



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

ELABORACIÓN DE FIBRAS PARA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA *in vivo*  
Y SU APLICACIÓN EN LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS EMERGENTES  
EN TOMATE CHERRY (*Lycopersicon esculentum*).

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. HUMBERTO GÓMEZ MARTÍNEZ

TUTORA

DRA. ARACELI PATRICIA PEÑA ÁLVAREZ  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., OCTUBRE, 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

# **JURADO**

**Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero**

Presidente

**Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez**

Vocal

**Dr. José Antonio Rodríguez Ávila**

Vocal

**Dr. Omar Amador Muñoz**

Vocal

**Dr. Luis Fernando Olguín Contreras**

Secretario

Este proyecto se desarrolló en el laboratorio 101, Departamento de Química Analítica, Edificio B, Facultad de Química, Ciudad Universitaria, CDMX, México.

Tutora

---

Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez

Sustentante

---

Q. Humberto Gómez Martínez

# DEDICATORIA

*Con amor a mi hijo, Oskar Alejandro.*

*A mis sobrinos: Alicia Esmeralda, Andrea Valentina,  
Christopher Isaac, Francisco Javier y Jesús Israel.*

*Yo, un universo de átomos, un átomo en el universo. Richard Phillips Feynman.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi padre y mi madre, por su amor, confianza y apoyo incondicional, por sus consejos y enseñanzas, por todo lo que me han dado estaré eternamente agradecido.

A mis hermanos, Juan Carlos y Ricardo, por su compañía, amistad y comprensión. Quisiera recuperar esta última década y pasar más tiempo con ustedes. Ojalá siempre tengan presente lo mucho que los quiero.

A Stephanie, bonita, gracias por tanta vida a tu lado. Me has dado lo mejor del mundo. Por tu amor, cariño, apoyo y comprensión.

A mis abuelos, por su cariño incondicional, por ser las personas que siempre ansío ver desde que era niño.

A Guadalupe Chávez, Gabi Reyes, Elvia Chávez e Israel Chávez (QEPD), por aceptarme como parte de su familia, por su valioso apoyo y cariño.

A mis amigos del laboratorio 101, Jesús Olmos, la maestra Rocío Juárez, Jerónimo Cabrera, Berenice Torres, Ignacio Zúñiga, Fernanda Rosas, Mariana Guerrero, a la bióloga María Elena Loeza. Gracias por sus consejos, por darme la oportunidad de conocer a tan valiosas personas.

A Irán Ocaña y Ana Cristina Heredia, gracias totales por estar, escucharme, alentarme, por ser tan geniales.

A la Dra. Araceli Peña, por la oportunidad de colaborar con ella, sus enseñanzas, su apoyo, paciencia y compartirme su valiosa experiencia.

Al Dr. Luis Fernando Olguín Contreras, por sus valiosas ideas y aportes a este proyecto.

A mis amigos, Omar Huerta, Santiago Arrona, Ernesto Granados, Javier Álvarez, Ernesto López, Marco Castruita, Esther Zamora, Gustavo Estrada, Ilse Vega, Maricela Orozco, Donají Mora, Noemí García, Sofía Padilla, Francisco Valencia, Carlos Bermejo, Karina Salomón, Josué Valdés, Magali Álvarez, Lan Bernal, Rodrigo Alemán, Maximiliano Regalado y a los green brothers, por su invaluable compañía y los buenos ratos vividos. Los llevaré siempre muy presentes.

Al Dr. Felipe Cruz García, a Yuri Cruz, a Yuri Osvaldo y a mis compañeros del laboratorio 104 del conjunto E de la FQ.

A los honorables miembros del jurado, por sus valiosas observaciones para enriquecer este trabajo.

Al personal del posgrado en química, Jesús Gumaro, Josefina Tenopala, Ana María Nuñez, Ana Valeria Barrientos y Mary Cruz Salazar, por sus atenciones.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química.

A la dirección general de asuntos del personal académico (DGAPA), por los proyectos PAPIIT: IN 214418, y PAIP: 5000-9026.

Al CONACyT por la beca otorgada (Numero de becario: 626636).

*Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en el XXXII Congreso Nacional de Química Analítica en San Luis Potosí, México del 12 al 14 de junio de 2019*



## RESUMEN

El análisis ambiental presenta gran variedad de matrices que, para ser analizadas, requieren de sistemas apropiados para la detección y cuantificación, así como de técnicas sensibles, sencillas, reproducibles y robustas de preparación de muestra con el fin de obtener resultados confiables.

Desde la introducción de la microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés), los diversos tipos de recubrimientos y configuraciones demuestran que tienen un papel crucial en la eficiencia de extracción. Las principales características deseadas de estos recubrimientos son: gran área superficial, resistencia térmica, mecánica y química.

En este trabajo, se desarrolló una metodología para la fabricación de fibras para SPME a base de polidimetilsiloxano (PMDS), y otra de PDMS con partículas de octadecilsilano (C18). Se observó que parámetros como temperatura y tiempo de curado, proporción de componentes de la mezcla (PDMS base, agente curante y cantidad de C18), molde y soporte de la fibra, son críticos en el proceso de fabricación. Las fibras se caracterizaron por microscopía electrónica de barrido. Su capacidad de extracción se evaluó con la determinación de contaminantes emergentes (cinco filtros UV, un retardante de flama y un repelente de insectos) en tomate cherry cultivados en el laboratorio e irrigados con estos contaminantes y en agua con los mismos compuestos utilizando microextracción en fase sólida seguido de cromatografía de gases y espectrometría de masas (SPME-GC-MS).

Los resultados de la repetibilidad en la determinación de los contaminantes en estudio en agua fortificada utilizando SPME-GC-MS fueron aceptables para la fibra PDMS 1.7 – 14.7 % y 1.0 – 17.1 % PDMS-C18. Por otro lado, en la determinación de los contaminantes en tomate cherry por SPME *in vivo*-GC-MS la fibra de PDMS-C18 mostró mejores resultados. Además, las fibras obtenidas de PDMS demostraron ser más económicas en comparación con las fibras comerciales, con mejor resistencia mecánica y con equivalente capacidad de extracción. Por otro lado, la fibra de PDMS-C18 se ubica como una novedosa fase extractante adecuada para SPME *in vivo* con una elevada capacidad de extracción, que no existe de forma comercial.

# Contenido

RESUMEN.....	8
ABREVIATURAS .....	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
JUSTIFICACIÓN.....	16
OBJETIVO GENERAL .....	16
OBJETIVOS PARTICULARES .....	16
HIPÓTESIS .....	17
2. ANTECEDENTES.....	18
2.1 Microextracción en fase sólida (SPME).....	18
2.1.1 Teoría.....	19
2.1.2 Fibras y dispositivos.....	24
2.1.3 Fibras para SPME disponibles comercialmente.....	24
2.2 Elaboración de fibras para SPME.....	25
2.2.1 Tipos de recubrimientos .....	25
2.2.2 Soporte de sílice fundida .....	26
2.2.3 Soportes metálicos.....	26
2.2.4 Fases poliméricas extractantes.....	26
2.2.5 Métodos de preparación.....	27
2.2.6 Preparación del soporte .....	29
2.2.7 Fijación de la fase extractante .....	31
2.3 Caracterización de fibras para SPME .....	32
2.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM) .....	32
2.4 Fibras para SPME <i>in vivo</i> .....	33

2.5	Aplicaciones de SPME en el análisis <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> en tomate.....	34
2.6	Métodos de calibración para SPME <i>in vivo</i> .....	36
2.7	Biomonitoreo de contaminantes .....	38
2.8	Contaminantes emergentes .....	39
2.9	Sorción de contaminantes emergentes en plantas.....	40
2.10	Técnicas analíticas.....	42
2.10.1	Cromatografía de gases .....	42
2.10.2	Espectrometría de masas .....	45
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	47
3.1	Reactivos y materiales .....	47
3.2	Preparación de las disoluciones estándar.....	47
3.3	Equipos .....	47
3.4	Muestras.....	48
3.5	Métodos .....	49
3.5.1	Fabricación de las fibras.....	49
3.5.2	Caracterización de fibras .....	52
3.5.3	Evaluación de fibras .....	52
3.5.4	SPME <i>in vivo</i> en tomate cherry ( <i>L. esculentum</i> ) .....	53
3.5.4.1	Perfil de extracción .....	54
3.5.5	Análisis por SPME <i>in vivo</i> .....	54
3.5.5.1	SPME <i>in vitro</i> -GC-MS .....	55
3.5.5.1.1	SPME <i>in vitro</i> .....	55
3.5.5.1.2	Selección de la fibra .....	55
3.5.5.1.3	Perfil de extracción.....	56
3.5.5.1.4	Condiciones de extracción .....	56

3.5.5.1.5	Efecto matriz .....	56
3.5.5.2	Evaluación del método.....	57
3.5.5.2.1	Límite de cuantificación (LC) y límite de detección (LD).....	57
3.5.5.2.2	Linealidad.....	57
3.5.5.2.3	Repetibilidad .....	58
3.5.5.2.4	Recuperación.....	58
3.5.5.2.5	Robustez.....	58
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	59
4.1	Fabricación de fibras de PDMS y PDMS-C18 .....	59
4.1.1	Preparación del soporte de la fibra .....	59
4.1.2	Elaboración de la fase extractante .....	59
4.1.3	Caracterización de las fibras.....	61
4.1.4	Evaluación de las fibras .....	63
4.2	SPME <i>in vivo</i> en tomate cherry ( <i>L. esculentum</i> ).....	66
4.2.1	Perfil de extracción.....	69
4.3	SPME <i>in vitro</i> -GC-MS.....	71
4.3.1	SPME <i>in vitro</i> .....	71
4.3.2	Selección de la fibra para SPME .....	71
4.3.3	Perfil de extracción.....	72
4.3.4	Efecto matriz.....	73
4.3.5	Evaluación del método analítico.....	74
4.3.5.1	Límite de cuantificación (LC) y límite de detección (LD) .....	74
4.3.5.2	Linealidad .....	75
4.3.5.3	Repetibilidad.....	75
4.3.5.4	Recuperación .....	75

4.3.5.5	Robustez.....	76
4.3.5.6	Análisis de tomates cosechados .....	76
4.4	Relación SPME <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	77
CONCLUSIÓN .....		80
PERSPECTIVAS .....		81
BIBLIOGRAFÍA.....		82
ANEXOS .....		87

## ABREVIATURAS

<b>BSE</b>	Electrones Retrodispersados (por sus siglas en inglés)	<b>PAH</b>	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (por sus siglas en inglés)
<b>C18</b>	Octadecilsilano enlazado a partículas porosas de sílice fundida	<b>PDMS</b>	Polidimetilsiloxano
<b>CAR</b>	Carboxen	<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>DVB</b>	Divinilbenceno	<b>PAN</b>	Poliacrilonitrilo
<b>FID</b>	Detector de Ionización de Flama	<b>PTAR</b>	Plantas de Tratamiento de Agua Residual
<b>FTIR</b>	Espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier (por sus siglas en inglés)	<b>PPCP</b>	Productos Farmacéuticos y de Cuidado Personal
<b>EDS</b>	Detector de energía dispersiva (por sus siglas en inglés)	<b>PPY</b>	Polipirrol
<b>EPA</b>	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (por sus siglas en inglés)	<b>PTFE</b>	Politetrafluoroetileno (Teflón®)
<b>GC</b>	Cromatografía de Gases (por sus siglas en inglés)	<b>RAM</b>	Materiales de Acceso Restringido (por sus siglas en inglés)
<b>IUPAC</b>	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (por sus siglas en inglés)	<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear (por sus siglas en inglés)
<b>IMS</b>	Espectrometría de Movilidad Iónica (por sus siglas en inglés)	<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>LLE</b>	Extracción líquido-líquido	<b>SE</b>	Electrones secundarios (por sus siglas en inglés)
<b>LLME</b>	Microextracción líquido-líquido	<b>SEM</b>	Microscopía electrónica de barrido (por sus siglas en inglés)
<b>MAE</b>	Extracción Asistida por Microondas	<b>SFE</b>	Extracción con Fluidos Supercríticos (por sus siglas en inglés)
<b>MS</b>	Espectrometría de Masas	<b>SPE</b>	Extracción en Fase Sólida
		<b>SPME</b>	Microextracción en fase sólida
		<b>TGA</b>	Análisis termogravimétrico (por sus siglas en inglés)
		<b>VOCs</b>	Compuestos Orgánicos Volátiles

# 1. INTRODUCCIÓN

Las técnicas de preparación de muestra se han enfocado en los últimos años a mejorar aspectos como: reducir la cantidad de muestra, lograr la automatización de los análisis o métodos en línea que reduzcan la manipulación para obtener metodologías más sensibles, precisas, eficientes y que sean ambientalmente amigables (química verde) con la producción de menos residuos debido a la disminución de volúmenes de disolventes orgánicos.<sup>1</sup>

De acuerdo con la EPA<sup>2</sup>, los contaminantes emergentes se clasifican como contaminantes que se encuentran en el ambiente producidos por las actividades humanas. Esos contaminantes no tienen especificaciones o alguna legislación que esté en vigor para regular su presencia en el ambiente. Los contaminantes en los desperdicios usualmente son resistentes a la degradación. Por lo tanto, estos tienden acumularse en el ambiente lo que eventualmente representa un riesgo a los organismos vivientes.

El análisis directo de contaminantes emergentes en matrices complejas es difícil debido a que en algunas muestras están presentes en muy bajas concentraciones y pueden estar asociados con la propia matriz. Por esta razón es difícil predecir su transporte y acumulación en el ambiente debido a la poca información disponible.

Los contaminantes emergentes como los productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs), disruptores endócrinos, surfactantes, agentes desinfectantes y detergentes se encuentran en el ambiente y se sabe que éstos tienen efectos negativos en los organismos vivos. La determinación de estos contaminantes en diferentes matrices ambientales, frecuentemente requieren técnicas de separación que sean eficientes, selectivas y sensibles. Debido a la gran cantidad de interferencias, el análisis directo de estos contaminantes en matrices complejas requiere métodos de preparación de muestra rápidos, económicos, eficientes y amigables ambientalmente antes de la separación y cuantificación.

La preparación de muestra puede incluir procedimientos de: filtración, ajuste de pH, extracción, limpieza y preconcentración para asegurar que los analitos se encuentren en una concentración adecuada para el análisis y se evite o disminuya la presencia de compuestos interferentes.<sup>3</sup>

Se han desarrollado numerosos métodos para la preparación de muestra. Existen varias maneras de clasificarlos, de acuerdo con: el principio, la configuración, la escala o el tamaño,

el procedimiento de operación, el estado físico de las muestras, y la naturaleza física o química del proceso del muestreo. Algunos ejemplos de métodos de preparación de muestra son: microextracción en fase sólida, dispersión de matriz en fase sólida, extracción con fluidos supercríticos, extracción acelerada con disolventes, microextracción en fase líquida, microextracción en fase líquida de fibra hueca, microextracción dispersiva líquido-líquido, extracción con barra magnética, extracción asistida con microondas, extracción asistida con ultrasonido, entre otros.<sup>4</sup>

Una vez que los productos de los que provienen los contaminantes emergentes cumplen con su función, estos terminan en vertederos de basura o de aguas residuales que posteriormente pasan por un tratamiento que no elimina completamente dichos contaminantes y, por lo tanto, estos son persistentes en el efluente.<sup>5</sup> En algunas áreas es común que los cultivos sean irrigados con aguas tratadas y en ese momento ocurre la absorción de los PPCPs en plantas que, por las propiedades de hidrofobicidad de estos compuestos, tienden a bioacumularse.<sup>6</sup> Diversos estudios en cultivos hidropónicos (condiciones simplificadas) han demostrado que la sorción de los contaminantes emergentes en las plantas depende de sus propiedades fisicoquímicas como su constante de reparto octanol-agua ( $\log K_{ow}$ ), constante de reparto corregida por la constante de acidez ( $\log D_{ow}$ ) y  $pka$ <sup>7,8</sup>. La determinación de estos compuestos a nivel de trazas en matrices vegetales presenta un reto debido a la elevada cantidad de pigmentos y ceras que pueden interferir en el análisis. Por lo tanto, una forma para poder determinar los contaminantes en las plantas es idear estrategias apropiadas de preparación de muestra que eliminen dichas interferencias y preconcentren los analitos<sup>9</sup> para su posterior análisis por GC-MS.

El objetivo del presente trabajo es elaborar fibras para SPME *in vivo* manufacturadas en el laboratorio con la misma o equivalente capacidad de extracción que las comerciales y, aplicarlas en la determinación de contaminantes emergentes en tomate cherry (*Lycopersicon esculentum*) por SPME-GC-MS lo que permitirá disminuir el costo del análisis.



# JUSTIFICACIÓN

En análisis ambiental *in situ* puede requerir de una gran cantidad de fibras para SPME para el muestreo en puntos múltiples. Actualmente, algunas fibras comerciales o prototipos probablemente pueden cubrir los requerimientos para las aplicaciones de análisis ambiental y biológico. Sin embargo, los costos relativamente altos pueden seguir limitando su uso extensivo en esas áreas. Por lo tanto, las fibras manufacturadas en el laboratorio son alternativas muy atractivas. Para el análisis de matrices complejas, el bajo costo de las fibras hace más flexible el remplazo de las fibras sucias, lo cual hace frente a los efectos propios de la matriz de trabajo.<sup>10</sup> Es por tal motivo, que el desarrollo de metodologías para la fabricación de fibras para SPME es importante en el área del análisis químico ambiental para ganar aceptación y demostrar su viabilidad.

## OBJETIVO GENERAL

Elaborar fibras para SPME *in vivo* manufacturadas en el laboratorio con la misma o equivalente capacidad de extracción que las comerciales y utilizarlas en la determinación de contaminantes emergentes en tomate cherry (*Lycopersicon esculentum*) por SPME-GC-MS.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Desarrollar un proceso para la elaboración de fibras a base de PDMS y un compuesto de PDMS con partículas de C18 para su aplicación en SPME *in vivo*.
- Desarrollar, optimizar y validar una metodología analítica utilizando SPME seguido de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (SPME *in vivo* -GC-MS) que permita identificar y cuantificar contaminantes emergentes: filtros UV, retardantes de flama y repelentes de insectos en tomate cherry (*Lycopersicon esculentum*).

## HIPÓTESIS

Las fibras para SPME elaboradas en el laboratorio serán capaces de absorber contaminantes emergentes.

La planta de tomate cherry (*L. esculentum*) absorberá y acumulará los contaminantes emergentes aquí estudiados dependiendo de sus características fisicoquímicas. El análisis por SPME *in vivo* será capaz de dar cuenta de dicha absorción y acumulación.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Microextracción en fase sólida (SPME)**

El análisis de muestras complejas contiene pasos que incluyen: muestreo, pretratamiento de muestra, separación, identificación, cuantificación, procesamiento de datos y toma de decisiones. Cada uno de estos pasos tiene efectos significativos en la veracidad del resultado final.

El procedimiento de extracción tiene que ver con la selección representativa de puntos y métodos de muestreo apropiados. En algunos casos, las matrices complejas no son aptas para ser manipuladas directamente por los instrumentos de análisis, por lo tanto, se requiere de un pretratamiento de muestra que tiene como finalidad la extracción de los analitos de la matriz y obtenerlos en concentraciones apropiadas para su detección. El paso de separación se refiere a dividir la mezcla aislada que contienen a los analitos de interés en componentes individuales por alguna técnica de separación adecuada. La identificación y cuantificación puede confirmar (o rechazar) la presencia de estos compuestos y determinar su cantidad con ayuda de una detección selectiva, su tiempo de retención y área del pico.

Finalmente, el procesamiento de datos provee los resultados analíticos de los compuestos de interés que apoyan la toma de decisiones. Por lo tanto, la rapidez de cada paso determinará la velocidad final del procedimiento analítico y los errores existentes en cada paso afectarán la exactitud del proceso entero.

SPME como una técnica de preparación de muestra libre de disolventes y basada en el equilibrio desarrollada por Janusz Pawliszyn en 1990<sup>11</sup> requiere sólo una pequeña cantidad de material absorbente como fase extractante y, además, puede integrar muestreo, aislamiento y preconcentración de los analitos en un solo paso. Su versatilidad en cuanto a diseño, geometría y estrategias de calibración la hacen una excelente opción en diversidad de campos como el análisis ambiental y ciencias de la vida.

Es una técnica de preparación de muestra no exhaustiva que posee grandes ventajas; no se da un cambio químico en los componentes, ni en su concentración debido a que sólo pequeñas cantidades de analito son removidas de la muestra. Por lo tanto, usar de técnicas de microextracción ofrece información más representativa sobre la caracterización del sistema analítico bajo estudio en comparación con las técnicas de extracción exhaustivas.

En SPME, normalmente una pequeña cantidad de fase extractante ( $< 1 \mu\text{l}$ ) fijada en un soporte se expone en la muestra por un tiempo específico antes de su desorción y análisis, sin embargo, existen otras configuraciones como: tubo, paredes en un vaso, agitador, disco o membrana y partículas suspendidas que también permiten la extracción de los analitos (Imagen 2.1). La cantidad de analito (s) extraído (s) dependerá del tiempo de extracción. Tomando ventaja del tiempo de extracción y la absorción selectiva de los analitos, estos pasarán de la muestra a la fibra; en un primer paso, la fase extractante se expone a la muestra para extraer selectivamente los analitos por afinidad, posteriormente, los componentes extraídos por la fibra se desorben en el equipo o sistema adecuado para su separación y análisis.<sup>12</sup>

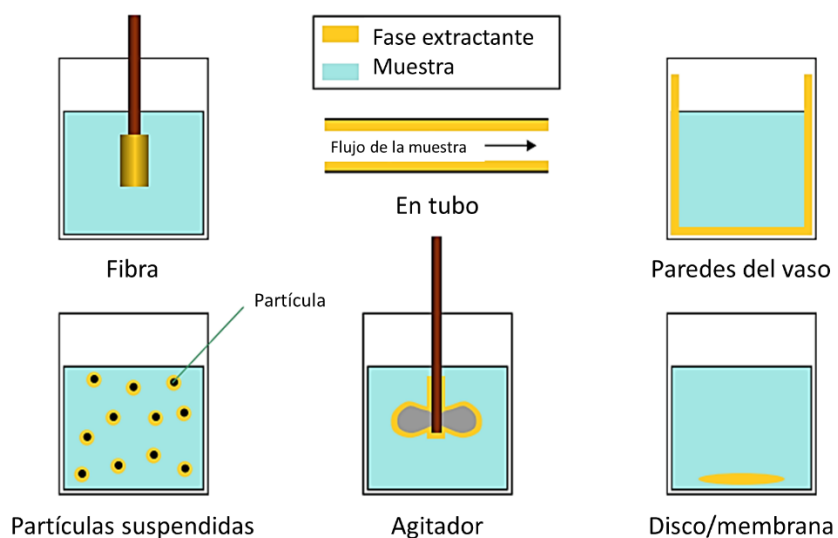


Imagen 2.1. Configuraciones de SPME.<sup>13</sup>

### 2.1.1 Teoría

La SPME es un método de extracción no exhaustivo, en lugar de una técnica de extracción exhaustiva esto significa que los analitos no se extraen completamente de la matriz de trabajo. Consta de dos enfoques importantes; en el primero se alcanza un equilibrio de reparto entre la matriz de muestra y la fase extractante, aquí las condiciones de convección no afectan la cantidad de analito extraída. El segundo enfoque utiliza breves tiempos de extracción previo al equilibrio, por lo que la cantidad de analito extraído está relacionada con el tiempo y

agitación constante, aquí la cuantificación puede realizarse basándose en la acumulación de analitos en la fase extractante en un tiempo medido.<sup>13</sup>

Existen tres modos básicos de extracción: extracción directa (inmersión directa), extracción en espacio de cabeza (*headspace*) y extracción con protección de membrana (Imagen 2.1.1).

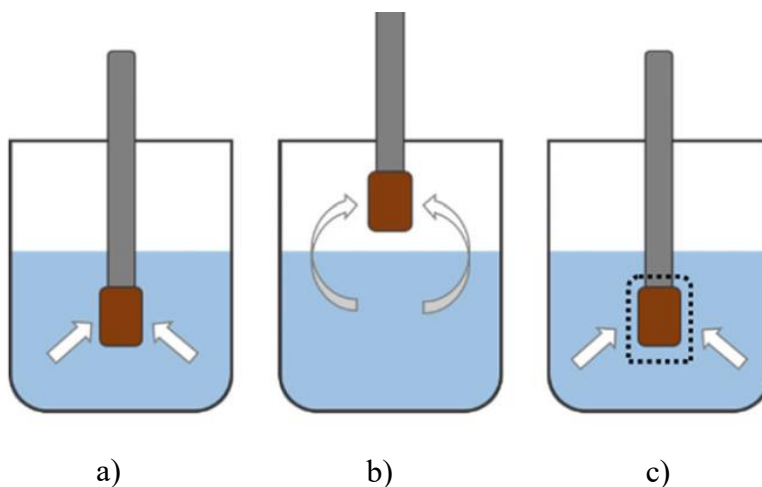


Imagen 2.2. Modos de extracción: a) Inmersión directa b) Extracción en el espacio de cabeza confinado (*headspace*) y c) Extracción con protección de membrana.<sup>12</sup>

Las condiciones de equilibrio se describen en la ecuación 1, de acuerdo con la ley de conservación de masa, si se consideran sólo dos fases (por ejemplo, la matriz de muestra y la fase extractante) :

$$n = \frac{K_{fs}V_fV_s}{K_{fs}V_f+V_s} C_0 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde  $n$  corresponde a la cantidad extraída del analito,  $C_0$  es la concentración inicial del analito de interés en la muestra,  $V_s$  el volumen de muestra,  $V_f$  es el volumen de la fibra, y  $K_{fs}$  el coeficiente de distribución de los analitos entre la fibra y la muestra. Esta ecuación indica que la cantidad de analito extraído por la fibra ( $n$ ) es linealmente proporcional a la concentración de analito en la muestra ( $C_0$ ), que es la base analítica para la cuantificación por SPME.

