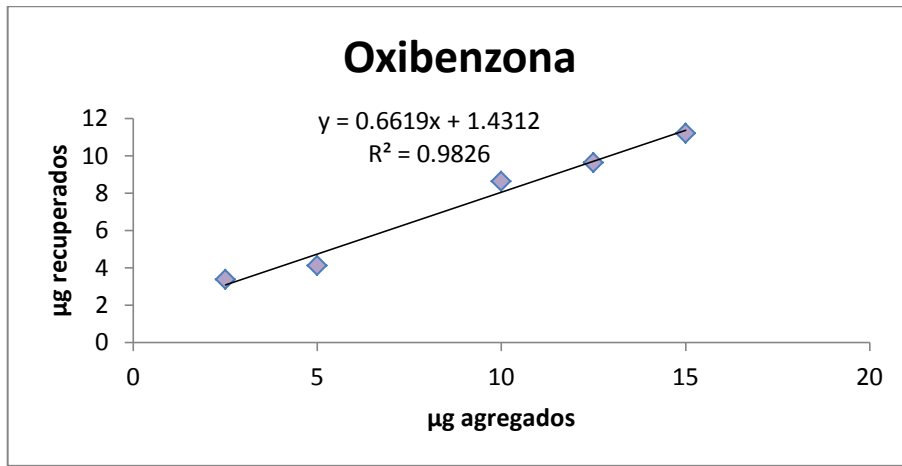


Figura 26 Curva de calibración de oxibenzona, de cinco niveles de fortificación 2.5, 5,10, 12.5 y 15 µg agregados.

## Anexo III



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Otorga el presente

SEGUNDO  
CONGRESO

SEGUNDO CONGRESO  
DE CIENCIA, EDUCACIÓN Y TECNOLOGÍA



## RECONOCIMIENTO

A: José de Jesús Olmos Espejel, Gabriela León Romero

Por haber obtenido el **1er. lugar** en la sesión de Ciencias Químicas con el trabajo en la modalidad de cartel:

**“Desarrollo de una metodología analítica para el análisis de conservadores y contaminantes emergentes en muestras de pescado mediante CLAR UV”**

que se llevó a cabo del 27 al 30 junio de 2016 en las instalaciones de esta Facultad

**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Cuautitlán Izcalli, Estado de México, julio de 2016

Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez  
Jefa de la División de Ciencias Químico Biológicas





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Otorga el presente

SEGUNDO  
CONGRESO

SEGUNDO CONGRESO  
DE CIENCIA, EDUCACIÓN Y TECNOLOGÍA



## RECONOCIMIENTO

A: José de Jesús Olmos Espejel, Gabriela León Romero

Por haber obtenido el **1er. lugar** en la sesión de Ciencias Químicas con el trabajo en la modalidad de cartel:

**“Desarrollo de una metodología analítica para el análisis de conservadores y contaminantes emergentes en muestras de pescado mediante CLAR UV”**

que se llevó a cabo del 27 al 30 junio de 2016 en las instalaciones de esta Facultad

**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Cuautitlán Izcalli, Estado de México, julio de 2016

Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez  
Jefa de la División de Ciencias Químico Biológicas







**UAEM** | Universidad Autónoma  
del Estado de México

La Red Iberoamericana de Química Analítica  
a través de la Facultad de Química

Otorga la presente

# Constancia

a

Gabriela León Romero, Alma Luisa Revilla Vázquez, José de Jesús Olmos Espejel.

por haber presentado el trabajo

Determinación de ingredientes de productos de cuidado personal en músculo de  
pescado mediante DMFS y CLAR

en el marco del

**VI Congreso Iberoamericano de Química Analítica y  
Encuentro Nacional de Química Ambiental,**

celebrado del 15 al 18 de noviembre de 2016

Cancún, Quintana Roo; 18 de noviembre de 2016

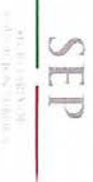
Dr. en I. Carlos Eduardo Barrera Díaz  
Director de la Facultad de Química



