



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“Determinación de hidrocarburos aromáticos
policíclicos en tejido de mantarraya gigante
mediante cromatografía de gases”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

DAVID OLGUÍN LUNA

ASESOR:

Dr. José de Jesús Olmos Espejel

Cuautitlán Izcalli Estado de México, 2018



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

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

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

Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en tejido de mantarraya gigante mediante cromatografía de gases.

Que presenta el pasante: **David Olgún Luna**

Con número de cuenta: **304243266** para obtener el Título de la carrera: **Química Farmacéutico Biológica.**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 31 de agosto de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q.F.B. Elia Granados Enríquez	
VOCAL	M. en C. Miriam Aide Castillo Rodríguez	
SECRETARIO	Dr. José de Jesús Olmos Espejel	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Iván Santillán Cano	
2do. SUPLENTE	Dra. Berenice Gómez Zaleta	

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

LMCF/cga*

Investigación financiada mediante DGAPA-UNAM a través del proyecto PAPIIT

Clave IA204717

Este trabajo de tesis se desarrolló en los laboratorios L-112 y Laboratorio de Cromatografía de gases de la Nave 3000 FES Cuautitlán Campo 1, y en la Unidad de Gestión Ambiental de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México

Parte de este trabajo se presentó en:

XXXI Congreso Nacional de Química Analítica realizado del 11 al 15 de junio de 2018 en el Centro de Negocios Universidad-UAEH. Se otorgó el primer lugar en el concurso de trabajos libres estudiantiles en la modalidad cartel.

Cuarto Congreso de Ciencia, Educación y Tecnología realizado en las instalaciones de la FESC Campo 1 del 19 al 22 de junio de 2018. Se otorgó el segundo lugar en la sección de Ciencias Químicas en la modalidad cartel.

Agradecimientos

A Dios, por tener la salud y fortaleza que me han permitido llegar hasta este momento de la vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México en especial a la FES Cuautitlán Campo ,
mi alma mater.

Gracias a mis padres por apoyarme en todo momento, por su paciencia y comprensión. Han sido para mí un gran ejemplo de trabajo, humildad, de dedicación y unión en situaciones difíciles de la vida. Todo el esfuerzo hecho por ustedes ha valido mucho la pena. Estoy muy agradecido y muy orgulloso de mis padres. A mis hermanos con quienes compartí gran parte de mi vida siempre los voy a querer. Sin el apoyo de mi familia este trabajo nunca se hubiera escrito.

Expreso total agradecimiento a mi asesor de tesis de licenciatura, Dr. José de Jesús Olmos Espejel, por la dirección de este trabajo, así como por todo el conocimiento brindado, recursos, consejos y todas las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis. Es un gran ejemplo de profesionalismo y de entrega a su labor en la investigación, pero sobre todo es una persona con gran calidad humana.

De forma muy especial le agradezco a la M. en C. Irán Ocaña Ríos por su apoyo en el análisis cromatográfico y el pretratamiento de las muestras que permitieron la realización de este trabajo, el tiempo y los recursos brindados son invaluable.

A la Dra. Irma Cruz Gavilán por el apoyo brindado y la confianza para mi participación en el proyecto.

Muchas gracias a la profesora Q.F.B. Elia Granados Enríquez por haber permitido realizar mi servicio social y por todo el conocimiento adquirido en las materias que tuve oportunidad de cursar con usted.

A la Q.F.B. Daniela Nava Preciado quiero expresarle mi más sincero agradecimiento por haberme enseñado a apreciar más la química analítica y a tener una visión más amplia de las cosas, el tiempo que compartimos lo atesoro mucho, eres muy especial para mí.

A mis mejores amigos Nayely Franco Martínez y Pablo Antonio Pérez García, les agradezco mucho porque con ustedes compartí momentos memorables en esta importante etapa.

A las personas que formaron parte de este camino y que por alguna razón ya no se encuentran, muchas gracias por haber compartido parte de su valioso tiempo, sin duda alguna influyeron en mi crecimiento personal y profesional.