Si el volumen de la muestra es muy grande en comparación con el de la fase extractante, entonces  $V_s \gg K_{fs} V_f$  y, la ecuación 1 se simplifica a:

$$n = K_{fs} V_f C_0 \quad \text{Ecuación 2}$$

Entonces, podemos decir que la cantidad de analito extraída es independiente del volumen de la muestra, y debido a esto la SPME por inmersión directa es adecuada para el muestreo *in situ*.

El método de extracción en el equilibrio es un método de cuantificación ampliamente utilizado para SPME. En este método, una pequeña cantidad de fase extractante se expone a una matriz de muestra hasta que se alcanza un equilibrio.

Durante la extracción en el espacio de cabeza, la fibra se coloca por encima de la matriz de muestra. Para obtener una tasa de difusión favorable se requiere que los analitos sean volátiles y, además, se debe considerar el gas inerte en el espacio de cabeza para describir las condiciones de equilibrio, por lo que la expresión matemática se modifica según la ecuación 3. Debido a la manera en que se realiza esta extracción, se puede evitar la interferencia de macromoléculas.

$$n = \frac{K_{fs} V_f V_s C_0}{K_{fs} V_f + K_{gs} V_g + V_s} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde  $K_{gs}$  es el coeficiente de distribución de los analitos entre el gas inerte y la muestra, y  $V_g$  es el volumen del gas inerte. Una gran ventaja de la extracción en el espacio de cabeza es que la fase extractante no está directamente en contacto con la muestra y en consecuencia aumenta el tiempo de vida útil de la fibra.

Para el análisis de compuestos no volátiles o con interferencias como macromoléculas, la extracción directa y la extracción en el espacio de cabeza no son alternativas viables. Por lo tanto, la extracción con la protección de la membrana es una opción adecuada, en esta, los analitos la atraviesan de forma selectiva y llegan a la fibra, es decir, se impide el paso de las macromoléculas no deseadas y la fase se mantiene alejada de la contaminación.<sup>12</sup>

La concentración de un analito está determinada por su relación lineal con la cantidad de analito extraído por la fase extractante (ecuación 1). No obstante, si el coeficiente de distribución ( $K_{fs}$ ) es muy grande, el término de  $K_{fs} V_f \gg V_s$ , por lo tanto:

$$n \approx V_s C_0 \quad \text{Ecuación 4}$$

En este caso la cantidad de analito extraída depende del volumen de la muestra y la concentración del analito en la muestra.

Un proceso ideal de extracción de SPME generalmente sigue el perfil mostrado en la imagen 2.3. Cuando el tiempo de muestreo es mayor que  $t_{95}$ , la extracción casi alcanza el equilibrio. Si el tiempo de muestreo es menor que  $t_{95}$ , la extracción sigue proceso cinético. Y se asume que hay una captación de masa lineal cuando el tiempo de muestreo es menor que  $t_{50}$ . El espesor de la fase extractante determina la capacidad analítica de la fibra y, además, también determina el tiempo de extracción requerido para alcanzar el equilibrio. Se requerían tiempos más largos para alcanzar el equilibrio cuanto más grueso sea el espesor de la fibra.

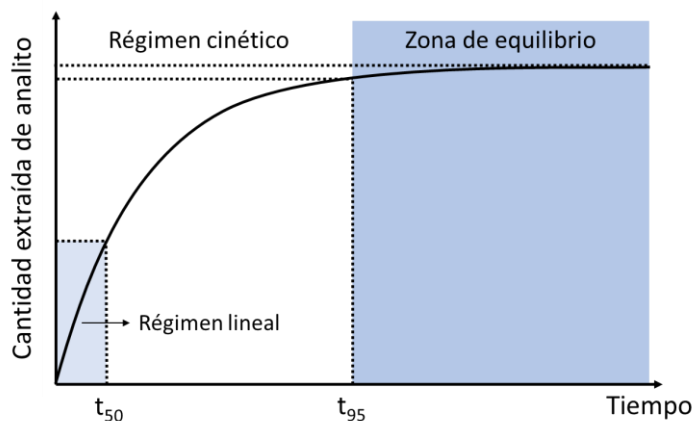


Imagen 2.3. Perfil de extracción SPME.<sup>14</sup>

Los resultados analíticos de los dispositivos de muestreo pasivos como SPME requieren de un método de calibración apropiado para la cuantificación. A continuación, se muestra un cuadro con los métodos de cuantificación existentes.

Cuadro 2.1 Métodos de calibración para SPME.<sup>15</sup>

	Ventajas	Desventajas	
<b>Tradicional</b>	Estándar externo	No requiere preparación extensiva de la muestra	Debe haber un blanco de matriz para la calibración. El procedimiento de muestreo y las condiciones cromatográficas deben permanecer constantes
	Adiciones estándar	Apropiada para muestras de composición desconocida y complejas (corrección de efecto matriz)	Larga preparación y análisis de muestra para un gran número de muestras
	Estándar interno	Permite compensar y/o corregir el efecto matriz, pérdida de los analitos durante la preparación de la muestra e irreproducibilidad en los parámetros.	Estándar interno adecuado para muestras complejas, no son fáciles de encontrar. Los estándares marcados isotópicamente son caros y no están disponibles para todos los analitos de interés.
<b>En el equilibrio</b>	Cuando el volumen de la muestra es muy grande la concentración de analitos es independiente del volumen de la muestra	Los coeficientes de distribución de los analitos entre el revestimiento de fibra y la matriz de muestra (K) deben ser conocidos o determinados	
<b>Extracción exhaustiva</b>	La concentración del analito de interés puede ser fácilmente calculado con la concentración del analito extraída por la fibra y el volumen de la muestra	Sólo es adecuado para volúmenes pequeños de muestras y coeficientes de distribución muy grandes, requiere dispositivos o métodos especiales.	
<b>Basado en la difusión</b>	Primera ley de difusión de Fick	Adecuada para el muestreo promedio ponderado en el tiempo, la tasa de muestreo es independiente de la velocidad	La tasa de muestreo en agua es muy baja.
	Modelo de interfase y modelo de flujo cruzado	Alta velocidad y corto tiempo de muestreo, minimizado el efecto competitivo para extractantes sólidos. Adecuado para el muestreo <i>in situ</i> .	La velocidad de flujo de la matriz de muestreo debe controlarse o determinarse. Limitado al régimen de muestreo lineal
	Calibración cinética con estándar	Adecuado para el muestreo TWA, especialmente donde la convección y las concentraciones de analitos siempre cambian	Requiere un estándar y el valor de K debe conocerse o determinarse.
	Calibración cinética sin estándar	No necesita carga estándar. Las concentraciones de todos los analitos extraídos en la muestra pueden calcularse.	Se necesita muestrear dos veces, las condiciones para el muestreo deben mantenerse constantes. Inadecuado para monitoreo a largo plazo. El valor K debe conocerse o determinarse

TWA: promedio ponderado en el tiempo



### 2.1.2 Fibras y dispositivos

El primer dispositivo comercial para SPME fue comercializado por Supelco Co. en 1993, que consistió en un barril que sostiene a la fibra. Normalmente, el dispositivo comercial para SPME luce como una jeringa modificada, y la fibra es un soporte de sílice fundida recubierta de un polímero con un espesor determinado, protegida por un tubo de acero inoxidable que le permite bajar y subir. Sin embargo, para realizar análisis *in vivo* surgió la necesidad de utilizar soportes más resistentes y flexibles como el acero inoxidable.

La selección de una fibra apropiada para SPME es clave para lograr resultados favorables en un análisis. Existen cuatro criterios básicos para la selección adecuada de una fibra: a) peso molecular (PM) y tamaño de los analitos, b) polaridad de los analitos, c) niveles y rangos de concentración de los analitos, y d) complejidad de la muestra. De acuerdo con lo anterior, Supelco Co. enlistó las fibras recomendadas según la aplicación (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2 Guía comercial para la selección de una fibra SPME.<sup>12</sup>

Tipo de análisis	Fibra SPME recomendada
Gases y compuestos de bajo peso molecular (PM 30-225)	75/85 $\mu\text{m}$ carboxen/PDMS
Compuestos no polares y volátiles (PM 60-275)	100 $\mu\text{m}$ PDMS
Compuestos volátiles, amino y nitro aromáticos (PM 50-300)	65 $\mu\text{m}$ PDMS/DVB
Compuestos polares y semivolátiles (PM 80-300)	85 $\mu\text{m}$ PA
Compuestos no polares y semivolátiles (PM 80-500)	30 $\mu\text{m}$ PDMS
Compuestos polares y de alto peso molecular (PM 125-600)	7 $\mu\text{m}$ PDMS
Alcoholes y compuestos polares (PM 40-275)	60 $\mu\text{m}$ PEG
Compuestos aromáticos (volátiles y semivolátiles C <sub>3</sub> -C <sub>20</sub> ) (PM 40-275)	50/30 $\mu\text{m}$ DVB/carboxen/PDMS

DVB: Divinilbenceno, PA: poliacrilato, PEG: polietilenglicol. PM [g mol<sup>-1</sup>]

### 2.1.3 Fibras para SPME disponibles comercialmente

Las fases para fibras SPME pueden clasificarse en cuatro categorías: por el tipo de fase, por el espesor, por la polaridad y por su mecanismo de extracción.

El tipo de fase de la fibra determina su polaridad. La polaridad proporciona selectividad mediante la afinidad que tengan los analitos por la cubierta. Es posible que algunas fibras

para SPME tengan un grado de bipolaridad debido a que son capaces de extraer tanto analitos no polares como analitos polares. Por ejemplo, la superficie de una fibra de PDMS hace que la fibra sea poco polar, sin embargo, los analitos polares pueden ser absorbidos por los poros, y por lo tanto extraídos. Por lo anterior, se debe elegir la fibra que mejor desempeño tenga de acuerdo con los analitos objetivos en la matriz de trabajo. A continuación, se presenta un cuadro (Cuadro 2.3) que enlista las fibras comerciales, su mecanismo de extracción y su polaridad.

Cuadro 2.3. Fibras disponibles comercialmente.<sup>16</sup>

Tipo cubierta	Mecanismo de extracción	Polaridad
7 µm PDMS	Absorción	No polar
30 µm PDMS	Absorción	No polar
100 µm PDMS	Absorción	No polar
85 µm PA	Absorción	Polar
60 µm PEG (Carbowax)	Absorción	Polar
15 µm Carbowax Z-PDMS	Adsorción	No polar/Polar
65 µm PDMS-DVB	Adsorción	No polar/Polar
55 µm/30 µm DVB/carboxen-PDMS	Adsorción	No polar/Polar
85 µm Carboxen-PDMS	Adsorción	No polar/Polar

## 2.2 Elaboración de fibras para SPME

### 2.2.1 Tipos de recubrimientos

Las primeras cubiertas investigadas y desarrolladas para SPME fueron materiales absorbentes. Dichas cubiertas estaban compuestas fundamentalmente de polímeros líquidos, gomas o aceites viscosos que contienen agentes entrecruzantes. Factores como el calor o la luz UV pueden utilizarse como iniciadores para entrecruzar el polímero sobre el soporte. Esto produce una cubierta polimérica de alto peso molecular fijada en el soporte.

Esto hace que el polímero se aplique en varios espesores sobre el soporte. Es importante resaltar que el espesor de la fase extractante determinará la medida de extracción de los analitos que migrarán a través de la fase extractante, considerando que los analitos más pequeños se moverán más rápido que los analitos de mayor tamaño. Entonces, las fases del

tipo absorbente tendrán dificultades para retener analitos pequeños cuando el espesor de la cubierta sea relativamente pequeño.

Por otro lado, las fases extractantes captarán analitos por mecanismos físicos. Esta interacción será del modo que un analito entrará en contacto con una partícula sólida que puede estar suspendida en un polímero líquido.

Con materiales adsorbentes, el analito migrará dentro de los poros de este durante el proceso de extracción y la retención de los compuestos dependerá del tamaño del analito y el tamaño del poro. La superficie del adsorbente interactuará con el analito por medio de interacciones del tipo  $\pi$ - $\pi$ , enlace puente de hidrógeno o fuerzas de van der Waals.

La capacidad de un adsorbente para retener a los analitos depende de factores como: área superficial total, cantidad y tamaño de los poros.<sup>13</sup>

### **2.2.2 Soporte de sílice fundida**

La ventaja de utilizar sílice fundida como soporte de la fase extractante es que se fabrica con las dimensiones deseadas a partir de fibra óptica. Los soportes de sílice fundida para elaborar fibras para SPME poseen diámetros de 110  $\mu\text{m}$ .

Una ventaja de utilizar sílice fundida es la obtención de recubrimientos uniformes por la fase extractante, es decir, el espesor de la fase puede ser controlado minuciosamente, por lo que el resultado es una fibra muy consistente. Típicamente las fibras para SPME tienen una longitud de fase de 1 cm.<sup>13</sup>

### **2.2.3 Soportes metálicos**

Generalmente, para una fibra SPME de soporte metálico se utiliza alambre de acero inoxidable de 0.005" (128  $\mu\text{m}$ ) al que se le impregna la fase extractante con procedimientos similares que al soporte de sílice fundida, de modo que se pueden obtener fibras de características equiparables, pero con una mayor resistencia mecánica.<sup>13</sup>

### **2.2.4 Fases poliméricas extractantes**

Diversidad de materiales extractantes como: líquidos iónicos, líquidos iónicos poliméricos, materiales a base de carbono, polímeros impresos molecularmente (MIPs), estructuras organometálicas, metales y óxidos metálicos, polímeros conductores, sílice modificada, así

como compósitos, cumplen con los principios básicos para la preparación de fibras para SPME como selectividad, sensibilidad y estabilidad en términos de las propiedades fisicoquímicas de los materiales de recubrimiento.<sup>12</sup>

Fibras de: polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA), divinilbenceno (DVB), carboxen (CAR) y Carbowax-polietilenglicol (CW-PEG), están disponibles comercialmente en diferentes espesores como recubrimientos individuales, mezclas o copolímeros. Estas fibras son adecuadas en aplicaciones de SPME para compuestos orgánicos no polares, como benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX), hidrocarburos aromáticos polinucleares (HAP), pesticidas, etc. y compuestos orgánicos polares, como fenoles, alcoholes, etc.

El cuadro 2.4 presenta algunas fases extractantes utilizadas para SPME, métodos de preparación y propiedades.

### **2.2.5 Métodos de preparación**

Continuamente se buscan nuevas fibras que satisfagan los siguientes aspectos a un costo asequible: procedimientos simples y rápidos de muestreo, producción de pocos disturbios en sistemas investigados, bajo consumo de disolventes, capacidad de automatización. Este desarrollo de nuevas fibras para SPME está enfocado en aumentar la sensibilidad, selectividad, capacidad de carga, y mejorar la estabilidad mecánica, térmica y química, además de disminuir los costos de elaboración (Imagen 2.4).

Cuadro 2.4. Fases extractantes biocompatibles para SPME.<sup>17</sup>

Tipo de recubrimiento	Método de preparación	Ventajas	Desventajas
<b>PDMS</b>	Fibras huecas comerciales colocadas sobre un hilo de acero inoxidable	Facilidad de preparación. Excelente reproducibilidad entre fibras 6% DER	Pobre eficiencia de extracción para compuestos polares. Revestimiento no adherido al soporte. Largos tiempos de equilibrio
<b>PAN + C<sub>18</sub> (u otro sorbente SPE adecuado)</b>	Método de inmersión sobre alambre de acero inoxidable	Flexibilidad en la selección del sorbente, buena robustez mecánica y química. Adecuado para la esterilización en autoclave. Excelente eficiencia de extracción. Buena reproducibilidad entre fibras <10% DER	La eficiencia de extracción disminuye aproximadamente un 15% después de la esterilización en autoclave
<b>PEG + C<sub>18</sub> (u otro sorbente SPE adecuado)</b>	Método de inmersión sobre alambre de acero inoxidable	Flexibilidad en la selección del sorbente. Tiempos de equilibrio cortos (<5 min). Mejor sensibilidad que con fibra de PPY	No apta para esterilización en autoclave. Reproducibilidad entre fibras del 15-25%
<b>PPY</b>	Oxidación química del monómero de pirrol con persulfato de amonio sobre fibra óptica de sílice	Tiempos de equilibrio cortos (2 min). Adecuado para acoplamiento directo a IMS	Evaluación limitada realizada
	Electrodeposición sobre acero inoxidable o platino	Tiempos de equilibrio cortos. Adecuado para autoclave	Pobre reproducibilidad entre fibras. Rango dinámico lineal limitado y posibles efectos de desplazamiento). La eficiencia de extracción disminuyó un 30% después de la esterilización en autoclave
<b>Fibras biocompatibles (aglutinante + C<sub>18</sub> u otro sorbente adecuado)</b>	Recubrimiento sobre aleación de metal flexible	Buena estabilidad mecánica y química. Recubrimiento por lotes sobre aleación de metal flexible	Largos tiempos de equilibrio

PAN: poliacrilonitrilo, PPY: polipirrol, DER: desviación estándar relativa

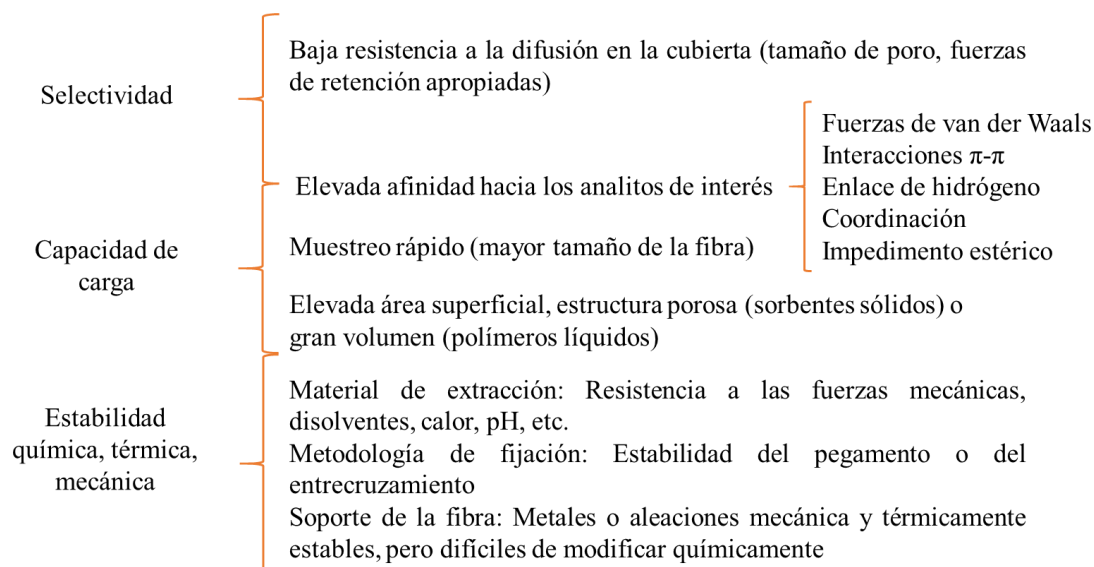


Imagen 2.4. Principios físicos y químicos bajo los que se preparan las fibras para SPME.<sup>12</sup>

De acuerdo con los principios anteriormente mencionados para la fabricación de fibras, es de resaltar que el método de preparación juega un papel muy importante para lograr estabilidad y reproducibilidad inter-fibra.

El Cuadro 2.5 presenta diferentes métodos de preparación de fibras con su dificultad técnica, reproducibilidad y propiedades de estabilidad.

### 2.2.6 Preparación del soporte

Es importante un tratamiento de limpieza del soporte previo a la adhesión de la fase extractante con el fin de tener una superficie homogénea y libre de contaminantes o impurezas. La técnica de adhesión dependerá de las características tanto de la fase extractante como del soporte.

Algunos métodos de limpieza son: con disolventes, que consiste en sumergir en metanol o acetona, y secar a temperatura ambiente. Sonicar el soporte sumergido en el disolvente y secar. Otra es simplemente pasar un paño de algodón impregnado con disolvente sobre la superficie, el uso de disolventes es el método más sencillo y rápido, sin embargo, existen técnicas de polimerización en las que este método no es suficiente para lograr la adherencia del polímero.<sup>18</sup>

Por otro lado, es posible eliminar impurezas superficiales mediante el tratamiento con soluciones ácidas y alcalinas, este procedimiento consiste en sumergir el soporte metálico por un intervalo de tiempo de 30-60 min en disoluciones de NaOH (1-2M) y luego en HCl (0.1-0.5 M), enjuagarlos con agua desionizada y dejarlos secar a temperatura ambiente. Es un método de limpieza sencillo con el que se logra una buena limpieza de la superficie no obstante, los tiempos de preparación del soporte son considerablemente más largos.<sup>19</sup>

Cuadro 2.5. Métodos de preparación de fibras para SPME.<sup>12</sup>

Método	Dificultad técnica	Reproducibilidad	Estabilidad
<b>Deposición física</b>	Baja	Pobre	Mecánicamente inestable, la estabilidad térmica y química depende del material de la cubierta.
<b>Electrodeposición/ Electroquímica</b>	Baja	Aceptable	Mecánicamente inestable, la estabilidad térmica y química depende de la cubierta.
<b>Inmersión</b>	Baja	Aceptable	Mecánicamente estable, la estabilidad térmica y química depende de la cubierta y del pegamento utilizado.
<b>Sol-gel</b>	Aceptable	Pobre	Mecánicamente estable, bajo condiciones extremas de temperatura y pH.
<b>Enlace químico</b>	Alta	Aceptable	Mecánicamente estable, la estabilidad térmica y química depende de la cubierta y el entrecruzamiento utilizado.
<b>Electrospinning</b>	Aceptable	Buena	Mecánicamente estable, la estabilidad térmica y química depende de la cubierta.
<b>Anodización</b>	Aceptable	Aceptable	Mecánica y térmicamente estable, la estabilidad química depende del material de revestimiento utilizado.
<b>Polimerización <i>in situ</i>/ crecimiento hidrotérmico</b>	Alta	Pobre	Aceptable estabilidad mecánica, la estabilidad química depende del material de revestimiento utilizado.

### 2.2.7 Fijación de la fase extractante

La técnica apropiada para la fijación del polímero en el soporte dependerá de las características de cada componente, es decir, tanto de la superficie del soporte, como de las propiedades fisicoquímicas del polímero.

Existen diversas técnicas para fijar el polímero en el soporte a pesar de ello, la principal y más utilizada debido a su simplicidad es la inmersión directa, la cual consiste en sumergir durante un tiempo determinado el alambre de acero inoxidable en la mezcla de elastómero con agente curante, luego el polímero se cura a una temperatura y tiempo definidos.<sup>20</sup>

Otra técnica es el cepillado (*brushing*), que consiste en esparcir la mezcla de polímero con agente curante a partir de un pequeño cepillo apropiado sobre la superficie del soporte; luego se hace el curado del polímero. Con esta técnica se reporta una débil estabilidad y baja robustez a largo plazo.<sup>21</sup> Otra de las técnicas más utilizadas debido a que presenta una buena estabilidad y adhesión del polímero a la superficie haciéndolo un método más robusto es la aspersion, esto se le atribuye a una unión más efectiva de múltiples capas delgadas de las pequeñas partículas de suspensión en la superficie. La aspersion consiste en esparcir partículas muy finas sobre una superficie a alta presión. La aspersion de partículas finas se repite durante varias capas seguido del curado térmico del polímero lo que le da una buena fijación al acero inoxidable.<sup>21,22</sup>

Otra forma común para la fabricación de fibras para SPME con PDMS como recubrimiento es comprar el tubo de PDMS del diámetro y grosor requerido, cortarlo a la longitud deseada para luego pegarlo con un adhesivo adecuado al alambre de acero inoxidable. Es un método sencillo del que se reporta buena eficiencia y reproducibilidad.<sup>7,23</sup>

Además, también es posible realizar la síntesis directa del polímero sobre el soporte empleando técnicas como *sol-gel*, que consiste en la conversión de monómeros, principalmente alcóxidos en una solución coloidal (*sol*) que funciona como precursor para formar una red (*gel*) de partículas definidas o polímeros entrecruzados.

Frecuentemente, las fibras SPME preparadas vía *sol-gel* tienen ventajas como: bajo costo, homogeneidad del material, estructura porosa, alta estabilidad térmica y fuerte adhesión del recubrimiento al sustrato, en general las fibras fabricadas por dicho proceso se hacen sobre una superficie de sílice fundida tratada previamente para que la fase extractante pueda enlazarse químicamente en la superficie del soporte de sílice fundida. Además, la



comprensión de los mecanismos de transformación e interacciones entre *sol* y *gel* en el estado de gel coloidal ha llevado al desarrollo de materiales con una estructura bien definida.<sup>24</sup>

Sin embargo, con este método la adsorción en los sitios de los recubrimientos pueden no ser completamente accesibles, ya que los caminos de difusión son tortuosos, y los poros pueden bloquearse por grandes estructuras.<sup>25</sup>

## 2.3 Caracterización de fibras para SPME

En la caracterización de recubrimientos poliméricos, comúnmente se utilizan técnicas como:

- Microscopía electrónica de barrido (SEM)  
Proporciona información topológica de la muestra
- Espectroscopía infrarroja (FTIR)  
Proporciona información de la composición química del polímero con base en las señales que se interpretan como la presencia de ciertos grupos funcionales
- Resonancia magnética nuclear (RMN)  
Proporciona información de la estructura molecular del polímero (ramificaciones y secuencia de copolímeros).
- Análisis termogravimétrico (TGA)  
Determinación de sustancias volátiles, estudios de termoestabilidad (temperatura de fusión vítrea, temperatura de fusión), determinación de cenizas

### 2.3.1 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido es un tipo de microscopía que produce imágenes de una muestra por el barrido de la superficie con un haz de electrones. Estos electrones interactúan con la muestra produciendo señales que contienen información de su superficie y composición. El microscopio electrónico de barrido está equipado con diversos detectores que colectan la información de los electrones que interactúan con la muestra para transformarla en imágenes. Algunos detectores son: el detector de electrones secundarios (SE) para obtener imágenes de alta resolución, detector de electrones retrodispersados (BSE), que generan imágenes de composición y estructura de la superficie, un detector de energía dispersiva (EDS) que capta los rayos X generados por la muestra para análisis

semicuantitativos y distribución de elementos en superficies.<sup>26</sup> En este proyecto se utilizó el haz de electrones retrodispersados para el análisis estructural de las fibras obtenidas.