Dr. Jorge Javier Ramírez García  
Presidente del Comité Organizador



**Universidad Popular de la Chontalpa**  
**Secretaría de Educación Pública**  
**Secretaría de Salud del Estado de Tabasco**



*Otorgan la presente*

*Constancia*

**A:** Gabriela León Romero, Alma Luisa Revilla Vázquez, José de Jesús Olmos Espejel

Por su participación en la Presentación de Cartel con el Tema:  
**"DETERMINACIÓN DE PRODUCTOS DE CIUDADO PERSONAL EN MÚSCULO DE PESCADO MEDIANTE DMFS-**

**CLAR-UV"**  
Dentro del Marco del **1<sup>er</sup>. CONGRESO NACIONAL DE QUÍMICA**  
**Siglo XXI: "Los retos de la Química en el Cuidado de la Salud"**

Duración: 2 horas.

Valor Curricular: 1 Crédito.

24 de noviembre de 2017, Villahermosa, Tabasco

**M.C. y H. Querubín Fernández Quintana**  
Rector de la UPCH



**Dr. Esmelín Trinidad Vázquez**  
Directora de Calidad y Educación en Salud

Proyecto Realizado con Financiamiento de la Secretaría De Educación Pública-subsecretaría de Educación Superior-Dirección General de Educación Superior Universitaria Convenio No. : 2017-27-004-139

## Bibliografía

1. Lin, Y.-L. and B.-K. Li, *Removal of pharmaceuticals and personal care products by Eichhornia crassipe and Pistia stratiotes*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2016. **58**: p. 318-323.
2. Roberts, J., et al., *Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Australia's largest inland sewage treatment plant, and its contribution to a major Australian river during high and low flow*. Science of The Total Environment, 2016. **541**: p. 1625-1637.
3. Dimpe, K.M. and P.N. Nomngongo, *Current sample preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016. **82**: p. 199-207.
4. Estévez, E., et al., *Resultados preliminares de los análisis de contaminantes emergentes y sustancias prioritarias (2008/105/CE) en la red de control del Barranco de las Goteras (Gran Canaria)*. Estudios en la Zona no Saturada del Suelo. Vol X, 2011. **Vol X**: p. 309-314.
5. Salazar, P.A.A., *Contaminantes emergentes en aguas residuales y de río y fangos de depuradora*, in *Química analítica i Química Orgànica 2015*, Universitat Rovira i Virgili: Tarragona.
6. Luo, Y., et al., *A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment*. Science of The Total Environment, 2014. **473**: p. 619-641.
7. Jordi Romero, M.G., María José Vázquez, *Determinación de fármacos y productos de cuidado personal (ppcp) en aguas naturales y residuales*. Tecnología y ciencias del agua, 2004. **nº 24, Nº 253**: p. 30-41.
8. Elizabeth Undiano, N.A.y.M.A., *Contaminantes emergentes, ¿qué son y cómo nos afectan?* Academis De Ciencias De Morelos, A.C., 2017.

9. Pietrogrande, M.C. and G. Basaglia, *GC-MS analytical methods for the determination of personal-care products in water matrices*. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2007. **26**(11): p. 1086-1094.
10. Liu, J.-L. and M.-H. Wong, *Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): A review on environmental contamination in China*. *Environment International*, 2013. **59**: p. 208-224.
11. Wang, J. and S. Wang, *Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from wastewater: A review*. *Journal of Environmental Management*, 2016. **182**: p. 620-640.
12. Ebele, A.J., M. Abou-Elwafa Abdallah, and S. Harrad, *Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment*. *Emerging Contaminants*, 2017. **3**(1): p. 1-16.
13. Peng, X., et al., *Occurrence of steroid estrogens, endocrine-disrupting phenols, and acid pharmaceutical residues in urban riverine water of the Pearl River Delta, South China*. *Science of The Total Environment*, 2008. **397**(1): p. 158-166.
14. Gutiérrez, R., *Estudian la relación de contaminantes emergentes con cáncer, obesidad y diabetes, in Gaceta digital UNAM*. 2016: Ciudad universitaria.
15. Ocaña-González, J.A., et al., *New developments in the extraction and determination of parabens in cosmetics and environmental samples. A review*. *Analytica Chimica Acta*, 2015. **858**: p. 1-15.
16. Soni, M.G., I.G. Carabin, and G.A. Burdock, *Safety assessment of esters of p-hydroxybenzoic acid (parabens)*. *Food and Chemical Toxicology*, 2005. **43**(7): p. 985-1015.
17. Błędzka, D., J. Gromadzińska, and W. Wąsowicz, *Parabens. From environmental studies to human health*. *Environment International*, 2014. **67**: p. 27-42.
18. Valle-Sistac, J., et al., *Determination of parabens and benzophenone-type UV filters in human placenta. First description of the existence of benzyl paraben and benzophenone-4*. *Environment International*, 2016. **88**: p. 243-249.