Debido a que el haz de electrones utilizado en la SEM es muy estrecho, este tipo de microscopía tiene una gran profundidad de campo, lo que provee imagen tridimensional de la estructura de la muestra.<sup>27</sup>

## 2.4 Fibras para SPME *in vivo*

La microextracción en fase sólida de compuestos bioactivos, ya sea endógeno o exógeno de la matriz biológica compleja como tejidos semisólidos de animales, plantas, sangre, se ha convertido en un método muy popular para el análisis de una diversidad de compuestos. La SPME en matrices biológicas demuestra un gran potencial en: estudios farmacocinéticos, detección de metabolitos, muestreo *in situ* de contaminantes en animales y plantas, determinación del control de calidad en alimentos, entre otras. Para la implementación de la SPME como método de muestreo, extracción y preconcentración, un paso crítico es elegir la fibra apropiada, que proporcionará las mejores recuperaciones en la extracción de los analitos objetivo y minimizará la extracción de macromoléculas interferentes, como proteínas y lípidos.

Adicionalmente, las fibras para SPME *in vivo* en tejidos de animales o plantas, requieren ser biocompatibles, con el fin de prevenir reacciones de rechazo cuando las fibras se usen en el muestreo.

El PDMS es una de las fases extractantes más ampliamente utilizadas por inmersión directa en matrices biológicas debido a su estabilidad durante tiempos de extracción relativamente corto, sin embargo, se ha observado que no es la fase preferida, debido a la naturaleza altamente hidrófoba de su superficie, además de que las superficies de PDMS sin modificar pueden presentar un grado apreciable de absorción inespecífica.<sup>17</sup> Sin embargo, es un polímero de bajo costo, y es posible obtener fibras de una amplia variedad de diámetros (640 – 300  $\mu\text{m}$ ).

Otra clase de fibras son preparadas a partir de incorporar sorbentes con elevada capacidad de extracción como partículas de C18, HLB (sorbente con balance hidrofílico-lipofílico) y mezclas de C18 con ácido bencensulfónico en polímeros biocompatibles como poliacrilonitrilo (PAN) y polietilenglicol (PEG). Dichas fibras se han utilizado extensamente

en la detección de fármacos y sus metabolitos en muestras de sangre humana y animales tanto *in vivo*, como *in vitro*.

Por otro lado, los materiales de acceso restringido (RAMs) proveen un aumento en la selectividad de ciertos analitos. Estos materiales, consisten en partículas de sílice porosa en la que la superficie ha sido funcionalizada con grupos diol hidrofílicos, y los poros han sido modificados con cadenas alquílicas hidrofóbicas y/o grupos intercambiadores de iones.

Adicionalmente, se ha reportado una fibra de mejora la eficiencia en la extracción de analitos por SPME inmersión directa en matrices biológicas. Esta fibra muestra una buena biocompatibilidad, de modo que el fluido analizado penetra la cubierta fibrosa hidrofílica y esto hace que la parte interna de la fibra sea accesible a los analitos de interés.<sup>12</sup>

## **2.5 Aplicaciones de SPME en el análisis *in vivo* e *in vitro* en tomate**

Tomando en cuenta que las matrices vegetales son muy complejas; la extracción, separación y cuantificación de dichos compuestos es un reto en cuanto a la preparación de la muestra se refiere. Sin embargo, los métodos tradicionales de preparación de muestra, como extracción Soxhlet, fluidos supercríticos (SFE), y métodos por destilación, que incluyen hidrodestilación (HD), destilación por arrastre de vapor (SD), y destilación por vacío (VD), son métodos laboriosos que consumen mucho tiempo y que, además, pueden resultar en la pérdida de ciertos compuestos volátiles.

Por lo tanto, SPME se convierte en una técnica apropiada para el análisis de estos compuestos, debido a que es una técnica de preparación de muestra que según sea el caso, puede no requerir de disolventes y, además, combina el muestreo y la preconcentración de los compuestos de interés en un solo paso.

Los tejidos de plantas usualmente se consideran como matrices complejas. Por lo tanto, es clara la necesidad de desarrollar metodologías adecuadas para su análisis de compuestos endógenos o exógenos a este tipo de sistemas.

La translocación, acumulación y distribución en los tejidos de contaminantes ambientales en plantas es de gran interés por lo que concierne a seguridad alimenticia y protección ambiental. En las plantas, particularmente la parte comestible, se puede contaminar con compuestos orgánicos presentes en el aire (por deposición), en el suelo (transferencia) o en el agua

(absorción y transferencia), durante el proceso de crecimiento. En los últimos años contaminantes persistentes y tóxicos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), pesticidas y productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs) se han detectado en variedad de órganos vegetales que crecen en ambientes contaminados. Esos contaminantes pueden ser biomagnificados a través de la cadena alimenticia y llegar a afectar la salud humana.<sup>12</sup>

El cuadro 2.6 presenta algunas aplicaciones de la SPME en el análisis de algunas variedades de tomate:

Cuadro 2.6. Aplicaciones de SPME en diferentes variedades de tomate.

Analitos	Muestra	Modo	Tipo de fibra	Modo de extracción/ tiempo/temperatura	Intervalo de conc.
Aroma de la planta <sup>28</sup>	Tomate común y tomate cherry	<i>in vitro</i>	75 µm CAR/PDMS, 65µm	HS/60 min a 30°C	n.a.
Volátiles <sup>29</sup>	Tomate	<i>in vitro</i>	65 µm CW/DVB	HS/55 min 40°C	n.a.
VOCs <sup>30</sup>	Tomate	<i>in vitro</i>	100 µm PDMS	HS/30 min	0.1 – 2500 ng mL <sup>-1</sup>
VOCs <sup>31</sup>	Cultivos de tomate	<i>in vitro</i>	100 µm PDMS	HS/30 min/30 °C	2 - 6000 ng mL <sup>-1</sup>
Hormonas <sup>32</sup>	Tomate	<i>in vitro</i>	β-CD modificada con nanotubos de carbono y fibra hueca.	1-octanol/60 min/1150 rpm	6 – 30 ng g <sup>-1</sup>
Perfil volátil <sup>33</sup>	Pericarpio y fruto de tomate	<i>in vitro</i>	50/30 µm DVB/CAR/PDMS	HS/30 min/40 °C	0.3 – 734 ng mL <sup>-1</sup>
VOCs <sup>34</sup>	Tomate	<i>in vitro</i>	50/30 µm DVB/CAR/PDMS	HS/30 min/40 °C	30 – 140 ng mL <sup>-1</sup>
VOCs <sup>35</sup>	Tomate	<i>in vitro</i>	50/30 µm DVB/CAR/PDMS	HS/30 min/40 °C	24 – 1400 ng mL <sup>-1</sup>
VOCs <sup>36</sup>	Tomate	<i>in vivo</i>	100 µm PDMS, 75 µm CAR/PDMS, 65 µm PDMS/DVB	HS/20 min/temperatura ambiente	n.a.

n.a.: no aplica, CD: ciclodextrina, HS: *headspace*

## 2.6 Métodos de calibración para SPME *in vivo*

Debido a que la microextracción en fase sólida es una técnica de extracción no exhaustiva, esto es, que sólo una pequeña fracción del analito se extrae de la muestra, se necesitan métodos de calibración adecuados en el análisis cuantitativo, entonces, la cuantificación depende de la cantidad del analito extraída bajo condiciones determinadas.

Entre los métodos de calibración para SPME *in vivo*, la extracción en el equilibrio y la cinética son las más comunes.

El método de extracción al equilibrio consiste en utilizar una constante de distribución conocida o una curva de calibración externa para correlacionar la cantidad de analito extraída con la fibra con su concentración en la muestra. Con la finalidad de evitar largos tiempos de equilibrio para algunos analitos y los efectos de desplazamiento que ocurren cuando se usan sorbentes porosos, la extracción se puede detener antes de llegar al equilibrio. Es decir, aunque se trabaje en un régimen cinético, existe una relación lineal entre la cantidad de analito extraída y su concentración en la muestra, siempre y cuando la temperatura y el tiempo de extracción de mantengan constantes<sup>37</sup> (Imagen 2.3).

Los métodos de calibración cinética son los más utilizados ya que al muestrear plantas no es factible usar tiempos de extracción tan largos como para alcanzar el equilibrio. Por ejemplo, con una fibra comercial para SPME *in vivo* de 45  $\mu\text{m}$  el tiempo para alcanzar el equilibrio de compuestos polares es de casi 5 min, mientras en los hidrófobos puede ser varias horas o incluso días. Por lo que conviene conocer el  $\log K_{ow}$  de los analitos para elegir el tipo de calibración más apropiada en cada caso.<sup>38</sup>

### **Método de estandarización en fibra**

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

Esta simetría se puede perder en algunos casos cuando la cinética de la interacción del analito con la superficie del absorbente es muy lenta y la capa límite muy delgada. Al ser un método de calibración *in situ*, existen factores (temperatura, interacciones con la matriz, tortuosidad, valores locales de pH y fuerza iónica) que afectan la transferencia de masa hacia la fibra, sin embargo, esto se compensa con el uso de estándares precargados.

La calibración se realiza al exponer la fibra con estándares precargados a la muestra por un cierto tiempo y después se analiza la fase extractante. Esta técnica está basada en un modelo matemático que no usa ninguna fórmula empírica y no requiere una velocidad de muestreo lineal. La concentración de los analitos en la muestra se calcula como sigue: <sup>39,40</sup>

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

Donde:

$C_0$  = concentración de los analitos en la muestra ( $\text{ng g}^{-1}$ )

$n$  = cantidad de analito extraído por la fibra (ng)

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

$V_e$  = volumen de la fase extractante (mL)

$K_{fs}$  = coeficiente de distribución del analito entre la fase extractante y la muestra ( $\text{g mL}^{-1}$ )

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

### **Método de velocidad de muestreo predeterminada**

La velocidad de muestreo predeterminada es otro método de calibración cinética desarrollado para evitar usar estándares deuterados. Con un modelo lineal, se asume que la velocidad de transferencia de masa permanece constante en toda la extracción. Para un análisis *in vivo* rápido, un intervalo corto de extracción sugiere que el muestreo pasivo seguirá una respuesta lineal. Las diferencias de matriz entre tejidos semisólidos son pequeñas para individuos de la misma especie. Por lo tanto, se puede determinar la velocidad de muestreo en la fibra *in vivo* en condiciones de laboratorio y ser usada en aplicaciones de campo.<sup>41,38</sup>

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

$C_0$  = concentración del analito en la muestra (ng mg<sup>-1</sup>)

$n$  = cantidad el analito extraída por la fibra (ng)

$R_s$  = velocidad de muestreo (mg min<sup>-1</sup>)

$t$  = tiempo de extracción (min)

En esta ecuación  $R_s$  es una constante de proporcionalidad (velocidad de muestreo) y se interpreta como la cantidad de tejido del que se extrae el analito por unidad de tiempo de exposición de la fibra. Teóricamente,  $R_s$  es una función de las propiedades fisicoquímicas, temperatura de la matriz, fase extractante y dimensión de la fibra, así como el coeficiente de difusión y  $K_{fs}$  del analito. Los valores de  $R_s$  pueden diferir entre cada especie debido a la variación en la composición del tejido, sin embargo, son consistentes entre individuos de la misma especie. Para que esta calibración funcione los valores de  $R_s$  deben ser independientes de  $C_0$  y  $t$  en el régimen lineal de extracción.<sup>23</sup>

Con este método no es necesario determinar el valor de  $K_{fs}$ . Esta metodología también elimina el uso de estándares precargados en la fibra antes de la extracción, evitando así la contaminación potencial del sistema biológico con compuestos deuterados.<sup>38</sup>

## 2.7 Biomonitorio de contaminantes

El monitoreo periódico de especies químicas en el ambiente es esencial para proveer un panorama de las fuentes, distribución y absorción de los contaminantes. El biomonitorio es el análisis de compuestos químicos presentes en organismos vivos utilizado por muchos años para establecer las cantidades de contaminantes orgánicos e inorgánicos en el ambiente. Microorganismos, plantas y animales, incluyendo humanos, son utilizados como biomonitores. Para el desarrollo de métodos de biomonitorio, es importante considerar los siguientes aspectos: toxicidad del contaminante, degradación del contaminante, acumulación, exposición, y etapa de crecimiento del espécimen.

Las plantas particularmente captan compuestos químicos del aire, agua y el suelo en el que crecen, esto las hace atractivos modelos de estudio para el monitoreo de contaminantes.

Los contaminantes orgánicos pueden llegar a las plantas por diferentes vías; por deposición directa en las hojas o el tallo, por transferencia del suelo a la raíz y por intercambio de gases

en las hojas (Imagen 2.5).<sup>42</sup> Estos contaminantes pueden tener efectos como la alteración de las funciones inmunes y sistema endócrino en humanos.<sup>43</sup>

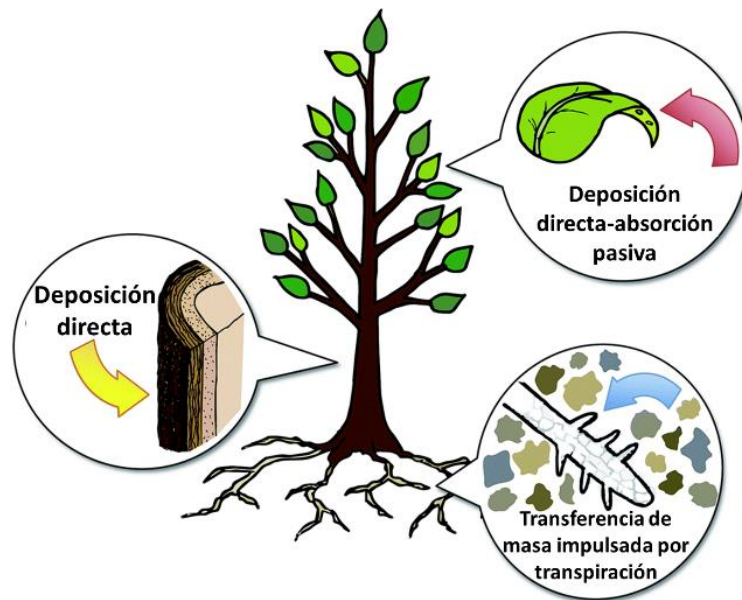


Imagen 2.5. Mecanismos por los que las plantas pueden acumular contaminantes ambientales.<sup>42</sup>

## 2.8 Contaminantes emergentes

Los contaminantes emergentes corresponden a aquellos contaminantes no regulados, los cuales pueden ser candidatos por regular en un futuro dependiendo de la investigación de sus potenciales efectos en la salud y los datos de monitoreo según su incidencia. Algunos ejemplos de compuestos relevantes y recientes son los surfactantes, los fármacos, los productos de cuidado personal (PPCPs) y los aditivos para gasolina. La característica de estos grupos de contaminantes es que no necesitan ser persistentes en el ambiente para causar efectos negativos puesto que su razón de transformación/remoción es compensada por su continua introducción al ambiente, estos también son llamados pseudopersistentes.

Para la mayoría de estos contaminantes emergentes, la incidencia, la evaluación de riesgo y la información ecotoxicológica no están disponibles, por lo tanto, es muy difícil predecir qué efectos en la salud pueden tener ya sea en humano u otros organismos.

Las metodologías analíticas para diferentes grupos de contaminantes emergentes siguen siendo insuficientes y, a pesar de que muchos métodos existen para el análisis individual de



cada contaminante, la clave es desarrollar metodologías que puedan determinar diferentes clases de compuestos en gran variedad de matrices mediante un simple análisis.

Se puede clasificar a los contaminantes emergentes como sigue: fármacos (antibióticos de uso humano y veterinario, analgésicos y antiinflamatorios, drogas psiquiátricas, reguladores de lípidos,  $\beta$ -bloqueadores, moléculas de contraste para rayos X), esteroides y hormonas, productos de cuidado personal (fragancias, filtros UV, repelentes de insectos), antisépticos, surfactantes y metabolitos de surfactantes, retardantes de flama, aditivos de uso industrial, aditivos de combustibles, subproductos de desinfectantes, etc.<sup>44</sup>

Los PPCPs son una gama muy diversa de sustancias químicas que incluyen tanto medicamentos de libre uso, como aquellos de prescripción médica de uso humano y veterinario, y aquellos productos que son utilizados para el cuidado personal o de uso cosmético.<sup>45</sup>

## **2.9 Sorción de contaminantes emergentes en plantas**

La presencia de los contaminantes emergentes en el ambiente acuático posee el potencial de causar daño al ecosistema y a la salud humana, por lo que existe una gran preocupación a nivel mundial.<sup>46</sup> Los contaminantes emergentes que típicamente se encuentran en aguas residuales llegan a plantas de tratamiento de agua. En algunos lugares esta agua tratada es reutilizada para el riego de cultivos en las regiones áridas y semi-áridas, además de que se le agregan biosólidos para mejorar los rendimientos agrícolas. Históricamente, estos recursos que son reutilizados contienen contaminantes emergentes, como son los PPCPs, los cuales llegan a suelos destinados a la agricultura y contaminan los cultivos.<sup>45</sup>

Dada la facilidad de distribución y persistencia de los PPCPs en el ambiente, es una buena opción escoger plantas como modelo de estudio ya que éstas actúan como excelentes indicadores de la contaminación global<sup>42</sup> debido a que se encuentran distribuidas en la mayoría de las áreas del planeta y acumulan compuestos químicos presentes en la atmósfera, en el agua con la que son irrigadas, y en el suelo en que crecen.<sup>47</sup>

Los contaminantes emergentes son absorbidos, acumulados y metabolizados por las plantas, su microbiota y los organismos que dependen de éstas, incluyendo a los humanos.

Las vías de transporte de los contaminantes emergentes a través del aire, agua y suelo son difíciles de caracterizar debido a la escasa información del destino y comportamiento en el

ambiente de la mayoría de estos compuestos, sin embargo, podemos inferir que su comportamiento depende de sus propiedades fisicoquímicas, como son: solubilidad en agua, coeficiente de reparto octanol-agua ( $K_{ow}$ ) y carácter iónico, así como de las propiedades de las matrices en las que se encuentren.

Los contaminantes emergentes llegan a las plantas predominantemente por el uso de agua tratada para irrigar los cultivos, la aplicación de biosólidos (desechos orgánicos y estiércol de animales) para fertilizar los suelos. Algunos contaminantes emergentes, dependiendo de sus propiedades fisicoquímicas tienden a disolverse relativamente fácil en el agua sin evaporarse y posteriormente, pasar a los suelos.

Además de que las propiedades fisicoquímicas de los compuestos tienen gran influencia en la absorción, acumulación, translocación y transformación de los contaminantes emergentes en las plantas, la naturaleza fisiológica de los tejidos de la planta, propiedades del suelo (como pH y contenido de materia orgánica), calidad del agua y el grado de exposición (concentración de los contaminantes) así como su duración, afectan la absorción y acumulación.

Las vías de absorción y bioacumulación de contaminantes emergentes en plantas no están muy bien definidas.<sup>48</sup> Las plantas absorben los contaminantes a través de las raíces y tejidos aéreos. Las raíces toman los contaminantes por transferencia de masa o vía difusión de los compuestos disueltos sobre las raíces. Los compuestos neutros se difunden a través de la membrana celular de la raíz, y los compuestos iónicos entran a las raíces por una combinación de la difusión de la forma neutra y por las interacciones electrostáticas de la forma iónica del compuesto. Los tejidos aéreos toman los contaminantes mediante la deposición de compuestos volátiles y aerosoles, por contacto directo (difusión o absorción de la fracción iónica) con el agua de riego.

Los compuestos hidrofóbicos se pueden repartir en los lípidos de la planta y retenerse predominantemente en las raíces, mientras que los compuestos más hidrofílicos pueden moverse a través del xilema y acumularse en las hojas. Por otro lado, los contaminantes iónicos pueden ser repelidos por la carga negativa de las paredes celulares y el citosol, para ser llevados al floema y acumularse en el fruto.<sup>49</sup>

## 2.10 Técnicas analíticas

La necesidad de determinar contaminantes emergentes a nivel de trazas en matrices complejas requiere de técnicas analíticas confiables, sensibles, precisas, rápidas y robustas. Por lo tanto, el acoplamiento entre la cromatografía de gases y espectrometría de masas resulta en una herramienta de gran ayuda para el análisis de este tipo de matrices.

El análisis de contaminantes en plantas representa un gran reto analítico con respecto a otras matrices, debido a la presencia de pigmentos, grasas y materiales cerosos que pueden causar interferencias en el análisis.<sup>45</sup>

Considerando lo anterior, no es posible analizarlas directamente mediante una técnica instrumental, por esta razón, es necesario hacer una preparación de la muestra que preconcentre los analitos y elimine (o disminuya) los interferentes previo al análisis.

La preparación de la muestra consiste en una transformación de la muestra original en una forma adecuada para el análisis instrumental.<sup>1</sup> La elección de esta depende de las propiedades fisicoquímicas de los analitos y de las características de la matriz en cuestión, así como de la técnica analítica seleccionada.<sup>9,50</sup>

### 2.10.1 Cromatografía de gases

La definición oficial de la IUPAC es: *la cromatografía es un proceso físico de separación en el que los componentes de una mezcla se distribuyen entre dos fases, una llamada fase estacionaria, y la otra conocida como fase móvil, que se mueve en una dirección definida. La elución cromatográfica es un procedimiento en el cual la fase móvil continuamente pasa a través o a lo largo del lecho cromatográfico y la muestra permanece en el sistema con un movimiento constante.*

La cromatografía de gases es un proceso de separación en el cual los componentes de una muestra se reparten entre dos fases: una de esas fases llamada fase estacionaria, consiste en un lecho una elevada área superficial. La otra, es un gas que pasa a través de la fase estacionaria. La muestra se vaporiza y se transporta por la fase móvil gaseosa (gas acarreador) a través de la columna. Los componentes de la muestra se reparten (equilibran) en la fase estacionaria en función de sus presiones de vapor relativas, la temperatura, y la afinidad estos por ésta. Este proceso cromatográfico es llamado elución.

La tendencia de un componente dado para ser atraído por la fase estacionaria se expresa en términos químicos como una constante de equilibrio llamada constante de distribución,  $K_c$ , a veces también llamada coeficiente de reparto. En cromatografía, un valor relativamente grande de esta constante significa una elevada afinidad por la fase estacionaria. Entonces, este valor expresa un grado de interacción y regula el movimiento de los analitos a través de la columna cromatográfica. En resumen, las diferencias en las constantes de distribución afectan la separación cromatográfica.

La cromatografía de gases (GC) es una técnica muy utilizada por su capacidad de separación y sensibilidad. Permite análisis cuantitativos precisos, además de que requiere pequeños volúmenes de muestra, su limitante está marcada fundamentalmente por la estabilidad térmica de los compuestos a separar.<sup>51</sup>

Los cromatógrafos de gases son instrumentos analíticos ampliamente utilizados en el mundo. La eficiencia de las columnas capilares provee gran resolución, separando variedad de compuestos de diversas muestras. Aquí la fase estacionaria es un líquido o un sólido, más comúnmente un líquido; y la fase móvil es un gas inerte generalmente  $H_2$ , He o  $N_2$ .<sup>52</sup>

La inyección de la muestra se realiza en un pequeño tubo de vidrio llamado *liner*, que se sitúa en la parte central del puerto de inyección. La temperatura en el inyector debe ser la adecuada para producir la vaporización instantánea de la muestra. En algunos inyectores se puede producir discriminación debido a que no todos los compuestos se vaporizan a la misma velocidad, esto dependerá de la presión de vapor de los componentes, tipo de inyector, parámetros de la inyección y técnica de inyección. Los inyectores más utilizados son: inyector con división o sin división de flujo, inyección fría en columna (*on column*) e inyector con temperatura programada. Luego de la vaporización, la muestra pasa a la columna que se encuentra en un horno, el cual debe mantener, controlar y modificar la temperatura a la cual sucede la separación cromatográfica, la mayoría de los hornos comerciales disponen de una resistencia que irradia calor hacia el horno que se distribuye mediante un ventilador, la temperatura se controla mediante un termopar a partir de la cantidad de energía calorífica emitida por la resistencia, por lo que es posible trabajar en condiciones isotérmicas o con programas de temperatura.<sup>51</sup>

En cuanto a sistemas de detección se refiere, la cromatografía de gases cuenta con una amplia variedad de detectores que proveen diversos rangos de sensibilidad, selectividad a ciertos

grupos de compuestos y transparencia al gas acarreador. Algunos detectores comunes para los cromatógrafos de gases son: detector de conductividad térmica (TCD), detector de ionización de flama (FID), detector de captura de electrones (ECD), detector de nitrógeno-fósforo (NPD), detector fotométrico de flama (FPD), detector de conductividad electrolítica (ELCD), detector de fotoionización (PID), detector de quimioluminiscencia (CLD), detector de emisión atómica (AED), detector de infrarrojo (IRD) y espectrómetro de masas (MSD), entre otros.

Es posible clasificar a los detectores en dos categorías generales: universales y selectivos. Los detectores universales con capaces de generar una respuesta a todos los compuestos (o a la mayoría) que son eluidos. Un detector selectivo responde únicamente a sólo ciertas clases de compuestos basado en propiedades moleculares, elementales o fisicoquímicas.

A continuación, se presenta una imagen con los típicos rangos de operación de los detectores para cromatografía de gases.<sup>53</sup>

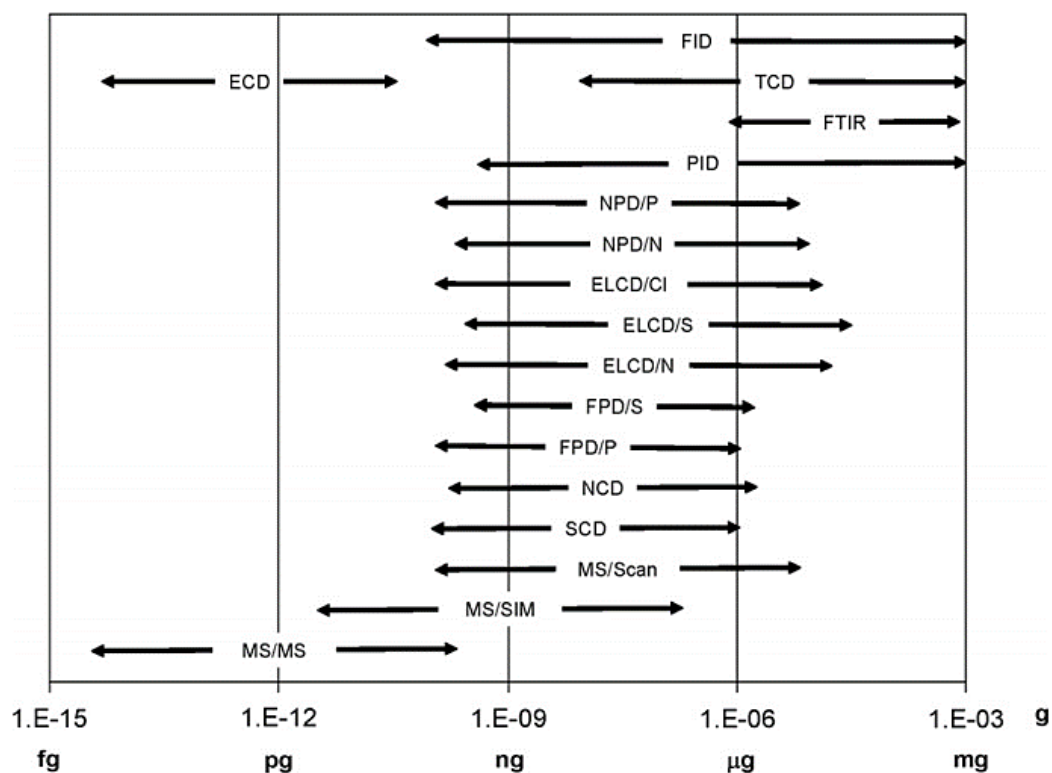


Imagen 2.7.1. Rangos de operación de los detectores para GC.<sup>53</sup>

## 2.10.2 Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una herramienta analítica indispensable en diversas áreas de la química, como: bioquímica, farmacia, medicina, análisis ambiental, química inorgánica, entre otras.<sup>54</sup> Esta herramienta es parte integral del estudio de estructuras moleculares, y quizás, ningún otro instrumento ofrece tanta información de los compuestos en estudio como lo hace un espectrómetro de masas.<sup>55</sup>

La espectrometría de masas es una técnica analítica con grandes ventajas como: alta sensibilidad, identificación y cuantificación de los compuestos a nivel de trazas además proporciona información estructural e isotópica de las moléculas.

El principio básico de la espectrometría de masas es generar iones a partir de compuestos orgánicos por un método adecuado, para separar esos iones por su relación masa-carga ( $m/z$ ) y detectarlos cualitativa y cuantitativamente según su abundancia. El compuesto bajo estudio puede ser ionizado térmicamente, por la acción de campos eléctricos, o por impacto de electrones, iones o fotones. Los iones pueden ser átomos ionizados, grupos de átomos, moléculas o sus fragmentos asociados. La separación de los iones es afectada por campos eléctricos o magnéticos tanto estáticos como dinámicos.

Un espectrómetro de masas consiste en una fuente de ionización, un analizador de masas y un detector, los cuales operan bajo condiciones de alto vacío.<sup>54</sup> La función básica de un espectrómetro de masas es: permitir la introducción del analito en la cámara de vacío del instrumento, producir iones a partir del analito, separar los iones obtenidos de acuerdo a sus masa/carga, y medir la abundancia de dichos iones.

Los iones formados en el espectrómetro de masas se separan de acuerdo con su relación  $m/z$ . Sin embargo, existen diferentes maneras de afectar la separación de los iones. Para este trabajo, el elemento de separación de masas utilizado es un cuadrupolo, en el cual sólo masas específicas pasan a través de un arreglo de barras paralelas con campos eléctricos oscilantes superpuestos en un campo de corriente directa, en el que modificando las frecuencias de oscilación del voltaje de la corriente directa cambia la masa que pasa a través del detector.

El acoplamiento de la cromatografía de gases a un espectrómetro de masas (GC-MS) da lugar a una técnica que posee ventajas frente a los instrumentos de forma independiente, ya que separa e identifica los componentes de una mezcla compleja, aportando información estructural de cada componente, de manera adicional, el espectro de masas puede obtenerse

con cantidades muy pequeñas de muestra. En este sistema acoplado, la muestra se inyecta en el cromatógrafo de gases, los compuestos se separan en la columna cromatográfica obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas a través de la línea de transferencia, la cual conecta el extremo final de la columna cromatográfica con la cámara de ionización del espectrómetro, es aquí donde ocurre un cambio en la presión; de presión atmosférica a alto vacío, requerido en GC-MS.<sup>55</sup>

A pesar de que existen variedad de espectrómetros de masas, típicamente el uso de la ionización electrónica a 70 eV es un acoplamiento muy eficiente con la cromatografía de gases. Esta ionización consiste en generar electrones acelerados con un filamento incandescente que colisionan con los compuestos de una muestra, provocando su ionización. La convención de usar 70 eV como energía de ionización es porque provee una fragmentación reproducible independientemente del equipo utilizado, además, existen bibliotecas para la identificación por espectrometría de masas que resultan en una herramienta muy útil para el análisis de compuestos orgánicos.

Luego de la ionización, los fragmentos de la molécula llegan a un analizador de masas, normalmente un cuadrupolo debido a su costo y simplicidad, este consiste en cuatro barras metálicas dispuestas en forma paralela a las que se les aplica un voltaje constante y una radiofrecuencia oscilante generando un campo eléctrico que produce variaciones en las trayectorias de los iones dependiendo de su relación masa/carga. Este tipo de espectrómetro de masas permite dos modos de operación: SCAN, que detecta todos los iones introducidos al espectrómetro y el registro selectivo de iones (SIR, por sus siglas en inglés) que detecta selectivamente iones de una  $m/z$  específica, con lo que es posible seleccionar iones característicos de los compuestos de interés. Esto ayuda a disminuir las interferencias, aumentar la sensibilidad y selectividad del análisis.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1 Reactivos y materiales**

Kit comercial Sylgard 184 (bote de PDMS + agente curante) Dow Corning Corporation, Midland, Estados Unidos; alambre de acero inoxidable Ernie Ball 8 de 0.008” de diámetro (203.2  $\mu\text{m}$ ) Estados Unidos; Bulk de C18 (Pursuit XRs 5-C18), Agilent Technologies, Países Bajos; tubing de PTFE d.i. 0.3 mm, Cole-Parmer, Estados Unidos.

Estándares de: 2,6-DBP 99%, Aldrich, India; N,N-dietil-m-toluamida (DEET) 97%, Aldrich, Alemania; 4-metil-benciliden canfor (4-MBC) 99.7%, Fluka, Alemania; 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona (BP-3) 100%; Fluka, China; 2-etilhexil metoxicinamato (2-EHMC) 98.9%, Fluka, Suiza; 2-etilhexil-2-ciano-3,3-difenilacrilato (OCT) 99.2%, Fluka, Alemania; 2-etilhexil-4-(dimetilamino)benzoato (O-PABA) 99.0%, Fluka, EUA (Anexo 1) ;Fenantreno (estándar interno) 99.0%, ChemService, Estados Unidos; Metanol grado reactivo, J.T Baker, Trinidad y Tobago; Agua desionizada ultrapura tipo I.

### **3.2 Preparación de las disoluciones estándar**

Se preparó una disolución madre de cada estándar de la siguiente forma: se pesaron 10 mg de estándar y se pasaron a un matraz volumétrico de 10 mL, se agregaron 4 mL de metanol y se agitó en vórtex hasta disolver. Por último, se llevó al aforo con metanol (concentración  $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A partir de la disolución madre se efectuaron las disoluciones pertinentes para los análisis requeridos. Las disoluciones preparadas se almacenaron en viales ámbar de vidrio a  $4^\circ \text{C}$ .

### **3.3 Equipos**

Desionizador de agua Milipore (Direct-Q 3 UV). Balanza analítica Sartorius (Modelo CP1245), Vortex Thermolyne (37600 mixer), microcentrífuga DLAB (D2012 Plus), parrilla de agitación magnética ThermoScientific (Super Nuova), Herramienta rotativa de velocidad variable Bosch (Dremel 3000), Estufa de secado J.M Ortiz, homogenizador comercial de alimentos (NutriBullet®), Baño ultrasónico Branson (Modelo M1800), Cromatógrafo de gases Perkin Elmer (Clarus 680) acoplado a un espectrómetro de masas Perkin Elmer (SQ8)



de simple cuadrupolo; Microscopio electrónico de barrido, marca JEOL (modelo JSM 5900 LV).

### 3.4 Muestras

En un invernadero bajo condiciones descritas en el cuadro 3.1, se sembraron 4 plantas que se mantuvieron en crecimiento en tierra libre de pesticidas, las plantas se fortificaron de la siguiente manera:

La planta control se irrigó diariamente con 400 mL de agua corriente (sin contaminantes). Las otras 3 plantas se irrigaron 3 veces a la semana con 200 mL de una disolución acuosa de contaminantes emergentes (DEET, 2,6-DBP, 4-MBC, 2-EHMC, BP-3, O-PABA y OCT) a una concentración de 500 ng mL<sup>-1</sup> preparada con agua corriente, más 200 mL de agua para completar el volumen de 400 mL. La disolución de fortificación se preparó realizando las diluciones pertinentes a partir de la disolución madre.

Muestras comerciales de tomate cherry (variedad amarilla una adquirida en un mercado local, Nature Sweet, y Sunny Fields). Tomate cherry marca “Mr. Lucky” para validación del método por SPME *in vitro*.

Cuadro 3.1 Condiciones experimentales de las plantas estudiadas.

Planta	Edad de la planta	Tamaño de la planta (cm)	Cantidad de sustrato (kg)	Masa añadida de contaminantes (µg)	Tiempo de irrigación (meses)
Experimento preliminar	7 meses	45	3.5	6000	4
1	1 año	200	5	5100	4
2	1 año	158	5	5100	4
3	1 año	140	5	5100	4
Control	6 meses	50	5	-	6

## 3.5 Métodos

### 3.5.1 Fabricación de las fibras

#### Preparación del soporte.

Como soporte de la fibra *home-made* para SPME se utilizó un alambre de acero inoxidable de 0.008” de diámetro (203.2  $\mu\text{m}$ ) con una longitud de 100 cm. Este alambre se limpió con un paño de algodón impregnado de acetona para eliminar la suciedad y luego se cortó en segmentos de 8 cm.

#### Preparación de la fase extractante

**PDMS.** Se pesaron 0.4 g de polímero base PDMS y 0.12 g de agente curante (proporción 3:1) en un inserto de vidrio y luego, con un Dremel (velocidad 3), se mezclaron por 5 min. Después, se introdujo la mezcla a una estufa de secado a 160 °C durante 1.5 min, y se agitó nuevamente con el Dremel (velocidad 3) por 1 min. Este paso se repite 3 veces.

**PDMS-C18.** Se pesan en el siguiente orden en un inserto de vidrio: 36 mg de agente curante, 52 mg de C18 y 120 mg de PDMS base, posteriormente se centrifugó a 8000 rpm durante 10 min para favorecer el mezclado de los componentes y eliminar el aire entre las partículas de C18. Se mezcló con el Dremel (velocidad 3) durante 15 min y se revisó la homogeneidad de la mezcla. Posteriormente se introdujo a un ultrasonido con vacío durante 15 min con el fin de eliminar el aire remanente.

Una vez obtenida la consistencia apropiada para trabajar con el PDMS y PDMS-C18, se procedió a rellenar el tubing de PTFE<sup>56</sup> (d.i. 0.3 mm, longitud de 2.5 cm) por succión, con ayuda de una jeringa Ultra Fine 6 mm U 100 calibre 31 G, que dió forma a la fibra. El alambre se sumergió en el polímero hasta una profundidad de aproximadamente 5 mm, se introdujo lentamente en posición vertical dentro del tubing de PTFE con el polímero (2 cm de la longitud) (imagen 3.1 a).

Después, se curó el polímero dentro de una estufa de secado a 160 °C por 35 s para la fase de PDMS y 50 s para el compuesto de PDMS-C18 (imagen 3.1 b). Transcurrido ese tiempo, se sacó la fibra del horno, y, con fuerza mecánica, se separó el tubing de PTFE del soporte (imagen 3.1 c).

Ya que el polímero está curado sobre el soporte, se midió (1.5 cm) y cortó el excedente del polímero (imagen 3.1 d). Después, se instaló la fibra en una aguja hipodérmica, calibre 22 G

x 1/4" (0.70 mm x 32 mm), cuidando no dañar la fibra. Instalada la fibra en la aguja hipodérmica, se colocó una pequeña cantidad de PDMS para sellar el espacio que quedó entre el soporte de la fibra y las paredes internas de la aguja (imagen 3.1 e). De manera inmediata, la fibra ensamblada se llevó al horno a 160 °C por 2 min, para curar el PDMS añadido.

La fibra obtenida se acondicionó a: 270 °C por 20 min bajo flujo de hidrógeno en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases. Previo a su uso en el análisis, se realizó un blanco de fibra exponiéndola por 10 min en el puerto de inyección.

La imagen 3.1, presenta el diagrama de fabricación de fibras para SPME.

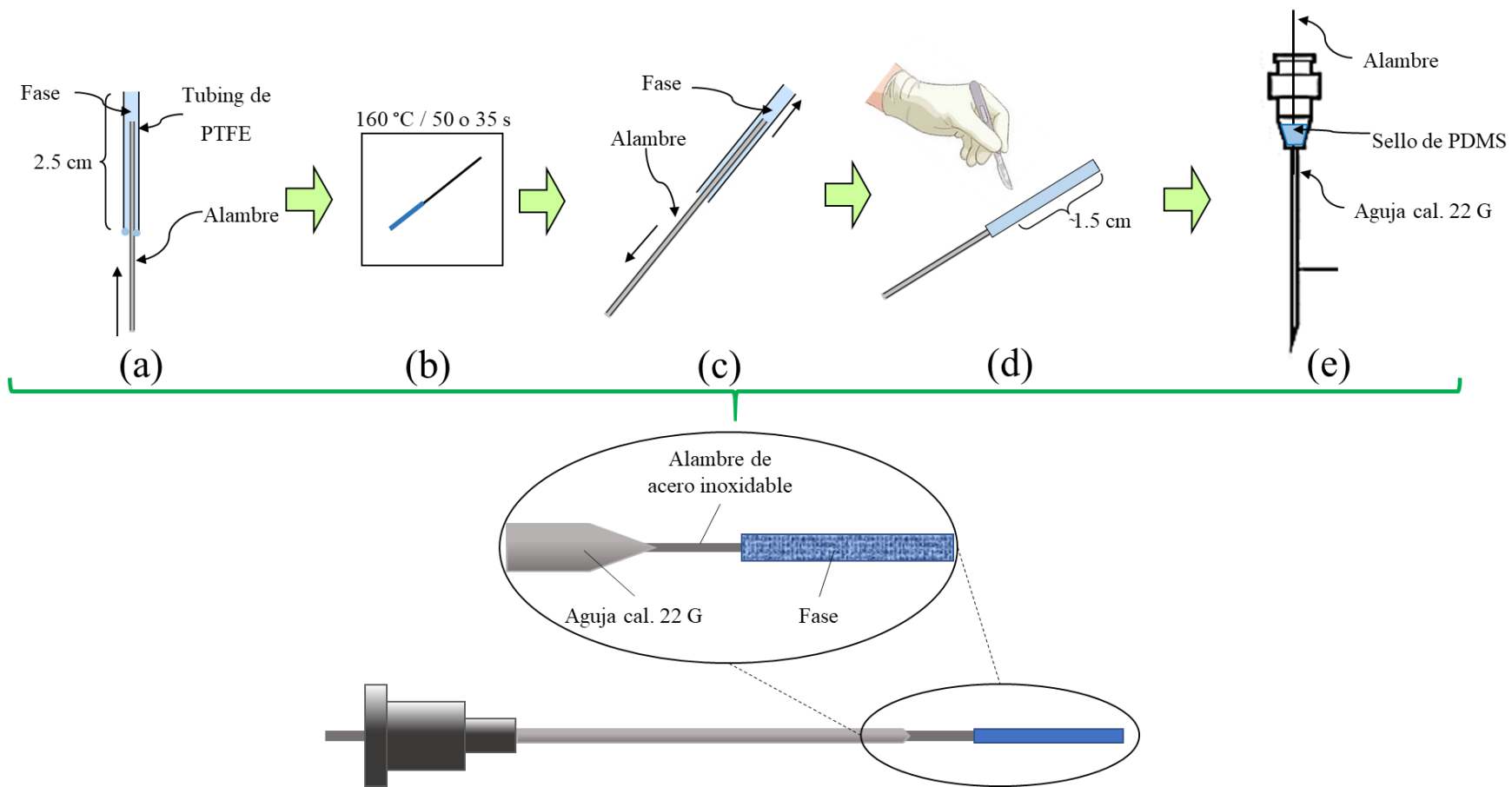


Imagen 3.1 Diagrama del método de fabricación de fibras SPME.

### 3.5.2 Caracterización de fibras

La caracterización de la fibra para medir el diámetro, espesor y superficie de la fase se realizó por microscopía electrónica de barrido, en la USAII (UNIDAD DE SERVICIOS DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN Y A LA INDUSTRIA) de la Facultad de Química de la UNAM, con un microscopio electrónico JEOL, utilizando los siguientes aumentos: x100, x200 y x1000.

### 3.5.3 Evaluación de fibras

La capacidad de extracción de las fibras elaboradas “*home-made*” se evaluó por SPME-GC realizando un perfil de extracción a 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 35 min. Se transfirieron 5 mL de agua fortificada con cada uno de los analitos de interés ( $500 \text{ ng mL}^{-1}$ ) en un vial de vidrio de 8 mL. Se adicionó una barra de agitación magnética de 10 mm de longitud y se selló el vial con un tapón horadado de polipropileno y septa de PTFE. Se agitó a 1200 rpm durante 5 min en una parrilla de agitación para equilibrar el sistema, después se realizó SPME por inmersión directa con la fibra fabricada durante los siete tiempos mencionados, a temperatura ambiente. Posteriormente, la desorción térmica se realizó en el puerto de inyección por 10 min utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu, modelo GC-2014 con un detector de ionización de flama (FID) a  $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ; columna DB-5 (95 % PDMS con 5 % de grupos fenilos) de  $30 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm} \times 250 \text{ }\mu\text{m}$ ; flujo de hidrógeno  $1.4 \text{ mL min}^{-1}$  y un Inyector Split/splitless, modo splitless (1 min) a  $270 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Programa de temperatura: Temp. inicial  $55 \text{ }^{\circ}\text{C}$  por 1 min, con un incremento de  $15 \text{ }^{\circ}\text{C/min}$  hasta  $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 min (tiempo total = 22.33 min).

Con el fin de evaluar la a repetibilidad intra e inter-fibra de las fibras, se realizaron extracciones ( $n = 3$ ) en agua fortificada con los analitos en estudio a una concentración de  $250 \text{ ng mL}^{-1}$  cada uno y un tiempo de extracción de 20 min utilizando las condiciones cromatográficas y de extracción descritas.

### 3.5.4 SPME *in vivo* en tomate cherry (*L. esculentum*)

La microextracción en fase sólida *in vivo* aplicada en este trabajo se realizó con el fin de identificar y cuantificar los contaminantes emergentes en estudio en tomate cherry. Para efectuar el muestreo *in vivo* la fibra se insertó en el tejido vegetal bajo la protección de la aguja cal. 22 G (a), luego, se expuso la fibra PDMS-C18 al tejido al mismo tiempo que se retrajo la aguja (b). Se expuso la fibra para la extracción por 20 min, y se retrajo la fibra dentro de la aguja (c) (Imagen 3.2). Posteriormente, la fibra se desorbió en el puerto de inyección del cromatógrafo utilizando las siguientes condiciones:

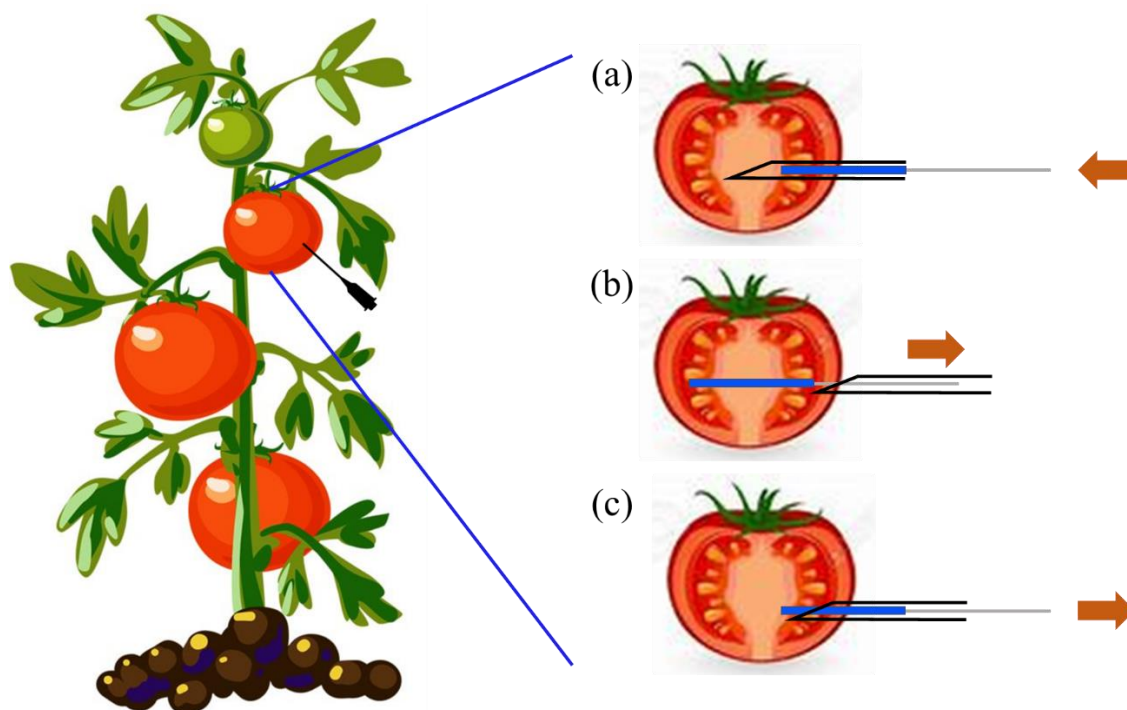


Imagen 3.2. Procedimiento de extracción *in vivo*.

Cromatógrafo de gases Perkin Elmer Clarus 680 acoplado a un espectrómetro de masas Perkin Elmer SQ8 de simple cuadrupolo. Inyector PSSI, modo splitless 1 min. Temperatura del inyector: 270 °C. Programa de temperatura: 55 °C por 1 min, 15 °C/min hasta 300 °C por 5 min, duración total: 22.33 min. Columna: DB-5 (95 % de polidimetilsiloxano con 5 % de grupos fenilo) de 30 m x 0.25 mm x 0.25 µm, flujo de Helio a 1.4 mL min<sup>-1</sup>. Espectrómetro de masas de simple cuadrupolo en modo SCAN y SIR. Retardo de disolvente: 7.5 minutos. Temperatura de la línea de transferencia: 250 °C, temperatura de la fuente: 250 °C,

temperatura del cuadrupolo: 250 °C. Los iones monitoreados en modo SIR se muestran en el cuadro 3.1.

Cuadro 3.2 Iones monitoreados en modo SIR

Compuesto	Iones (m/z)		
Fenantreno (EI)	89	152	178
2,6-DBP	250	143	252
DEET	90	119	190
BP-3	77	151	227
4-MBC	128	171	254
O-PABA	148	165	277
2-EHMC	161	178	290
OCT	204	249	360

El tiempo de extracción *in vivo* se optimizó para su posterior análisis por GC-MS.

#### 3.5.4.1 Perfil de extracción

Para optimizar el tiempo de extracción de SPME *in vivo*, se realizó un perfil de extracción en el tomate cherry en una planta cultivada e irrigada con contaminantes emergentes. Los tiempos de extracción estudiados fueron 20, 40 y 60 min con la fibra PDMS-C18. Después de cada tiempo de extracción, la fibra se desorbió de acuerdo con las condiciones descritas en 3.5.4.