19. Paul Westerhoff, Y.Y., Shane Snyder and Eric Wert, *Fate of Endocrine-Disruptor, Pharmaceutical, and Personal Care Product Chemicals during Simulated Drinking Water Treatment Processes*. Environ. Sci. Technol, 2005. **39**: p. 6649-6663.
20. Li, W., et al., *Occurrence, fate and risk assessment of parabens and their chlorinated derivatives in an advanced wastewater treatment plant*. Journal of Hazardous Materials, 2015. **300**: p. 29-38.
21. Djatmika, R., et al., *Determination of paraben preservatives in seafood using matrix solid-phase dispersion and on-line acetylation gas chromatography–mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2016. **1036**: p. 93-99.
22. Calafat, A.M., et al., *Novel exposure biomarkers of N,N-diethyl-m-toluamide (DEET): Data from the 2007–2010 National Health and Nutrition Examination Survey*. Environment International, 2016. **92**: p. 398-404.
23. Antwi, F.B., L.M. Shama, and R.K.D. Peterson, *Risk assessments for the insect repellents DEET and picaridin*. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2008. **51(1)**: p. 31-36.
24. Ramos, S., et al., *Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment — A review*. Science of The Total Environment, 2015. **526**: p. 278-311.
25. Gago-Ferrero, P., M.S. Díaz-Cruz, and D. Barceló, *UV filters bioaccumulation in fish from Iberian river basins*. Science of The Total Environment, 2015. **518**: p. 518-525.
26. C., C.N.S.P.T.C.S.P.T.D.M.A., *TILAPIA 2020: PROSPECTIVO DEL SISTEMA-PRODUCTO NACIONAL DE TILAPIA EN MÉXICO*. 2010.
27. Sergio José Toledo Pérez, M.C.G.C., *Nutrición y Alimentación de Tilapia Cultivada en América Latina y el Caribe*. 2000.
28. Secretaria de agricultura, G., desarrollo rural pesca y alimentación *ACUERDO mediante el cual se aprueba la actualizacion de la carta nacional acuicola*. 2012.
29. Secretaría de Agricultura, G., Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, *Mojarra tilapia, importante producto acuícola*. 2016.