#### 3.5.5 Análisis por SPME *in vivo*

Como se mencionó en la sección 2.6, existen diversos métodos de calibración *in vivo*, sin embargo, en este trabajo se propuso una alternativa a los métodos de calibración tradicionales para estimar de manera aproximada los analitos identificados por SPME *in vivo*-GC-MS.

### 3.5.5.1 SPME *in vitro* -GC-MS

#### 3.5.5.1.1 SPME *in vitro*

Se homogenizaron 70 g de tomate cherry durante 45 s en un procesador de alimentos comercial posteriormente se tomaron 10 g del homogenizado y se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de estándar interno en metanol ( $20 \text{ ng g}^{-1}$ ); se agitó en vórtex por 10 min y se dejó que se equilibrara por 30 min. Después, se transfirieron 500 mg del homogenizado a un dispositivo modificado de filtrado y extracción<sup>57</sup> (Imagen 3.3) para evitar que la fibra para SPME sea dañada por los sólidos suspendidos (restos de semillas, cáscara y fibra insoluble) y se llevó a volumen de 5 mL con agua desionizada.

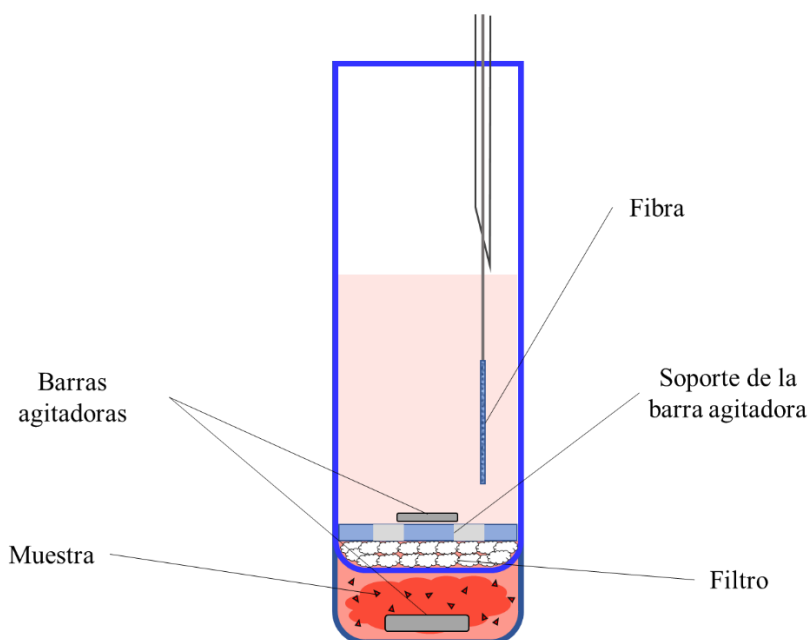


Imagen 3.3. Dispositivo de extracción para SPME (Anexo 3).

#### 3.5.5.1.2 Selección de la fibra

Para seleccionar la fibra óptima en la determinación de contaminantes emergentes en tomate cherry por SPME *in vitro*, se evaluaron las fibras PDMS y PDMS-C18 utilizando tomate cherry homogenizado y fortificado con las siguientes concentraciones: 2,6-DBP,  $90 \text{ ng g}^{-1}$ ; DEET,  $110 \text{ ng g}^{-1}$ ; BP-3,  $100 \text{ ng g}^{-1}$ ; 4-MBC,  $50 \text{ ng g}^{-1}$ ; O-PABA,  $100 \text{ ng g}^{-1}$ ; 2-EHMC,  $100 \text{ ng g}^{-1}$ ; OCT,  $525 \text{ ng g}^{-1}$ ; Fenantreno (EI),  $20 \text{ ng g}^{-1}$ . Condiciones de extracción y



cromatográficas descritas en la sección 3.5.5.1.4. y 3.5.4 respectivamente. El análisis se realizó por triplicado ( $n = 3$ ).

### **3.5.5.1.3 Perfil de extracción**

Para corroborar el tiempo de extracción, se preparó tomate cherry homogenizado según la sección 3.5.5.1.1, y se fortificó a las siguientes concentraciones: 2,6-DBP, 300 ng g<sup>-1</sup>; DEET, 300 ng g<sup>-1</sup>; BP-3, 200 ng g<sup>-1</sup>; 4-MBC, 200 ng g<sup>-1</sup>; O-PABA, 200 ng g<sup>-1</sup>; 2-EHMC, 200 ng g<sup>-1</sup>; OCT, 500 ng g<sup>-1</sup>; Fenantreno (EI), 20 ng g<sup>-1</sup>. Los tiempos de extracción estudiados fueron 5, 10, 15, 20, 25 y 30 min con la fibra de PDMS-C18. Condiciones de extracción y cromatográficas descritas en la sección 3.5.5.1.4. y 3.5.4 respectivamente.

### **3.5.5.1.4 Condiciones de extracción**

La optimización del método por SPME *in vitro* se realizó en matriz fortificada, y con fibras de PDMS-C18 fabricadas en el laboratorio, bajo las siguientes condiciones de extracción: Dispositivo de extracción modificado (Anexo 3), temperatura: ambiente, inmersión directa, tiempo de equilibrio: 5 min, tiempo de extracción: 20 min, agitación: 1200 rpm, cantidad de muestra: 500 mg de homogenizado de tomate, modo de desorción: térmica, en el puerto de inyección del cromatógrafo. Condiciones cromatográficas descritas en la sección 3.5.4.

### **3.5.5.1.5 Efecto matriz**

Con el fin de evaluar el efecto matriz en homogenizado de tomate cherry y en agua desionizada fortificados (2,6-DBP: 9 ng ml<sup>-1</sup>; DEET: 11 ng ml<sup>-1</sup>; BP-3: 10 ng ml<sup>-1</sup>; 4-MBC: 5 ng ml<sup>-1</sup>; O-PABA: 10 ng ml<sup>-1</sup>; 2-EHMC: 10 ng ml<sup>-1</sup>; OCT: 525 ng ml<sup>-1</sup>) se realizaron extracciones con la fibra de PDMS-C18, de acuerdo con las condiciones de extracción y cromatográficas mencionadas en la sección 3.5.4. Los cromatogramas obtenidos se compararon para observar tal efecto.

### 3.5.5.2 Evaluación del método

Establecidas las condiciones de SPME *in vitro*-GC-MS se realizaron las siguientes pruebas para la evaluación del método: determinación del LC y LD, linealidad del método, repetibilidad del método, recuperación, y robustez.

#### 3.5.5.2.1 Límite de cuantificación (LC) y límite de detección (LD)

Se determinó experimentalmente el LC y el LD, de modo que el límite de detección posea una razón señal-ruido (S/N) mayor a 3. El límite de cuantificación se determinó de tal manera que el pico obtenido tuviera una  $S/N \geq 10$ , para cada uno de los compuestos estudiados. El LD se realizó por sextuplicado ( $n = 6$ ) y el LC por triplicado ( $n = 3$ ).

#### 3.5.5.2.2 Linealidad

El intervalo lineal fue planteado de acuerdo con resultados de experimentos preliminares en los que se cubre de manera aproximada el intervalo de concentraciones en lo que se podrían encontrar los compuestos de interés. Las curvas de calibración se realizaron por triplicado ( $n = 3$ ). En el cuadro 3.2 se presentan las concentraciones para evaluar linealidad.

Cuadro 3.3. Niveles de concentración evaluados

Analito	LD	Nivel 1 (LC)	Nivel 2	Nivel 3	Nivel 4	Nivel 5
				ng g <sup>-1</sup>		
2,6-DBP	8	30	60	90	120	150
DEET	3	10	60	110	160	210
BP-3	0.2	1	50	100	150	200
4-MBC	1	5	25	50	75	100
O-PABA	5	20	60	100	140	180
2-EHMC	5	20	60	100	140	180
OCT	100	325	425	525	625	725

LD: límite de detección, LC: límite de cuantificación

### **3.5.5.2.3 Repetibilidad**

Se estudió la repetibilidad intra-día de la metodología a un nivel en muestras fortificadas, (punto 3 de la curva de calibración para cada analito), el análisis se realizó por triplicado. Así mismo se evaluó la repetibilidad inter-día a partir de triplicado obtenido del análisis intra-día y un análisis por triplicado realizado en un día diferente (n=6). Condiciones de extracción y cromatográficas descritas en la sección 3.5.5.1.4. y 3.5.4 respectivamente.

### **3.5.5.2.4 Recuperación**

La recuperación del método se evaluó con el nivel 3 de la curva de calibración de cada analito en muestras fortificadas. Se obtuvo al área relativa, se interpoló en la curva de calibración y se comparó la concentración obtenida contra la predicha. El análisis se realizó por triplicado (n=3) en tomate fortificado. Las condiciones de extracción y cromatográficas se describen en la sección 3.5.5.1.4. y 3.5.4, respectivamente.

### **3.5.5.2.5 Robustez**

Se evaluó la robustez del método cambiando únicamente la variedad de tomate cherry, analizando muestras comerciales (variedad amarilla una adquirida en un mercado local, Nature Sweet, y Sunny Fields) que fueron fortificadas a la concentración del nivel 3 de la curva de calibración de cada analito, la determinación se realizó por triplicado (n=3) para cada muestra. Por interpolación en la curva de calibración, se calculó el recobro obtenido. Las condiciones de extracción y cromatográficas se describen en las secciones 3.5.5.1.4. y 3.5.4, respectivamente.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1 Fabricación de fibras de PDMS y PDMS-C18**

#### **4.1.1 Preparación del soporte de la fibra**

La incorporación de alambre de acero inoxidable permitió obtener fibras para SPME con buena resistencia química, térmica y mecánica.

Por otro lado, en un estudio previo del grupo de investigación<sup>58</sup>, se exploraron otros métodos que incluyen la limpieza con arco de plasma y la limpieza con soluciones ácidas y alcalinas. Sin embargo, éstos métodos son más laboriosos, por lo que, en este trabajo, se realizó la limpieza del alambre con un paño de algodón impregnado de acetona, que demostró ser un método de limpieza apropiado, rápido y sencillo que permitió que tanto el PDMS y el compuesto de PDMS-C18 tuvieran una adherencia uniforme sobre el soporte de acero inoxidable.

#### **4.1.2 Elaboración de la fase extractante**

##### **1. PDMS**

A partir del kit comercial Sylgard® 184, se tomó la proporción optimizada en un estudio previo<sup>58</sup> (base-agente curante 3:1). Los parámetros críticos para la elaboración de esta fase extractante son:

- Relación base-agente curante. Provee diferente grado de entrecruzamiento de las cadenas de siloxanos. Un polímero más suave, tendrá menor grado de entrecruzamiento que un polímero más duro.
- Proceso de mezclado y homogenización. Se buscó obtener una manera adecuada para que la integración de los componentes de la mezcla fuese homogénea y por lo tanto, el curado del polímero sea uniforme.
- Temperatura y tiempo de curado. Se decidió manipular el tiempo de curado y mantener la temperatura constante (160 °C). Dada la limitada cantidad de polímero en la fibra (poco más de 0.5 µl, hasta antes de darle las dimensiones deseadas), los tiempos de curado son relativamente cortos. Los tiempos evaluados fueron 10, 20, 30 y 40 s, encontrando que el tiempo más apropiado fue el de 30 s, ya que, tiempos

menores no permitían que el polímero se fijara de manera uniforme en la superficie, y tiempos mayores provocaban la ruptura del polímero.

- Eliminación de aire en la mezcla. Es importante debido a que la presencia de burbujas en la mezcla dará como resultado una superficie irregular en la fibra.

## 2. PDMS-C18

La elaboración del compósito de PDMS-C18 partió de las mismas proporciones de base-agente curante usadas para la fabricación de la fase de PDMS, pero adicionando un 25 % (m/m) de partículas C18, de tal manera que se mantiene el grado de entrecruzamiento del polímero y se modifica la capacidad de extracción de la fase de PDMS, creando sitios más específicos para la absorción de compuestos orgánicos.

Sin embargo, el proceso de fabricación de este compósito es un poco más largo (50 min) que el de la fabricación de las fibras de PDMS (30 min). Esencialmente, las mismas variables son controladas para la fabricación de esta fase:

- Relación base-agente curante. Se mantiene la misma proporción con el fin de obtener un mismo grado de entrecruzamiento del polímero, con respecto a la fibra de PDMS no modificada.
- Proceso de mezclado y homogenización. La adición de partículas C18 hace que el tiempo de mezclado sea más exhaustivo con el fin de obtener una dispersión homogénea de las partículas. Además, se incluye la centrifugación de la mezcla que favorece la penetración del polímero entre los espacios que hay entre las partículas C18, de modo que, además de mezclar los componentes, se elimina el aire que puede provocar defectos en la superficie de la fibra.
- Temperatura y tiempo de curado. De igual modo que para la fase de PDMS, se decidió manipular el tiempo de curado y mantener la temperatura constante (160 °C). Debido a la escasa cantidad de compósito en la fibra (poco más de 0.5  $\mu$ l, hasta antes de darle las dimensiones deseadas), los tiempos de curado son relativamente cortos. Los tiempos evaluados fueron 20, 30, 40, 50 y 60 s, encontrando que el tiempo más apropiado fue 50 s. Tiempos menores a 50 s provocan que el compósito no quede adherido al alambre, y con tiempo mayor a 50 s, se obtienen rupturas en la fase.

Con el procedimiento anterior se obtuvieron fibras para SPME a base de PDMS y PDMS-C18 con buena estabilidad química, mecánica y térmica, con un volumen de fase de 0.5  $\mu\text{l}$  (Anexo 4) (Imagen 4.1).

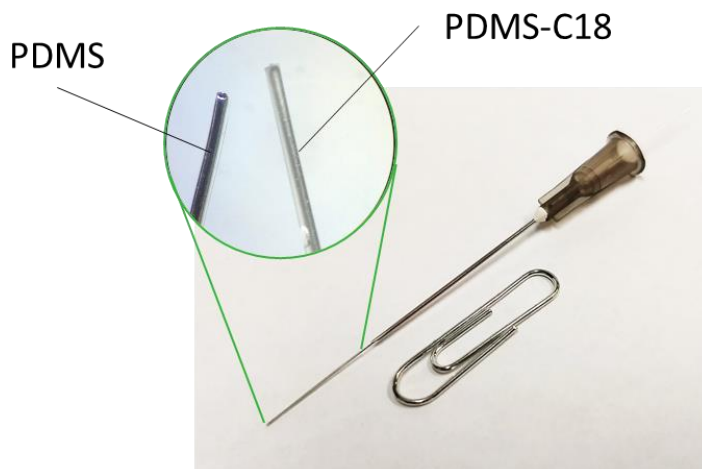


Imagen 4.1 Fibra obtenida con el procedimiento propuesto.

### 4.1.3 Caracterización de las fibras

La caracterización de las fibras se realizó por medio de microscopía electrónica de barrido con el fin de obtener información del diámetro de la fibra, espesor de la fase y homogeneidad de la superficie. En las imágenes obtenidas (x100, x200 y x1000) se observa que se obtuvo una superficie homogénea, diámetro y espesor uniformes y una distribución homogénea del C18 (para el caso de la fibra de PDMS-C18). Con lo que se puede decir que el procedimiento para la fabricación propuesto es adecuado en la elaboración de fibras para microextracción en fase sólida.

Las imágenes 4.2 A y B corresponden a una fibra de PDMS. Se observa que a pesar de que el tubing de PTFE tiene un diámetro interno de 0.3 mm (300  $\mu\text{m}$ ), no tiene dichas dimensiones y en cambio, tiene un diámetro promedio de 286.5  $\mu\text{m}$ , debido probablemente al curado del PDMS. Es decir, durante el proceso de curado, las cadenas del dimetilsiloxano polimerizan vía radicales libres con las cadenas terminales del curante, provocando el entrecruzamiento, de modo que el polímero sólido se contrae<sup>59</sup> y por lo tanto se obtienen dimensiones menores a las esperadas (4.5 % menos).

Por otra parte, en la imagen 4.2 B se observa la punta de la fibra de PDMS, en la que claramente se aprecia que el alambre de acero inoxidable no se encuentra perfectamente centrado ya que es complicado mantenerlo fijo durante el proceso de curado. Además, la punta presenta defectos menores que no comprometen su integridad ni desempeño.

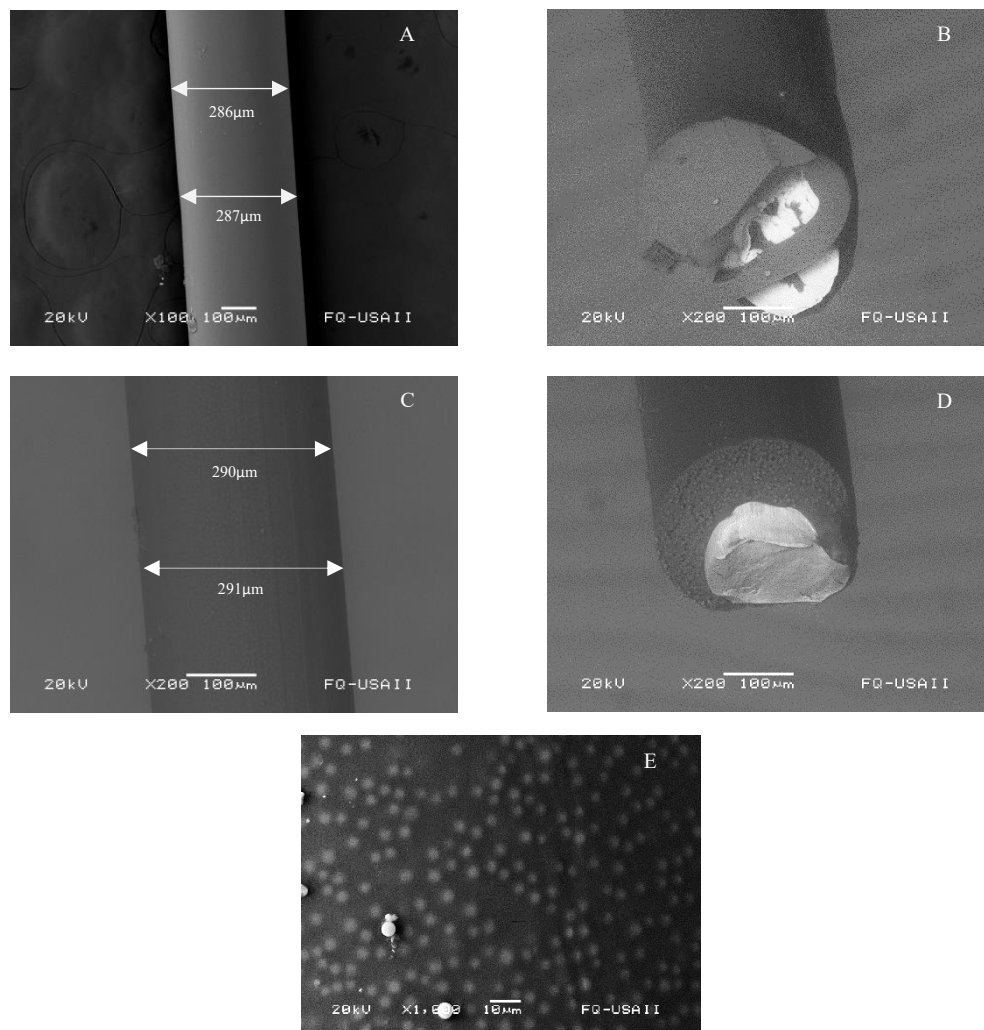


Imagen 4.2. Microscopía electrónica de barrido para análisis de las fibras obtenidas. A y B corresponden a la fibra de PDMS. C, D y E corresponden a la fibra de PDMS-C18.

Las imágenes 4.2 C, D y E corresponden a una fibra de PDMS-C18, que, en comparación con la de PDMS, el efecto de contracción<sup>59</sup> del polímero no es tan evidente. Esto probablemente se debe a que las partículas de C18 ocupan espacio entre el PDMS e impiden que disminuya su tamaño por efecto de la polimerización. Sin embargo, para sustentar estas

afirmaciones, valdría la pena efectuar una prueba de hipótesis para determinar si las contracciones del polímero tanto en la fibra de PDMS como en la fibra de PDMS-C18 son estadísticamente significativas, respecto al diámetro interno del tubing de PTFE.

La imagen 4.2 D corresponde a la punta de la fibra, que es notablemente mejor que la de PDMS, lo que puede explicarse por la presencia del C18 en esta fase, ya que proporciona una mejor separación del molde, lo que permite obtener una punta de la fibra más uniforme con respecto a la fibra de PDMS.

La imagen 4.2 E muestra la dispersión de partículas de C18 en el PDMS. En ésta se puede observar que la distribución es homogénea, ya que no se encuentran cúmulos de partículas o espacios en los que éstas no se observen.

Cabe resaltar que en un estudio previo del grupo de investigación<sup>58</sup>, se exploraron otras formas de elaborar fibras para microextracción en fase sólida a base de PDMS, sin embargo no fueron satisfactorias, ya que presentaban superficies heterogéneas y estriadas. Además, el soporte utilizado (alambre de acero inoxidable de 0.005” de diámetro) se rompía después de varios procesos de desorción en el inyector del cromatógrafo de gases (poca resistencia mecánica y térmica).

Dichos inconvenientes se solucionaron con el procedimiento de fabricación de fibras propuesto en este trabajo. Ya que como se mencionó anteriormente, las fibras obtenidas presentaron homogeneidad en la superficie, espesor y diámetro. Además, el alambre de acero inoxidable utilizado es más resistente a los procesos de desorción térmica de tal manera que una fibra es capaz de soportar alrededor 100 desorciones en el puerto de inyección del cromatógrafo.

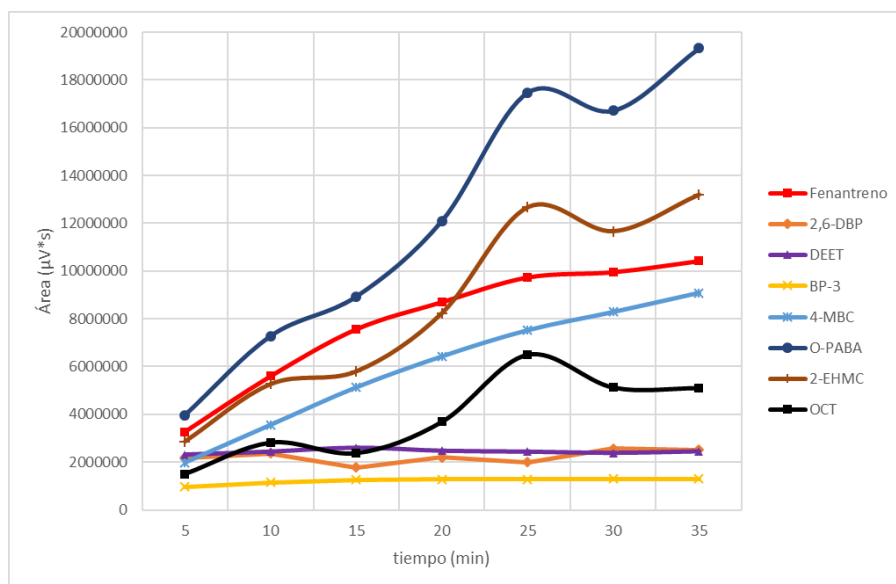
#### **4.1.4 Evaluación de las fibras**

Considerando que la microextracción en fase sólida no es una técnica de extracción exhaustiva, se tienen que optimizar diferentes parámetros. Sin embargo, en este trabajo sólo se optimizó el tiempo de extracción con base en el perfil de extracción de los analitos, al evaluar la capacidad de extracción de las fibras con contaminantes emergentes en solución acuosa. El análisis del perfil de extracción demuestra que las fibras fueron capaces de extraer

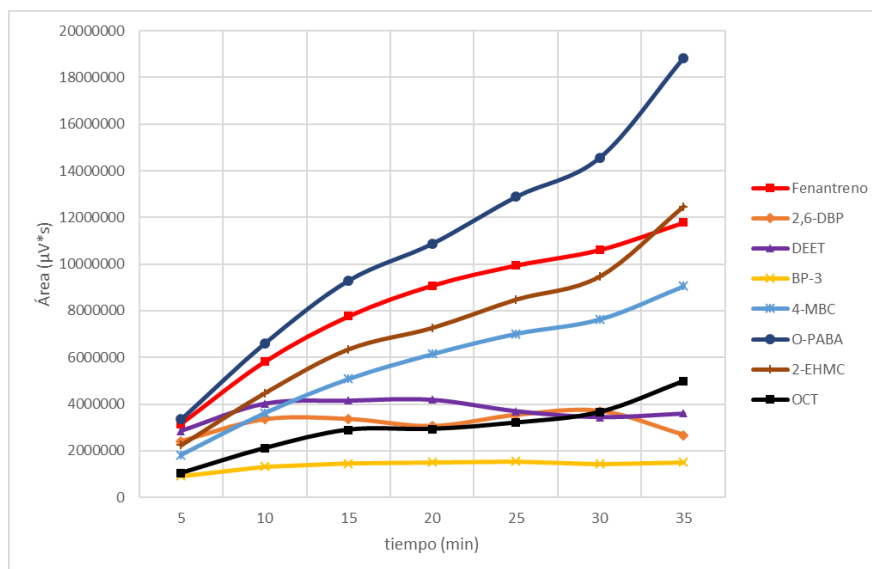


todos los analitos estudiados, y con un comportamiento acorde con la teoría de SPME, ya que los analitos presentaron un perfil típico para esta técnica.

En las gráficas 4.1 y 4.2, se presenta el perfil de extracción de cada compuesto con fibra de PDMS y PDMS-C18, respectivamente. En la gráfica 4.1 se observa que los analitos más polares (2,6-DBP, DEET y BP-3) alcanzan el equilibrio más rápido que los analitos menos polares (4-MBC, O-PABA, 2-EHMC, OCT y fenantreno) ver Anexo 1, e incluso ni siquiera llegan a estar cerca de dicho equilibrio probablemente debido al elevado coeficiente de difusión que presentan. Además, el O-PABA, 2-EHMC y OCT, presenta un comportamiento irregular, probablemente debido a que las superficies de PDMS sin modificar pueden presentar cierto grado de absorción inespecífica.<sup>17</sup>



Gráfica 4.1. Perfil de extracción de contaminantes emergentes con fibra de PDMS



Gráfica 4.2. Perfil de extracción de contaminantes emergentes con fibra de PDMS-C18

La gráfica 4.2 muestra el comportamiento de los analitos extraídos con una fibra de PDMS-C18, el cual es menos variable en comparación con la fibra de PDMS, esto se explica por la creación de sitios más específicos para la absorción de los analitos que proporciona el C18. Para ambas fibras, se obtuvo el perfil de extracción de los analitos, que, de acuerdo con la teoría de SPME, los analitos más polares alcanzan el equilibrio más rápido que los menos polares en una fase extractante de baja polaridad como lo es el PDMS y el PDMS-C18.

Con base en los perfiles de extracción obtenidos, se eligió un tiempo de extracción de 20 min para estudiar la repetibilidad intra e inter-fibra para cada fase extractante obtenida. Esto, fundamentado en que analitos como el DEET, OCT, BP-3, 2,6-DBP se encuentran en la zona de equilibrio y los restantes en el intervalo cinético, lo que nos asegura que, al menos para la mitad de los compuestos obtendremos la máxima cantidad de analito extraído.

La evaluación de la repetibilidad en agua tipo I fortificada fueron satisfactorios (Cuadro 4.1) ya que los coeficientes de variación fueron aceptables para ambas fases (de acuerdo con la literatura por debajo de 20 % se considera una variación aceptable en el análisis de trazas por GC)<sup>60</sup>. Para la fibra de PDMS el intervalo de % CV se determinó entre 2 – 12 % mientras que para la fibra de PDMS-C18 el intervalo del % CV fue entre 1 y 17 %.

En general los coeficientes de variación intra-fibra e inter-fibra fueron similares para cada fase, sin embargo, las principales diferencias se presentaron en el 4-MBC y el O-PABA, que

tienen menor variación en la fibra de PDMS-C18 respecto a la de PDMS. Posiblemente por la elevada especificidad del C18 para extraer estos compuestos. Además, se realizó una prueba de apareamiento de datos para cada fibra ( $\alpha = 0.05$ ), y se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas para cada fase (Anexo 6).

Cuadro 4.1. Repetibilidad intra e inter-fibra.

Compuesto	PDMS		PDMS-C18	
	% CV (n=3)		% CV (n=3)	
	Intra fibra	Inter fibra	Intra fibra	Inter fibra
2,6-DBP	7	6	8	7
DEET	2	2	2	4
BP-3	2	4	2	4
4-MBC	5	4	1	2
O-PABA	14	11	9	3
2-EHMC	6	15	8	5
OCT	10	12	17	17

## 4.2 SPME *in vivo* en tomate cherry (*L. esculentum*)

La aguja insertada en el tejido vegetal protege a la fibra de SPME de modo que, es fácil exponerla para realizar el análisis *in vivo* en diferentes tejidos como tallo o fruto (Imagen 4.3).

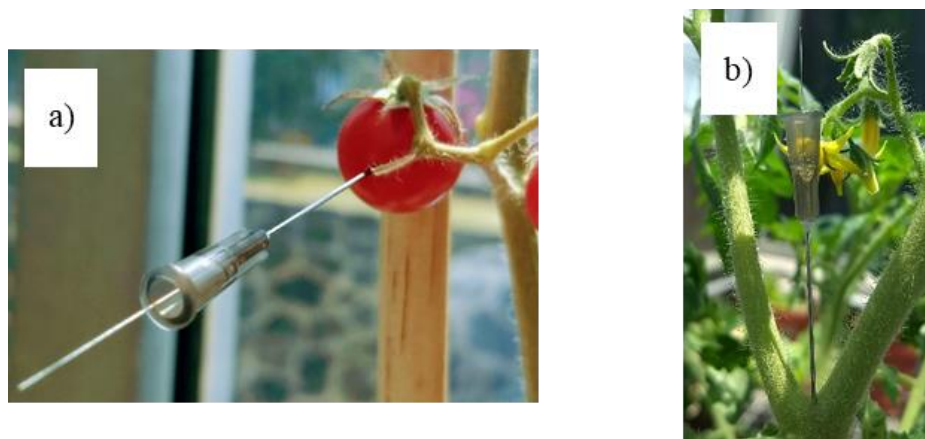


Imagen 4.3. Muestreo *in vivo* en tomate (a) y en tallo (b).

En un experimento preliminar, las fibras de PDMS-C18 permitieron el muestreo *in vivo* (muestreo aproximadamente a 30 cm desde la base del tallo) en la planta de tomate cherry, con este se observó que los compuestos identificados se absorbieron selectivamente por la planta

mediante diferentes mecanismos, es decir, los filtros UV (BP-3, 4-MBC, O-PABA, 2-EHMC y OCT), que tienen relativamente elevado carácter hidrofóbico ( $\log P > 5$ , excepto BP-3) se absorbieron predominantemente en la raíz, que es un tejido rico en lípidos y luego, se trasladaron por la planta hacia el tallo y el fruto.

Es de resaltar que, aunque el 2,6-DBP, es un compuesto relativamente polar ( $\log P = 3.36$ ) y parcialmente soluble ( $0.119 \text{ mg ml}^{-1}$ ) este no fue identificado en el tallo ni en el tomate, lo que indica que debe permanecer en la tierra o en la raíz de la planta sin ser trasladado a los tejidos superiores debido a su poca biodisponibilidad y baja afinidad hacia la raíz.

El DEET que tiene un  $\log P = 2.02$  fue identificado únicamente en el tallo, el mecanismo de absorción puede diferir al de los otros compuestos y explicarse mejor por su elevada solubilidad en agua ( $912 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ ), lo que hace que se difunda fácilmente sobre la raíz, absorberse y traslocarse al tallo. Sin embargo, su ausencia en el fruto puede explicarse por su poca capacidad de atravesar membranas celulares ricas en lípidos como es el caso del fruto (Imagen 4.4).

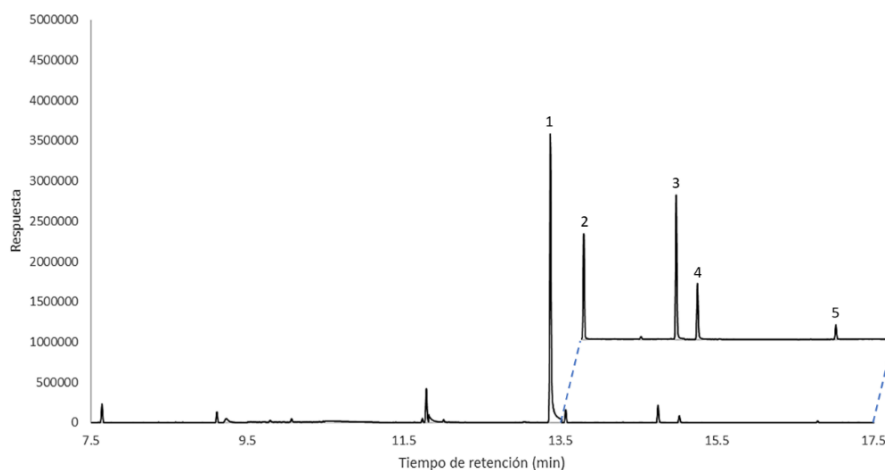


Imagen 4.4 Cromatograma iónico (SIR) por SPME *in vivo* -GC-MS de tomate cherry (muestreo a 30 cm desde la base del tallo). 1: BP-3; 2: 4-MBC; 3: O-PABA; 4: 2-EHMC; 5: OCT.

Por medio de este análisis, también se observó que el transporte de los compuestos a través de la planta sucede gradualmente, en otras palabras, el transporte de los compuestos se ve modificado según el estado de crecimiento de la planta, puesto que en la parte inferior de ésta se identificaron los compuestos descritos (muestreo aproximadamente a 45 cm desde la base del tallo, imágenes 4.5 y 4.7) y en las partes superiores no son detectados (muestreo aproximadamente a 197 cm desde la base del tallo, imagen 4.6). El Cuadro 4.2 presenta los compuestos identificados por SPME *in vivo* -GC-MS en una planta de tomate cherry.

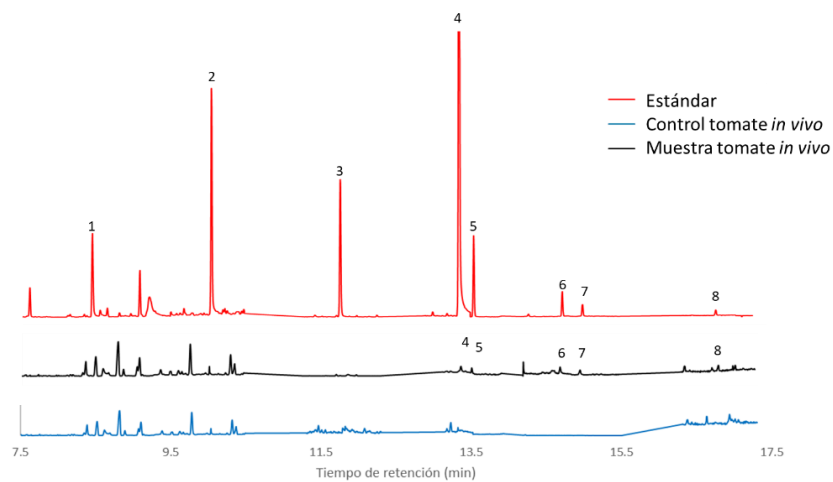


Imagen 4.5 Cromatograma reconstruido (SIR) del análisis por SPME *in vivo*-GC-MS de tomate cherry (muestreo a 45 cm desde la base del tallo). Identificación: 1: 2,6-DBP; 2: DEET; 3: Fenantreno (EI); 4: BP-3; 5: 4-MBC; 6: O-PABA; 7: 2-EHMC; 8: OCT.

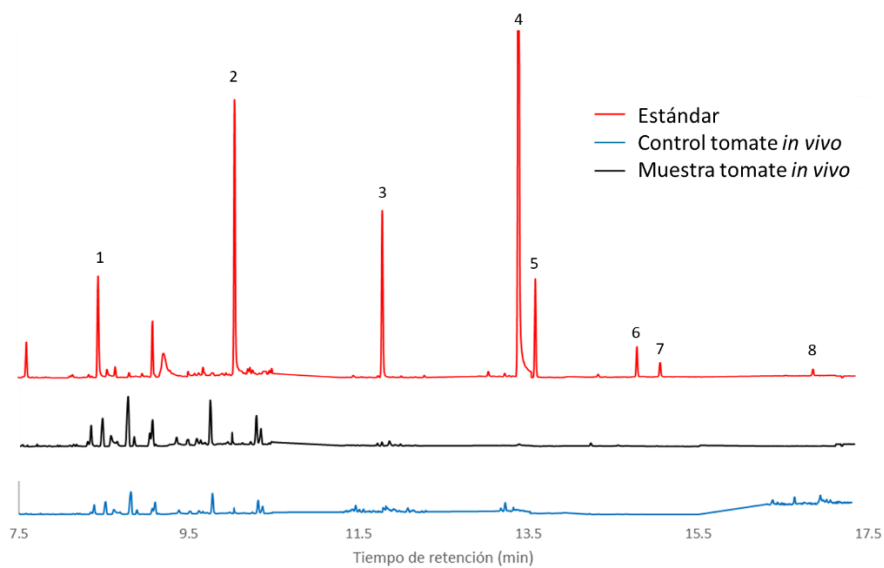


Imagen 4.6 Cromatograma reconstruido (SIR) del análisis por SPME *in vivo*-GC-MS de tomate cherry (muestreo a 197 cm desde la base del tallo). Identificación: ver la imagen 4.5.

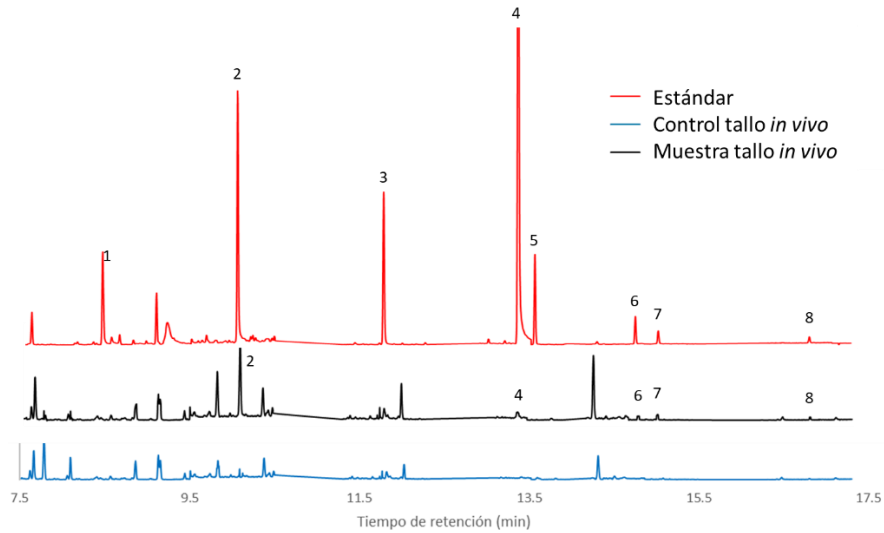
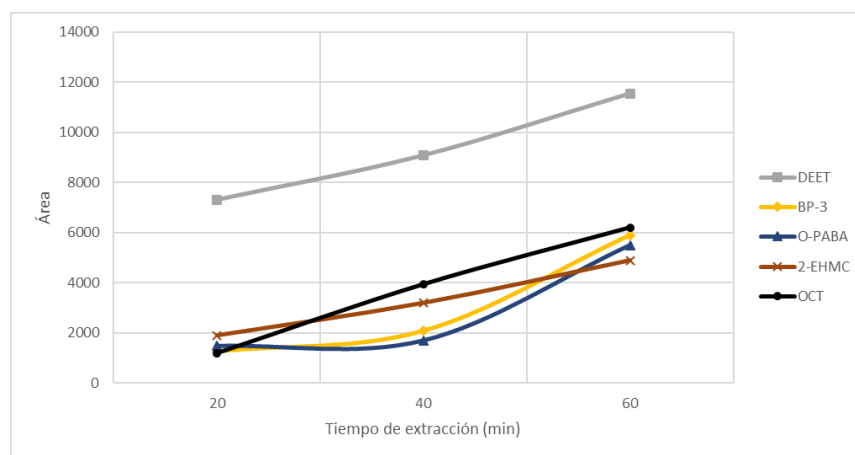


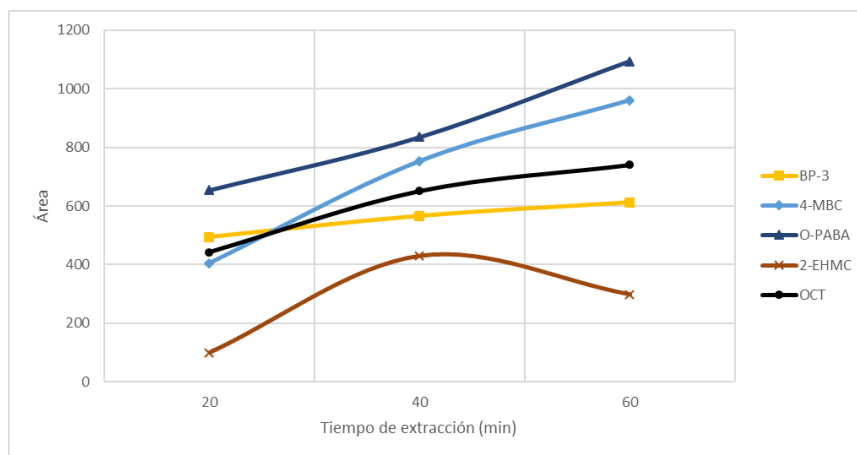
Imagen 4.7 Cromatograma reconstruido (SIR) del análisis por SPME *in vivo* -GC-MS de tallo, (muestreo a 45 cm desde la base del tallo). Identificación: ver la imagen 4.5.

#### 4.2.1 Perfil de extracción

En los resultados del perfil de extracción *in vivo* (Gráficas 4.3 y 4.4) se observó que 20 min fue el tiempo apropiado para realizar las extracciones en la muestra, debido a que tiempos mayores de muestreo favorecen la deshidratación del tomate, ya que, al insertar la fibra, el tomate comienza a perder agua por el orificio hecho por la aguja. Además, los tiempos recomendados de muestreo en organismos vivos utilizando SPME deben de ser relativamente cortos.<sup>38</sup>



Gráfica 4.3 Perfil de extracción *in vivo* del tallo de una planta de tomate cherry irrigada con contaminantes emergentes.



Gráfica 4.4 Perfil de extracción *in vivo* de tomate cherry irrigada con contaminantes emergentes.

En la gráfica 4.3, se observa el comportamiento de los compuestos identificados en un muestreo *in vivo*. Se aprecia que el DEET es el compuesto que se detecta en mayor concentración, esto debido a que en el tallo se llevan predominantemente procesos de transporte de fluidos para llevar nutrientes a la planta y su elevada solubilidad favorece su transporte a través del tallo.

Tomando en cuenta la función del tallo de transportar nutrientes a la planta, y la baja solubilidad de los filtros UV, estos se detectan en menor concentración comparado con el DEET (que es más soluble), por lo tanto, estos son poco absorbidos.

La gráfica 4.4 muestra el perfil de extracción de los contaminantes emergentes detectados en el tomate. El tomate como lugar de destino de nutrientes en la planta acumula sólo ciertos compuestos, entonces, por sus propiedades hidrofóbicas, sólo se detectaron los filtros UV. Sin embargo, la acumulación de los compuestos podría variar de acuerdo con el estado de maduración del fruto.

Cuadro 4.2. Compuestos identificados en un muestro por SPME *in vivo* -GC-MS

Compuesto	Planta fortificada		Planta control	
	tomate	tallo	tomate	tallo
2,6-DBP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DEET	n.d.	x	n.d.	n.d.
BP-3	x	x	n.d.	n.d.
4-MBC	x	n.d.	n.d.	n.d.
O-PABA	x	x	n.d.	n.d.
2-EHMC	x	x	n.d.	n.d.
OCT	x	x	n.d.	n.d.

x: compuesto detectado, n.d.: no detectado

### 4.3 SPME *in vitro*-GC-MS

#### 4.3.1 SPME *in vitro*

La preparación de la muestra se planteó de tal manera que los sólidos suspendidos propios del tomate homogenizado fueran retenidos por el filtro (fibra de vidrio) y estos no dañaran la fibra o disminuyeran su capacidad de extracción.

#### 4.3.2 Selección de la fibra para SPME

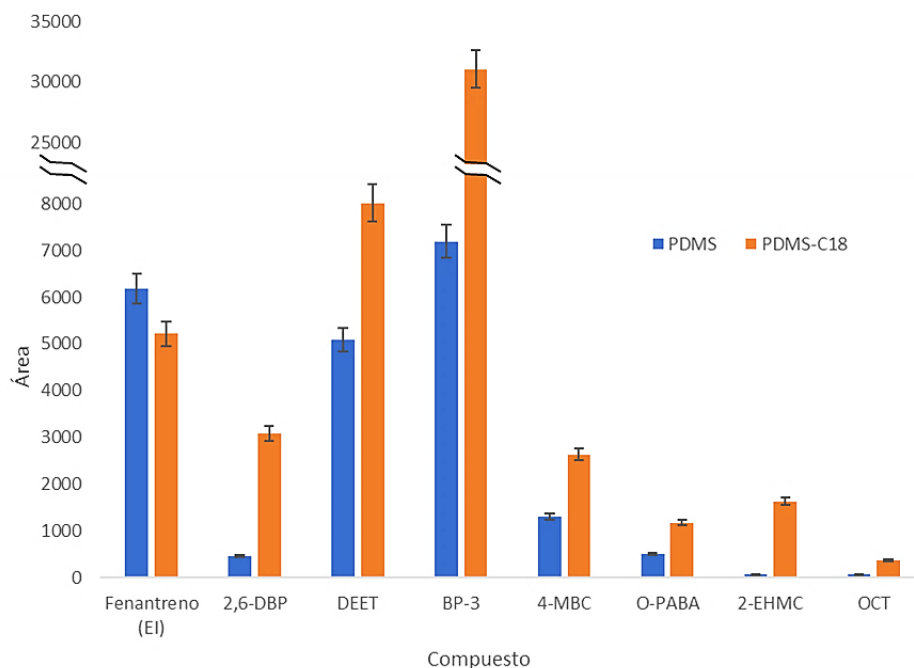
Los resultados del análisis demostraron que la fibra de PDMS-C18 extrae de manera eficiente los analitos de interés con respecto a la fibra de PDMS. Además, presenta menor tendencia a ensuciarse con la muestra, por lo que se eligió esta fibra para el análisis de evaluación del método y muestreo *in vivo*. En la gráfica 4.3 se muestran las diferencias en la cantidad extraída de los analitos por ambas fibras desarrolladas.

En general, se puede observar que la fibra de PDMS-C18 es mejor fase extractante que el PDMS, excepto para el fenantreno. Esto probablemente se debe a que la fase con C18 posee una mayor capacidad de carga, pues las partículas son porosas y, por lo tanto, capaces de captar mayor cantidad de analitos con respecto a la fase de PDMS.

La extracción del fenantreno fue mejor en la fibra de PDMS que en la de PDMS-C18, debido a que en esta no existen cadenas largas de carbono (C18) y, en cambio, existen cadenas de polidimetilsiloxano ( $[(\text{CH}_3)_2\text{SiO}]_n$ ) de longitud variable y con terminaciones vinílicas en las



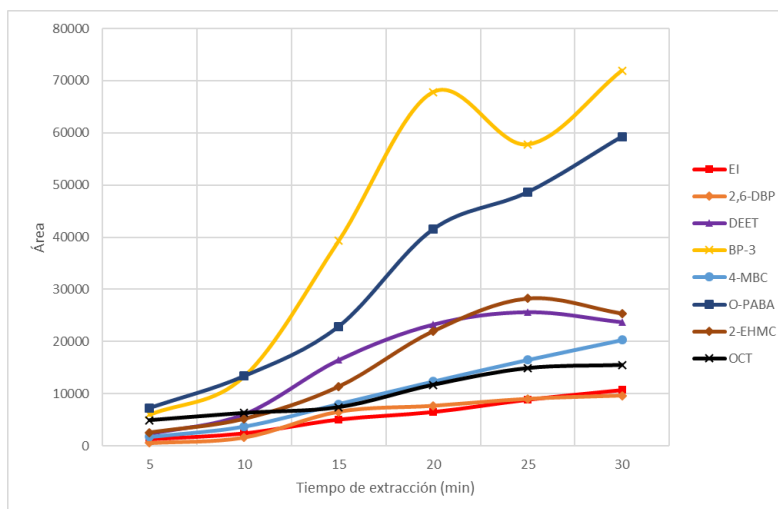
que el sistema  $\pi$  de la estructura del fenantreno puede interactuar más fuerte que con las cadenas lineales del C18.<sup>61</sup>



Gráfica 4.5. Extracción entre la fibra de PDMS y la fibra de PDMS-C18 elaboradas en el laboratorio.

### 4.3.3 Perfil de extracción

El perfil de extracción *in vitro* para los analitos de interés (Gráfica 4.4) se evaluó en tomate cherry fortificado, con la finalidad de encontrar el tiempo más adecuado de extracción, utilizando fibra PDMS-C18. Para la evaluación del método analítico, se eligió un tiempo de extracción de 20 min ya que los analitos 2,6-DBP, DEET, BP-3, O-PABA, 2-EHMC y OCT se encontraron en zona de equilibrio, mientras que el 4-MBC y el estándar interno (fenantreno) estuvieron muy próximos a esta zona, con lo que se asegura que para la mayoría de los compuestos en estudio se extrajo la máxima cantidad de analito en el tiempo elegido.



Gráfica 4.6. Perfil de extracción por SPME *in vitro* de matriz fortificada.

#### 4.3.4 Efecto matriz

En general, el término efecto matriz hace referencia a los fenómenos que ocurren durante la extracción y análisis de una muestra, y podríamos definirlo como la alteración directa o indirecta en la respuesta de un analito dada la presencia de otros compuestos propios de la matriz de trabajo.<sup>62</sup> En algunos casos, la matriz contribuye a reducir al estrés térmico de compuestos termolábiles por enmascaramiento que puede favorecer la transferencia de masa entre el inyector y la columna provocando el aumento de la señal analítica.<sup>63</sup>

Dichos componentes pueden afectar el proceso de ionización en el espectrómetro de masas provocando una magnificación o atenuación en la señal analítica de un determinado compuesto.

El efecto matriz se determinó por comparación de los cromatogramas obtenidos en cada caso. Se puede observar que para todos los filtros UV hubo atenuación de la señal, es decir, el efecto de la matriz fue negativo. Para el retardante de flama se observó incremento en su respuesta, y para el repelente de insectos se observó muy poco efecto matriz (leve atenuación en la señal). Esto lo podemos atribuir a que, por su elevado log P y baja solubilidad, los filtros UV se asociaron preferentemente con la matriz de trabajo (materia orgánica disuelta y sólidos suspendidos del tomate cherry), disminuyendo la transferencia de masa de la matriz a la fibra, es decir, una extracción limitada en comparación con el agua como matriz de referencia.