30. SAGARPA, *Anuario estadístico de acuacultura y pesca 2012 de la Comisión Nacional de Acuacultura y Pesca, 2012*. 2013.
31. Claudio Jiménez Cartagena, D.E.L.P., Gustavo Antonio Peñuela Mesa, *Retos analíticos y perspectivas instrumentales del monitoreo de pesticidas*.
32. Barker, S.A., *Applications of matrix solid-phase dispersion in food analysis*. Journal of Chromatography A, 2000. **880**(1): p. 63-68.
33. Barker, S.A., *Matrix solid phase dispersion (MSPD)*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2007. **70**(2): p. 151-162.
34. Reyes, M.d.I.I.R., *Determinación de residuos de plaguicidas organofosforados en hígado de res mediante dispersión de matriz en fase sólida y cromatografía de líquidos con detección UV.* , in *Programa de maestría y doctorado en ciencias Químicas*. 2006, Universidad nacional Autónoma de México: México.
35. Lloyd R. Snyder, J.J.K., John W. Dolan, *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Vol. third edition. 2010, New Jersey: John Wiley & sons.
36. Douglas A. Skoog, D.M.W., *Fundamentos de química analítica*. reprint ed. 2005: Thomson
37. Garcia, J.I.A., *Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) para cuantificar muestras de 17-B estradiol y progesterona proveniente de perfiles de disolución.* . 2011, Universidad Nacional Autónoma de México: México D.F.
38. Campos, B.G.D., *Aspectos comparativos de la revalidación de métodos en el cambio de columnas analíticas utilizadas en cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)*, in *Departamento de farmacia, Facultad de química*. 2014, Universidad Nacional Autónoma de México: México.
39. Quevedo, G.H., *Determinación de halógenos por cromatografía iónica en inclusiones fluidas por el método crush-leach: validación y aplicación a rocas carbonatadas del golfo de México.*, in *Programa de posgrado en ciencias de la tierra centro de geo ciencias*. 2014, Universidad Nacional Autónoma De México: México.

40. Susana, R.G.A. *Cromatografía, Curso de Métodos*. 2002 febrero 2017; Available from: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Cromatografia.pdf>.
41. analítico, U.c.d.V.e.d.q.f.d.c.i. *GUIA DE CROMATOGRAFÍA*. 2008 febrero 2017]; Available from: <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/LIApregrado/archivos/Guia%20para%20cromatografia.pdf>.
42. Chen, C.-L., D.-Y. Tsai, and W.-H. Ding, *Optimisation of matrix solid-phase dispersion for the determination of Dechlorane compounds in marketed fish*. Food Chemistry, 2014. **164**: p. 286-292.
43. Tsai, D.-Y., C.-L. Chen, and W.-H. Ding, *Optimization of matrix solid-phase dispersion for the rapid determination of salicylate and benzophenone-type UV absorbing substances in marketed fish*. Food Chemistry, 2014. **154**: p. 211-216.
44. Tao, Y., et al., *Evaluation of matrix solid-phase dispersion (MSPD) extraction for multi-fenols determination in shrimp and fish by liquid chromatography–electrospray ionisation tandem mass spectrometry*. Food Chemistry, 2014. **150**: p. 500-506.
45. Pan, X.-D., et al., *Determination of chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol in fish muscle by matrix solid-phase dispersion extraction (MSPD) and ultra-high pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Food Control, 2015. **52**: p. 34-38.
46. Cela-Pérez, M.C., et al., *Selective removal of ATP degradation products from food matrices II: Rapid screening of hypoxanthine and inosine by molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion for evaluation of fish freshness*. Talanta, 2015. **135**: p. 58-66.
47. Sun, X., et al., *Novel dummy molecularly imprinted polymers for matrix solid-phase dispersion extraction of eight fluoroquinolones from fish samples*. Journal of Chromatography A, 2014. **1359**: p. 1-7.

48. Han, C., et al., *Determination of four paraben-type preservatives and three benzophenone-type ultraviolet light filters in seafoods by LC-QqLIT-MS/MS*. Food Chemistry, 2016. **194**: p. 1199-1207.
49. Jakimska, A., et al., *Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry procedure for determination of endocrine disrupting compounds in fish from Mediterranean rivers*. Journal of Chromatography A, 2013. **1306**: p. 44-58.
50. Kim, J.-W., et al., *Multiresidue analytical method for the determination of antimicrobials, preservatives, benzotriazole UV stabilizers, flame retardants and plasticizers in fish using ultra high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(22): p. 3511-3520.
51. Ramaswamy, B.R., et al., *Determination of preservative and antimicrobial compounds in fish from Manila Bay, Philippines using ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, and assessment of human dietary exposure*. Journal of Hazardous Materials, 2011. **192**(3): p. 1739-1745.
52. Taverniers, I., M. De Loose, and E. Van Bockstaele, *Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2004. **23**(8): p. 535-552.