Por otro lado, es notable que el 2,6-DBP (retardante de flama) incrementa su señal en la matriz de trabajo con respecto al agua. Esto quiere decir que este analito interacciona poco con el tomate cherry y, además, el pH de la matriz (5.8) favorece su extracción, lo que explica que en el agua tipo I no se observe una señal intensa.

Para el caso del DEET, se aprecia que el efecto matriz es una leve atenuación en la señal, comparado con la matriz de referencia. Esto debido posiblemente a su elevada solubilidad ( $0.912 \text{ mg ml}^{-1}$ ) y la poca interacción que puede tener con la materia orgánica disuelta y con los sólidos suspendidos (Imagen 4.7).

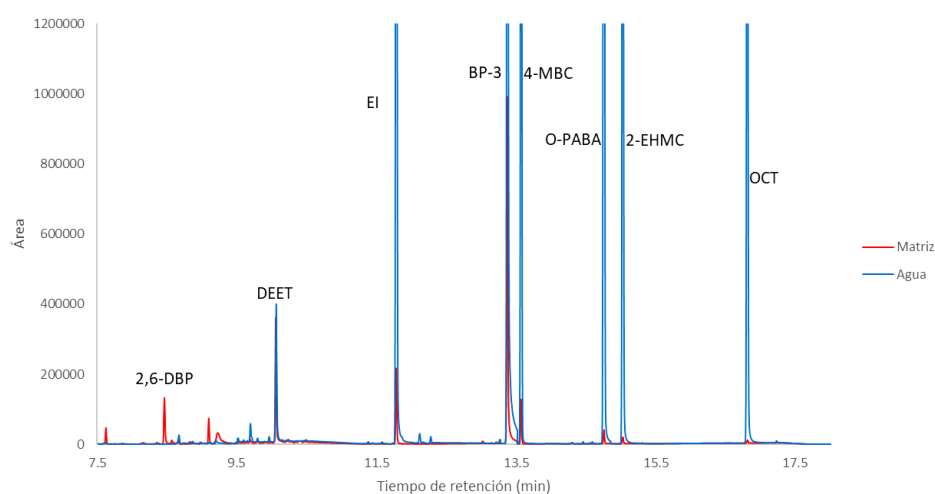


Imagen 4.8. Cromatograma iónico (SIR). Efecto de la matriz de trabajo en los analitos estudiados contra una matriz de referencia (agua tipo I).

### 4.3.5 Evaluación del método analítico

#### 4.3.5.1 Límite de cuantificación (LC) y límite de detección (LD)

Los límites de detección de los analitos se encontraron en el intervalo de  $0.2 - 8 \text{ ng g}^{-1}$ , el límite más bajo fue para el BP-3 ( $0.2 \text{ ng g}^{-1}$ ). Sin embargo, para el OCT, se obtuvo un límite de detección relativamente elevado ( $100 \text{ ng g}^{-1}$ ). Es posible justificar los buenos límites de detección para cada analito por el área superficial que aportan las partículas de C18 en el compuesto obtenido y la afinidad de los compuestos estudiados hacia este, sin embargo, en el caso del OCT, su elevado límite de detección puede explicarse por su baja volatilidad y afinidad por el recubrimiento de la fibra (Cuadro 4.3).

#### **4.3.5.2 Linealidad**

Para todos los compuestos estudiados se observó una tendencia lineal ( $R^2 > 0.9500$ ), exceptuando el OCT ( $R^2 = 0.9197$ ), que se confirmó con un análisis de varianza y con el análisis de los residuales, en los cuales no se encontró tendencia. El cuadro 4.3 muestra la linealidad obtenida de cada analito, representada como  $R^2$ . En el Anexo 2 se presentan las curvas de calibración para cada analito.

#### **4.3.5.3 Repetibilidad**

El cuadro 4.3 muestra la repetibilidad intra e inter-día del método, expresada como el %CV del análisis. En general, se observan coeficientes de variación aceptables (<20%) para los analitos, excepto para el 4-MBC y 2-EHMC con coeficientes de variación de 23 % y 45 %, respectivamente. Lo que puede indicar que estos compuestos interaccionan o se asocian con los componentes de la matriz de trabajo evitando una extracción repetible.

#### **4.3.5.4 Recuperación**

Como se muestra en el cuadro 4.3, por interpolación en la curva de calibración de muestras fortificadas<sup>64</sup>, se obtuvieron recuperaciones aceptables ( $100 \pm 30$  %) para la mayoría de los analitos estudiados, excepto 4-MBC y 2-EHMC, 38 y 34 %, respectivamente, lo que indica que estos compuestos se asocian con los componentes de la matriz de trabajo.

Sin embargo, hay otras maneras de evaluar la recuperación de un método analítico. La prueba de exactitud (o veracidad), expresa la proximidad de un único resultado a un valor de referencia. Entonces, hay tres maneras de evaluar este parámetro:

- a) análisis de materiales de referencia,
- b) experimentos de recuperación utilizando muestras fortificadas
- c) comparación con resultados obtenidos mediante otro método

a) y c) no se aplican ya que no hay material de referencia certificado de tomate para el análisis de los compuestos estudiados en este trabajo y tampoco hay un método normalizado para el análisis de estos compuestos en tomate cherry. Por lo tanto, la opción b) fue la más adecuada.

#### 4.3.5.5 Robustez

Las 3 muestras comerciales de tomate cherry analizadas con la metodología desarrollada mostraron falta de robustez del método. Es decir, aunque la variante continúa siendo “cherry”, características de la matriz como el pigmento y la fisiología del tomate, afectan el desempeño del método. La variedad de tomate cherry amarillo tipo uva identificado como “cherry amarillo” es el que presenta los recobros más bajos para todos los compuestos, excepto para el 4-MBC. Lo que demuestra que para esta matriz los analitos tienen un comportamiento diferente en comparación con la matriz utilizada para desarrollar y validar la metodología (tomate cherry marca “Mr. Lucky”). El cuadro 4.2 muestra la recuperación obtenida para cada tipo de tomate.

Cuadro 4.3. Recuperaciones obtenidas en otras variedades de tomate cherry.

Variedad	Marca	Recuperación (%)						OCT
		2,6-DBP	DEET	BP-3	4-MBC	O-PABA	2-EHMC	
Cherry amarillo	Mercado local	11	29	15	45	30	41	88
Cherry Uva	Sunny Fields	24	39	23	29	53	51	36
Cherry Uva	Nature Sweet	94	90	90	49	84	81	82

#### 4.3.5.6 Análisis de tomates cosechados

Los tomates cosechados de las plantas irrigadas con contaminantes emergentes se analizaron de acuerdo con las metodologías 3.5.5.1.4. y 3.5.4. Los compuestos no se detectaron bajos las condiciones del método validado (Imagen 4.9). Esto era de esperarse, ya que en la extracción por SPME *in vivo* la señal de los compuestos detectados en el cromatograma fue muy pequeña, entonces, cuando se preparó la muestra para su análisis *in vitro*, el efecto de dilución provocó que la concentración de los compuestos estudiados disminuyera aún más y, por lo tanto, no se detectaron por SPME *in vitro*-GC-MS.

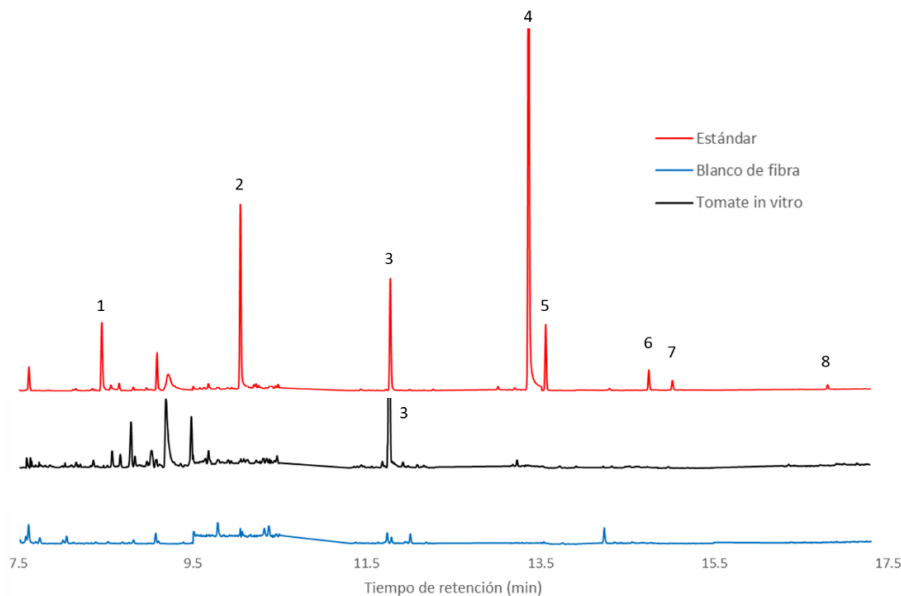


Imagen 4.9 Cromatograma reconstruido (SIR) por SPME *in vitro* -GC-MS de tomate cherry cosechado. 1: 2,6-DBP; 2: DEET; 3: Fenantreno (EI); 4: BP-3; 5: 4-MBC; 6: O-PABA; 7: 2-EHMC; 8: OCT.

#### 4.4 Relación SPME *in vivo* e *in vitro*

En años recientes el muestreo *in vivo* ha adquirido especial atención ya que es posible realizar análisis rápidos de la ausencia o presencia de ciertos componentes en una matriz viva. Para esto, se han desarrollado técnicas como: microfluídica<sup>65</sup>, microdiálisis<sup>66</sup>, biosensores<sup>67</sup> y microextracción en fase sólida *in vivo*<sup>68</sup>, siendo ésta última la más utilizada.

La necesidad para detectar compuestos en matrices biológicas surge a partir de la diseminación de nuevos contaminantes no regulados, que pueden representar un potencial peligro ambiental y a la salud pública.<sup>47</sup>

En este trabajo se realizaron ensayos *in vivo* e *in vitro* con SPME, con la finalidad de determinar contaminantes emergentes en tomate cherry, considerando que este es un tejido semisólido que se ajusta a los requerimientos de la calibración cinética, sin que ésta se desarrolle estrictamente como tal, es decir, sin ejecutar el protocolo que ésta demanda.

Además, la optimización del método de análisis *in vitro* no se hace completamente como tradicionalmente se podría hacer para SPME (diseño experimental optimizando factores como: adición de sal, adición de disolvente, velocidad de agitación, volumen de muestra,

entre otros), tratando de modificar lo menos posible la muestra e intentar hacer una correlación entre los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo* e *in vitro*, considerando que el único efecto que se tiene es el de dilución de sus componentes. Y, por lo tanto, con un muestreo *in vivo* cuantificar los contaminantes presentes en la muestra.

Sin embargo, con los resultados obtenidos tanto *in vivo* como *in vitro*, no fue posible hacer dicha correlación por la diferencia en la detección por SPME *in vivo* y SPME *in vitro*.

En un estudio reciente,<sup>69</sup> se utilizó una calibración *in vitro* por estandarización externa para la determinación de Y13149 e Y12196 (fungicidas) con muestreo *in vivo* en brotes de frijol mungo. De manera breve, se realizó la extracción *in vivo*, se desorbió la fibra en el puerto de inyección del cromatógrafo y las señales de los fungicidas se interpolaron directamente en la curva de calibración externa para obtener la concentración de los analitos. Sin embargo, usando esta correlación, los resultados podrían no ser comparables con el establecimiento de una calibración adecuada, ya que no se determinaron las constantes de muestreo predeterminado o el coeficiente de distribución de los analitos.

En otros estudios,<sup>8,70</sup> se determinaron plaguicidas organoclorados y organofosforados en espinaca malabar (*Basella alba*) utilizando un método de calibración cinética (velocidad de muestreo predeterminada), que es más apropiada para el análisis con SPME *in vivo*, y por lo tanto su cuantificación fue más confiable. Sin embargo, se sugirieron condiciones de crecimiento simplificadas (hidropónicas), que no necesariamente se aproximaron a las condiciones de crecimiento reales de una planta. Lo cual también puede ser cuestionable puesto que los fenómenos de absorción y bioacumulación están determinados por las características de la planta, etapa de desarrollo de la planta, propiedades fisicoquímicas de los analitos, características del suelo y/o medio de crecimiento, y exposición a los compuestos.<sup>5,45,71</sup>

Cuadro 4.3. Resultados de la evaluación para la determinación de contaminantes emergentes en tomate cherry por SPME-GC-MS.

Analito	LD	LC	Intervalo lineal		R <sup>2</sup>	Ecuación	Recobro (%)	Intra-día	Inter-día
	[ng g <sup>-1</sup> ]			CV (%) n = 3				CV (%) n = 3	
2,6-DBP	8	30	30	150	0.9664	y=0.1236x+0.0326	128	21	14
DEET	3	10	10	210	0.9920	y=0.2640x+0.1540	117	15	11
BP-3	0.2	1	1	200	0.9922	y=1.1669x+0.3239	91	25	16
4-MBC	1	5	5	100	0.9712	y=0.1661x+0.1841	38	13	9
O-PABA	5	20	20	180	0.9824	y=0.0401x+0.0271	94	18	10
2-EHMC	5	20	20	180	0.9578	y=0.0304x+0.0723	34	54	35
OCT	100	325	325	725	0.9197	y=0.0025x-0.0008	92	21	18



## CONCLUSIÓN

Los resultados muestran que los procedimientos desarrollados para la fabricación de fibras fueron adecuados para elaborar fibras para SPME siendo, reproducibles, con buena resistencia térmica, química y mecánica para el monitoreo de contaminantes emergentes en organismos vivos. Dichos procedimientos pueden ser ajustados a aplicaciones particulares. Además, representan una alternativa económica a las fibras comerciales en el caso de la fibra de PDMS, debido a que se disminuye el costo en un 99 %. Ver anexo 5.

Las fibras de PDMS-C18 son biocompatibles, novedosas y apropiadas para el análisis *in vivo* de compuestos orgánicos. Debido a que comercialmente no hay una fibra de características equivalentes, no hay referente en términos económicos. Debido a que el adsorbente C18 posee elevada área superficial, incrementa la capacidad de carga de compuestos, lo que extiende su uso en otras matrices para la determinación de una amplia variedad de analitos. En general, los parámetros obtenidos en la evaluación del método analítico por SPME *in vitro*-GC-MS fueron satisfactorios considerando que no se realizó una optimización completa de éste y que, además, es capaz de determinar contaminantes emergentes en un buen intervalo lineal, con límites de detección y cuantificación aceptables.

El tomate cherry fue un modelo biomonitor adecuado para monitorear contaminantes emergentes. puesto que es la hortaliza más importante en el mundo y una de las de mayor valor económico para muchas regiones geográficas.

Es importante tener un método de calibración *in vivo* apropiado para la cuantificación de compuestos emergentes en organismos vivos, puesto que el análisis *in vitro* puede no ser capaz de compensar o predecir los procesos metabólicos que ocurren en un sistema vivo complejo.

## PERSPECTIVAS

- Con la metodología desarrollada para la fabricación de fibras para *in vivo* SPME, obtener nuevas fases extractantes (compósitos con otros materiales de acceso restringido o copolímeros) que permitan determinar otras clases de analitos de manera selectiva.
- Explorar el análisis *in vivo* en otros organismos que sean biomonitores adecuados para la trazabilidad de contaminantes emergentes.
- Explorar la aplicación de las fibras obtenidas en otros sistemas cromatográficos, como la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), que modifiquen la desorción de los analitos de modo que la volatilidad de éstos no sea una limitante en su análisis.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Smith, R. M., Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A* **2003**, *1000* (1), 3-27.
2. Agency, U. E. P., Emerging contaminants: Perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA) fact sheet. **2014**.
3. Dimpe, K. M.; Nomngongo, P. N., Current sample preparation methodologies for analysis of emerging pollutants in different environmental matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *82*, 199-207.
4. Chen, Y.; Guo, Z.; Wang, X.; Qiu, C., Sample preparation. *Journal of Chromatography A* **2008**, *1184* (1), 191-219.
5. Wu, X.; Conkle, J. L.; Ernst, F.; Gan, J., Treated Wastewater Irrigation: Uptake of Pharmaceutical and Personal Care Products by Common Vegetables under Field Conditions. *Environmental Science & Technology* **2014**, *48* (19), 11286-11293.
6. Wu, X.; Conkle, J. L.; Gan, J., Multi-residue determination of pharmaceutical and personal care products in vegetables. *Journal of Chromatography A* **2012**, *1254*, 78-86.
7. Chen, G.; Jiang, R.; Qiu, J.; Cai, S.; Zhu, F.; Ouyang, G., Environmental fates of synthetic musks in animal and plant: An in vivo study. *Chemosphere* **2015**, *138*, 584-591.
8. Qiu, J.; Chen, G.; Zhou, H.; Xu, J.; Wang, F.; Zhu, F.; Ouyang, G., In vivo tracing of organophosphorus pesticides in cabbage (*Brassica parachinensis*) and aloe (*Barbadensis*). *Sci Total Environ* **2016**, *550*, 1134-1140.
9. Serban Moldoveanu, V. D., *Modern Sample Preparation for Chromatography*. 1 ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2015; p 467.
10. Xu, J.; He, S.; Jiang, R.; Zhu, F.; Ruan, J.; Liu, H.; Luan, T.; Ouyang, G., Disposable solid-phase microextraction fiber coupled with gas chromatography-mass spectrometry for complex matrix analysis. *Analytical Methods* **2014**, *6* (13), 4895-4900.
11. Arthur, C. L.; Pawliszyn, J., Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry* **1990**, *62* (19), 2145-2148.
12. Ouyang, G.; Jiang, R., *Solid Phase Microextraction: Recent Developments and Applications*. 1 ed.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 2017.
13. Pawliszyn, J., *Handbook of Solid Phase Microextraction*. 1 ed.; Elsevier: Waterloo, Canada, 2012.
14. Ouyang, G.; Pawliszyn, J., Configurations and calibration methods for passive sampling techniques. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1168* (1), 226-235.
15. Ouyang, G.; Pawliszyn, J., A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction. *Analytica Chimica Acta* **2008**, *627* (2), 184-197.
16. Shirey, R. E., 4 - SPME Commercial Devices and Fibre Coatings. In *Handbook of Solid Phase Microextraction*, 1 ed.; Pawliszyn, J., Ed. Elsevier: Oxford, 2012; pp 99-133.

17. Vuckovic, D.; Zhang, X.; Cudjoe, E.; Pawliszyn, J., Solid-phase microextraction in bioanalysis: New devices and directions. *Journal of Chromatography A* **2010**, *1217* (25), 4041-4060.
18. Liu, S.; Xie, L.; Zheng, J.; Jiang, R.; Zhu, F.; Luan, T.; Ouyang, G., Mesoporous TiO<sub>2</sub> nanoparticles for highly sensitive solid-phase microextraction of organochlorine pesticides. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *878*, 109-117.
19. Li, S.; Lu, C.; Zhu, F.; Jiang, R.; Ouyang, G., Preparation of C18 composite solid-phase microextraction fiber and its application to the determination of organochlorine pesticides in water samples. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *873*, 57-62.
20. Zheng, J.; Liang, Y.; Liu, S.; Jiang, R.; Zhu, F.; Wu, D.; Ouyang, G., Simple fabrication of solid phase microextraction fiber employing nitrogen-doped ordered mesoporous polymer by in situ polymerization. *Journal of Chromatography A* **2016**, *1427*, 22-28.
21. Stevens, M. P., *Polymer Chemistry: An Introduction*. Oxford University Press New York: 1990.
22. Tang, Y.; Xu, J.; Chen, L.; Qiu, J.; Liu, Y.; Ouyang, G., Rapid in vivo determination of fluoroquinolones in cultured puffer fish (*Takifugu obscurus*) muscle by solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta* **2017**, *175*, 550-556.
23. Xu, J.; Luo, J.; Ruan, J.; Zhu, F.; Luan, T.; Liu, H.; Jiang, R.; Ouyang, G., In Vivo Tracing Uptake and Elimination of Organic Pesticides in Fish Muscle. *Environmental Science & Technology* **2014**, *48* (14), 8012-8020.
24. Chong, S. L.; Wang, D.; Hayes, J. D.; Wilhite, B. W.; Malik, A., Sol-gel coating technology for the preparation of solid-phase microextraction fibers of enhanced thermal stability. *Analytical chemistry* **1997**, *69* (19), 3889-3898.
25. Zhang, G.; Zang, X.; Li, Z.; Wang, C.; Wang, Z., Polydimethylsiloxane/metal-organic frameworks coated fiber for solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in river and lake water samples. *Talanta* **2014**, *129*, 600-605.
26. Stokes, D., *Principles and Practice of Variable Pressure/Environmental Scanning Electron Microscopy (VP-ESEM)*. 1 ed.; John Wiley & Sons: USA, 2008.
27. Goldstein, J. I.; Newbury, D. E.; Michael, J. R.; Ritchie, N. W.; Scott, J. H. J.; Joy, D. C., *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*. 3 ed.; Springer: USA, 2017.
28. Zhang, Z.-M.; Li, G.-K., A preliminary study of plant aroma profile characteristics by a combination sampling method coupled with GC-MS. *Microchemical Journal* **2007**, *86* (1), 29-36.
29. Marković, K.; Vahčić, N.; Ganić, K. K.; Banović, M., Aroma volatiles of tomatoes and tomato products evaluated by solid-phase microextraction. *Flavour and Fragrance Journal* **2007**, *22* (5), 395-400.

30. Ortiz-Serrano, P.; Gil, J. V., Quantitation of Free and Glycosidically Bound Volatiles in and Effect of Glycosidase Addition on Three Tomato Varieties (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2007**, *55* (22), 9170-9176.
31. Ortiz-Serrano, P.; Gil, J. V., Quantitative Comparison of Free and Bound Volatiles of Two Commercial Tomato Cultivars (*Solanum lycopersicum* L.) during Ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2010**, *58* (2), 1106-1114.
32. Song, X.-Y.; Ha, W.; Chen, J.; Shi, Y.-P., Application of  $\beta$ -cyclodextrin-modified, carbon nanotube-reinforced hollow fiber to solid-phase microextraction of plant hormones. *Journal of Chromatography A* **2014**, *1374*, 23-30.
33. Wang, L.-b.; Bai, J.; Yu, Z.-f., Difference in volatile profile between pericarp tissue and locular gel in tomato fruit. *Journal of Integrative Agriculture* **2016**, *15* (12), 2911-2920.
34. Wang, L.; Baldwin, E.; Luo, W.; Zhao, W.; Brecht, J.; Bai, J., Key tomato volatile compounds during postharvest ripening in response to chilling and pre-chilling heat treatments. *Postharvest Biology and Technology* **2019**, *154*, 11-20.
35. Wang, L.; Baldwin, E. A.; Zhao, W.; Plotto, A.; Sun, X.; Wang, Z.; Brecht, J. K.; Bai, J.; Yu, Z., Suppression of volatile production in tomato fruit exposed to chilling temperature and alleviation of chilling injury by a pre-chilling heat treatment. *LWT - Food Science and Technology* **2015**, *62* (1, Part 1), 115-121.
36. Cáceres, L. A.; McDowell, T. W.; Scott, I. M.; Hannoufa, A.; McGarvey, B. D.; Tian, L.; Yeung, K. K. C.; Sumarah, M. W., In vivo extraction of volatile organic compounds (VOCs) from Micro-Tom tomato flowers with multiple solid phase microextraction (SPME) fibers. *Canadian Journal of Chemistry* **2014**, *93* (2), 143-150.
37. Musteata, F. M.; Pawliszyn, J., In vivo sampling with solid phase microextraction. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **2007**, *70* (2), 181-193.
38. Ouyang, G.; Vuckovic, D.; Pawliszyn, J., Nondestructive sampling of living systems using in vivo solid-phase microextraction. *Chemical Reviews* **2011**, *111* (4), 2784-2814.
39. Ouyang, G.; Pawliszyn, J., Recent developments in SPME for on-site analysis and monitoring. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2006**, *25* (7), 692-703.
40. Zhang, X.; Oakes, K. D.; Wang, S.; Servos, M. R.; Cui, S.; Pawliszyn, J.; Metcalfe, C. D., In vivo sampling of environmental organic contaminants in fish by solid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2012**, *32*, 31-39.
41. Bai, Z.; Pilote, A.; Sarker, P. K.; Vandenberg, G.; Pawliszyn, J., In Vivo Solid-Phase Microextraction with in Vitro Calibration: Determination of Off-Flavor Components in Live Fish. *Analytical Chemistry* **2013**, *85* (4), 2328-2332.
42. Lin, V. S., Research highlights: natural passive samplers—plants as biomonitors. *Environmental Science: Processes & Impacts* **2015**, *17* (6), 1137-1140.
43. Qing Li, Q.; Loganath, A.; Seng Chong, Y.; Tan, J.; Philip Obbard, J., Persistent Organic Pollutants and Adverse Health Effects in Humans. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* **2006**, *69* (21), 1987-2005.

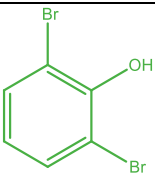
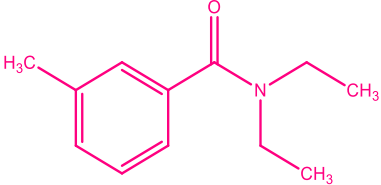
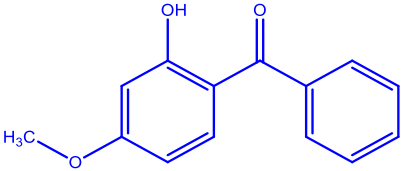
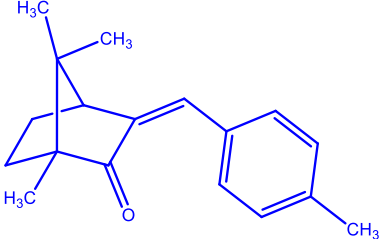
44. Barceló, D., Emerging pollutants in water analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2003**, 22 (10), xiv-xvi.
45. Wu, X.; Dodgen, L. K.; Conkle, J. L.; Gan, J., Plant uptake of pharmaceutical and personal care products from recycled water and biosolids: A review. *Science of The Total Environment* **2015**, 536, 655-666.
46. Sui, Q.; Cao, X.; Lu, S.; Zhao, W.; Qiu, Z.; Yu, G., Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review. *Emerging Contaminants* **2015**, 1 (1), 14-24.
47. Bartrons, M.; Peñuelas, J., Pharmaceuticals and Personal-Care Products in Plants. *Trends in Plant Science* **2017**, 22 (3), 194-203.
48. Miller, E. L.; Nason, S. L.; Karthikeyan, K. G.; Pedersen, J. A., Root Uptake of Pharmaceuticals and Personal Care Product Ingredients. *Environmental Science & Technology* **2016**, 50 (2), 525-541.
49. Goldstein, M.; Shenker, M.; Chefetz, B., Insights into the Uptake Processes of Wastewater-Borne Pharmaceuticals by Vegetables. *Environmental Science & Technology* **2014**, 48 (10), 5593-5600.
50. Ridgway, K.; Lalljie, S. P. D.; Smith, R. M., Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A* **2007**, 1153 (1), 36-53.
51. McNair, H. M.; Miller, J. M., *Basic Gas Chromatography*. 2 ed.; John Wiley & Sons: USA, 2011.
52. Dettmer-Wilde, K.; Engewald, W., *Practical Gas Chromatography*. 1 ed.; Springer-Verlag: Berlin, 2014.
53. Klee, M. S., Chapter 12 - Detectors. In *Gas Chromatography*, Poole, C. F., Ed. Elsevier: Amsterdam, 2012; pp 307-347.
54. Gross, J. H., *Mass Spectrometry: A Textbook*. 2 ed.; Springer-Verlag: USA, 2011.
55. Shrader, S., *Introductory Mass Spectrometry*. 2 ed.; CRC Press: USA, 2013.
56. Olguín Contreras, L. F., Comunicación personal. 2018.
57. Peña-Alvarez, A.; Ramírez-Maya, E.; Alvarado-Suárez, L. Á., Analysis of capsaicin and dihydrocapsaicin in peppers and pepper sauces by solid phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2009**, 1216 (14), 2843-2847.
58. Heredia Roldán, A. C. Preparación de fibras para microextracción en fase sólida y sus posibles aplicaciones en el análisis ambiental. Tesis, UNAM, CDMX, México, 2019.
59. Arlman, E. J.; Wagner, W. M., Volume contraction and conversion in the bulk polymerization of vinylidene chloride and vinyl chloride. *Transactions of the Faraday Society* **1953**, 49 (0), 832-835.
60. Hertz, H. S.; May, W. E.; Wise, S. A.; Chesler, S. N., TRACE ORGANIC ANALYSIS. *Analytical Chemistry* **1978**, 50 (4), 428A-436A.

61. Rabilloud, G., 12 - Adhesives for Electronics. In *Handbook of Adhesives and Surface Preparation*, Ebnesajjad, S., Ed. William Andrew Publishing: Oxford, 2011; pp 259-299.
62. Akutsu, K.; Yoshimitsu, M.; Kitagawa, Y.; Takatori, S.; Fukui, N.; Osakada, M.; Yamaguchi, S.; Kajimura, K.; Obana, H.; Watanabe, T., Evaluation of the matrix-like effect in multiresidue pesticide analysis by gas chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* **2017**, *40* (6), 1293-1300.
63. Poole, C. F., Matrix-induced response enhancement in pesticide residue analysis by gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1158* (1), 241-250.
64. La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos. [https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV\\_guide\\_2nd\\_ed\\_ES.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf).
65. Song, P.; Hu, R.; Tng, D. J. H.; Yong, K.-T., Moving towards individualized medicine with microfluidics technology. *RSC Advances* **2014**, *4* (22), 11499-11511.
66. Heien, M. L.; Khan, A. S.; Ariansen, J. L.; Cheer, J. F.; Phillips, P. E.; Wassum, K. M.; Wightman, R. M., Real-time measurement of dopamine fluctuations after cocaine in the brain of behaving rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2005**, *102* (29), 10023-10028.
67. Jianrong, C.; Yuqing, M.; Nongyue, H.; Xiaohua, W.; Sijiao, L., Nanotechnology and biosensors. *Biotechnology Advances* **2004**, *22* (7), 505-518.
68. Ocaña-Rios, I.; Peña-Alvarez, A.; Zuñiga-Perez, I.; Loeza-Fuentes, E., Trace analysis of UV filters and musks in living fish by in vivo SPME-GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2019**, *411* (14), 3209-3218.
69. Shi, Z.; Chen, D.; Chen, T.-T.; Wei, G.; Yin, C.-Y.; Xu, H.; Yang, G.-F., In vivo analysis of two new fungicides in mung bean sprouts by solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry* **2019**, *275*, 688-695.
70. Qiu, J.; Chen, G.; Xu, J.; Luo, E.; Liu, Y.; Wang, F.; Zhou, H.; Liu, Y.; Zhu, F.; Ouyang, G., In vivo tracing of organochloride and organophosphorus pesticides in different organs of hydroponically grown malabar spinach (*Basella alba* L.). *Journal of Hazardous Materials* **2016**, *316*, 52-59.
71. Collins, C.; Fryer, M.; Grosso, A., Plant Uptake of Non-Ionic Organic Chemicals. *Environmental Science & Technology* **2006**, *40* (1), 45-52.
72. Polo, M.; Llompарт, M.; Garcia-Jares, C.; Gomez-Noya, G.; Bollain, M.-H.; Cela, R., Development of a solid-phase microextraction method for the analysis of phenolic flame retardants in water samples. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1124* (1), 11-21.
73. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N\\_N-Diethyl-3-methylbenzamide](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/N_N-Diethyl-3-methylbenzamide) (accessed 2019).
74. Kameda, Y.; Kimura, K.; Miyazaki, M., Occurrence and profiles of organic sun-blocking agents in surface waters and sediments in Japanese rivers and lakes. *Environmental Pollution* **2011**, *159* (6), 1570-1576.

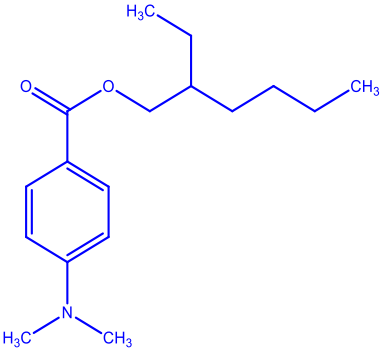
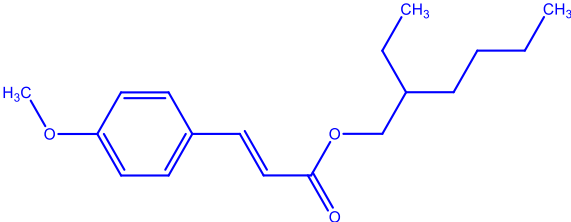
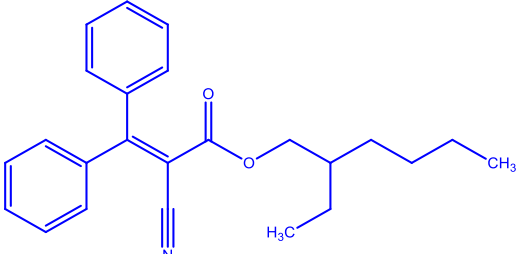


# ANEXOS

**Anexo 1. Cuadro con las propiedades fisicoquímicas de los contaminantes emergentes estudiados**

Nombre IUPAC	Nombre común	Estructura	PM (g mol <sup>-1</sup> )	log K <sub>ow</sub>	pKa	S (mg ml <sup>-1</sup> )
2,6-dibromofenol	2,6-DBP <sup>72</sup>		251.9	3.36	6.67	0.119
N,N-dietil-3-metilbenzamida	DEET <sup>73</sup>		191.3	2.02	-	0.912
2-hidroxi-4-metoxibenzofenona	Oxibenzona (BP-3) <sup>74</sup>		228.2	3.79	7.6	130
(3Z)-1,7,7-trimetil-3-[(4-metilfenil)metiliden]biciclo[2.2.1]heptan-2-ona	4-MBC <sup>74</sup>		254.4	5.5	-	17



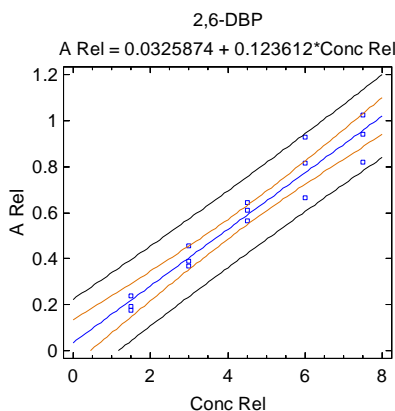
Nombre IUPAC	Nombre común	Estructura	PM (g mol <sup>-1</sup> )	log K <sub>ow</sub>	pKa	S (μg ml <sup>-1</sup> )
2-etilhexil-4-(dimetilamino)benzoato	Padimato-O (O-PABA) <sup>74</sup>		277.4	5.8	-	4.7
2-etilhexil ( <i>E</i> )-3-(4-metoxifenil)prop-2-enoato	2-EHMC <sup>74</sup>		290.4	5.8	-	0.155
2-etilhexil-2-ciano-3,3-difenilacrilato	Octocrileno (OCT) <sup>74</sup>		361.5	6.9	-	0.36

PM: peso molecular; Kow: constante de reparto octanol agua; Ka: constante de acidez; S: solubilidad en agua a 25 °C.

## Anexo 2. Estadísticos de regresión lineal.

El análisis de regresión lineal se realizó con el software STATGRAPHICS Centurion XV Ver. 15.2.05.

Se presentan las curvas de calibración relativas obtenidas para cada analito. Se establecen las hipótesis;  $H_0: m = 0$ ,  $H_1: m \neq 0$ . Dado que el valor-P es menor que 0.05 para la pendiente (m) podemos decir que existe una relación estadísticamente significativa entre la concentración relativa (X) y el área relativa (Y) con un nivel de confianza del 95 %, por lo tanto, se rechaza  $H_0$ . Esto indica que los datos obtenidos se ajustan a un modelo lineal.



1

### Coefficientes

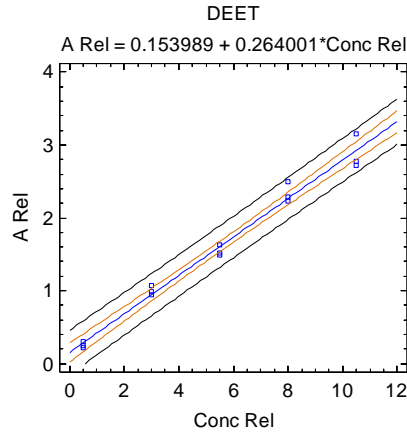
Parámetro	Mínimos Cuadrados Estimado	Estándar Error	Estadístico T	Valor-P
Intercepto	0.0325874	0.0453614	0.718393	0.4852
Pendiente	0.123612	0.00911799	13.5569	0.0000

2

### Análisis de Varianza

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1.03139	1	1.03139	183.79	0.0000
Residuo	0.0729534	13	0.0056118		
Total (Corr.)	1.10435	14			

3

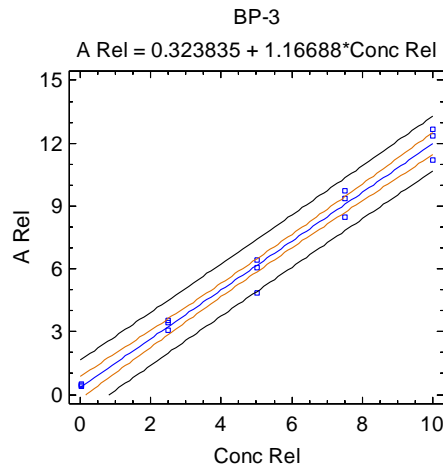


**Coefficientes**

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	0.153989	0.06084	2.53105	0.0251
Pendiente	0.264001	0.0093051	28.3716	0.0000

**Análisis de Varianza**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	13.0681	1	13.0681	804.95	0.0000
Residuo	0.211051	13	0.0162347		
Total (Corr.)	13.2791	14			

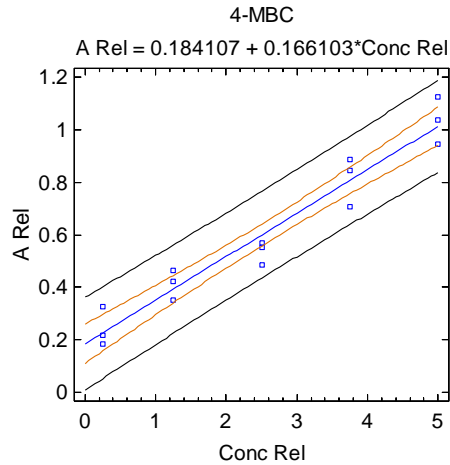


**Coefficientes**

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	0.323835	0.249387	1.29853	0.2167
Pendiente	1.16688	0.0407244	28.653	0.0000

**Análisis de Varianza**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	253.265	1	253.265	820.99	0.0000
Residuo	4.01033	13	0.308487		
Total (Corr.)	257.276	14			

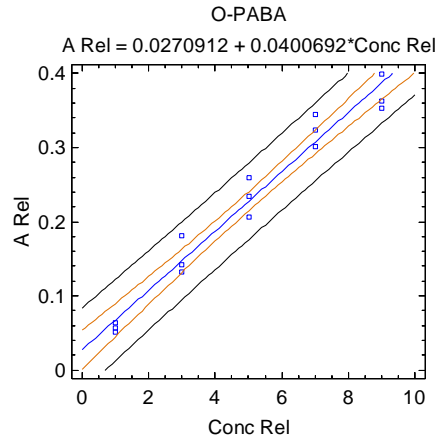


**Coefficientes**

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	0.184107	0.0346478	5.31368	0.0001
Pendiente	0.166103	0.0113084	14.6885	0.0000

**Análisis de Varianza**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	1.19397	1	1.19397	215.75	0.0000
Residuo	0.0719417	13	0.00553398		
Total (Corr.)	1.26591	14			

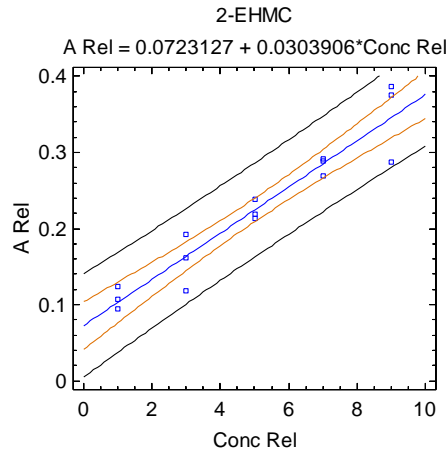


**Coefficientes**

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	0.0270912	0.0121512	2.2295	0.0440
Pendiente	0.0400692	0.00211526	18.9429	0.0000

**Análisis de Varianza**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.192665	1	0.192665	358.83	0.0000
Residuo	0.00697994	13	0.000536918		
Total (Corr.)	0.199644	14			

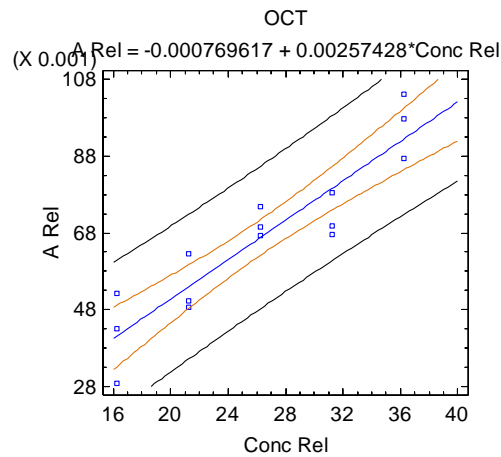


**Coefficientes**

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	0.0723127	0.0145357	4.97485	0.0003
Pendiente	0.0303906	0.00253034	12.0105	0.0000

**Análisis de Varianza**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.11083	1	0.11083	144.25	0.0000
Residuo	0.00998806	13	0.000768312		
Total (Corr.)	0.120818	14			



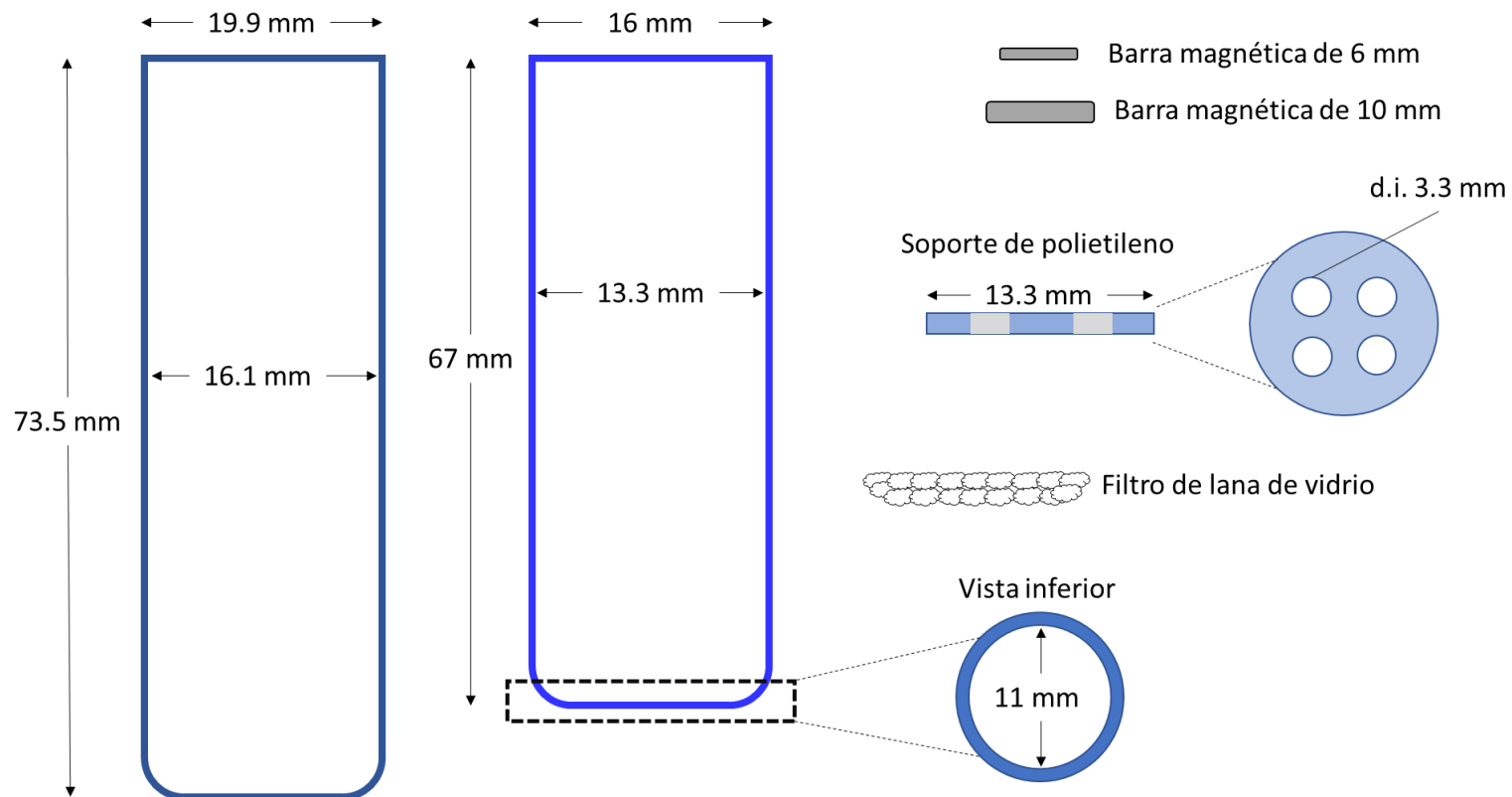
**Coefficientes**

	Mínimos Cuadrados	Estándar	Estadístico	
Parámetro	Estimado	Error	T	Valor-P
Intercepto	-0.000769617	0.00828436	-0.0929001	0.9274
Pendiente	0.00257428	0.000304732	8.4477	0.0000

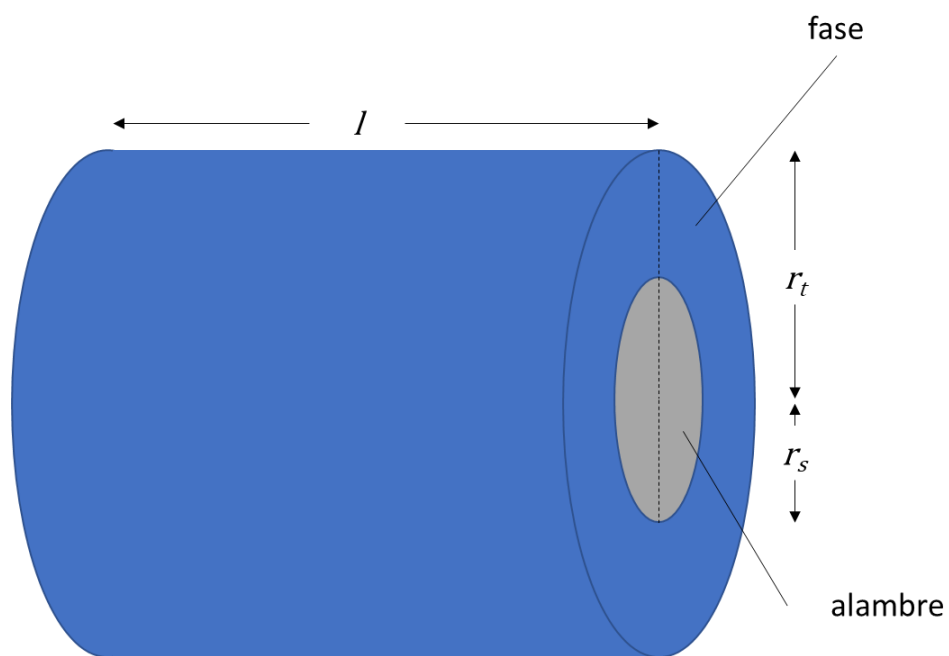
**Análisis de Varianza**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.00497021	1	0.00497021	71.36	0.0000
Residuo	0.000905401	13	0.0000696462		
Total (Corr.)	0.00587561	14			

### Anexo 3. Dispositivo de filtrado y extracción modificado



#### Anexo 4. Cálculo del volumen de fase



$$V = \pi l r_t^2 - \pi l r_s^2$$

$$V = \pi (15 \text{ mm}) (0.1435 \text{ mm})^2 - \pi (15 \text{ mm}) (0.1016 \text{ mm})^2$$

$$V = 0.4839 \text{ mm}^3 \sim 0.5 \mu\text{L}$$

**Anexo 5. Relación de costos. Fibras fabricadas vs fibras comerciales.**

<b>Insumo</b>	<b>Fibra de PDMS*</b>	<b>Fibra de PDMS- C18**</b>	<b>Fibra comercial Supelco®*</b>
	<b>Costo (MXN)</b>		
Alambre de acero inoxidable	1.66	1.66	
Fase extractante	0.0025	0.08	15680
Tubing de PTFE	0.50	0.50	
Sello de PDMS	0.10	0.10	
Aguja cal. 22G	1.20	1.20	
<b>TOTAL</b>	<b>3.50</b>	<b>3.54</b>	<b>15680</b>

**\*Comparación entre fibras de PDMS con características equivalentes**

**\*\*Fibra sin referente comercial**



## Anexo 6. Prueba de apareamiento de datos.

Se compararon las áreas relativas de cada fibra (intra-fibra e inter-fibra) para determinar si había diferencia significativa ( $\alpha = 0.05$ ).

	PDMS			C18		
	Intra fibra	Inter fibra	Diferencia	Intra fibra	Inter fibra	Diferencia
2,6-DBP	0.0054066	0.0034488	-0.001958	0.0027458	0.0029564	0.0002106
DEET	0.0052095	0.0053458	0.0001363	0.005694	0.0052971	-0.000397
BP-3	0.191203	0.1995856	0.0083826	0.2771674	0.2699972	-0.00717
4-MBC	0.6373823	0.6131363	-0.024246	0.7459272	0.7800167	0.0340895
O-PABA	0.1261625	0.1295339	0.0033714	0.1877472	0.1993952	0.011648
2-EHMC	0.0773978	0.0855622	0.0081643	0.1249515	0.1310802	0.0061287
OCT	0.0156371	0.0236144	0.0079773	0.0396593	0.0401098	0.0004505
		Xd	0.0002612		Xd	0.0064229
		Sd	0.0115699		Sd	0.0135301
		<b>to</b>	<b>0.0597222</b>		<b>to</b>	<b>1.2559678</b>

$$H_0: X_d = 0, H_1: X_d \neq 0$$

$$t_o = \frac{X_d \sqrt{n}}{S_d}$$

$$\tau = 7-1 = 6$$

$$t_c = 2.45$$

Como  $t_o < t_c$  para ambas fibras,  $H_0$  se acepta. Por lo tanto, no hay diferencias significativas.