A mis sinodales: Q.F.B. Elia Granados Enríquez, M. en C. Miriam Castillo Rodríguez, Q.F.B. Iván Santillán Cano y Dra. Berenice Gómez Zaleta, gracias por el tiempo y apoyo brindado para realizar las correcciones de este trabajo.

“Por mi raza hablará el espíritu.”

Goya, goya, cachun cachun rara, cachun cachun rara, goya, UNIVERSIDAD

Índice

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	VI
ABREVIATURAS	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
RESUMEN	4
OBJETIVO GENERAL.....	5
OBJETIVOS PARTICULARES.....	5
CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES	6
1.1 Características del organismo en estudio	6
1.2 hábitat de <i>M. birostris</i>	7
1.3 importancia del estudio de <i>M. birostris</i>	9
1.4 Características de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.....	10
1.4.1 Fuentes de origen	10

1.4.2 Propiedades Fisicoquímicas de los HAPs	11
1.4.3 Riesgos a la salud de los seres vivos	13
1.5 Dispersión de Matriz en Fase Sólida.....	17
1.5.1 Procedimiento general de la DMFS	18
1.5.2 Factores a considerar en una extracción DMFS.....	20
1.6 Cromatografía de Gases	21
1.6.1 Instrumentación general para cromatografía de gases	23
1.6.2 Cromatografía de gases con acoplamiento a espectrometría de masas (CG-EM)	29
1.6.3 Empleo del método de estándar interno en cromatografía de gases.....	33
1.7 Metodologías recientes para el análisis de HAPs en muestras de organismos marinos 33	
CAPÍTULO 2 METODOLOGÍA.....	38
2.1 Reactivos, materiales y equipos	38
2.2 Sistemas cromatográficos utilizados	39
2.3 Muestra.....	40

2.4 Preparación de las disoluciones estándar.....	40
2.5 Acondicionamiento y almacenamiento de los adsorbentes.....	41
2.6 optimización de la separación cromatográfica CG-DIF.	43
2.7 Metodología para la validación del sistema cromatográfico por CG- DIF.	44
2.7.1 Linealidad.....	44
2.7.2 Repetibilidad.	44
2.7.3 Límites de detección y cuantificación	44
2.8 Extracción de HAPS en muestras de músculo de mantarraya mediante Dispersión de Matriz en Fase Sólida	45
2.9 Validación del método de extracción y análisis por DMFS y CG-DIF.	46
2.9.1 Linealidad del método y exactitud (recobro).	46
2.9.2 Repetibilidad.	47
2.9.3 Límites de detección y cuantificación	47
2.10 Condiciones para la separación cromatográfica CG-EM	47
2.11 Análisis de las muestras de <i>M. birostris</i>	48
CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50

3.1 Optimización de la separación cromatográfica CG-DIF.	50
3.2 Validación del sistema de Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de Flama (CG-DIF) para el análisis de HAPs.....	53
3.3 Evaluación del Efecto Matriz en la determinación de los HAPs por CG- FID.....	54
3.4 Optimización de la extracción por DMFS.	56
3.5 Validación del método de extracción por Dispersión de Matriz en Fase sólida y análisis por Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de Flama (DMFS-CG-FID).....	61
3.6 Optimización de la separación cromatográfica CG-EM	62
3.7 Análisis de muestras <i>M.birostris</i> provenientes del archipiélago de Revillagigedo.....	64
CONCLUSIONES	68
PERSPECTIVAS DEL TRABAJO	68
ANEXO I.....	69
ANEXO II.....	80
REFERENCIAS.....	82

Índice de figuras

Figura 1 <i>Manta birostris</i> en San Benedicto	6
Figura 2 Corrientes superficiales en el Océano Pacífico Oriental	8
Figura 3 Ubicación de <i>M. birostris</i> en Indonesia (A) y pacifico mexicano (B)	8
Figura 4 Buzo acercándose a <i>M. birostris</i> en actividades recreativas en el archipiélago de Revillagigedo	10
Figura 5 Molécula del 1-metilnaftaleno, un sistema de anillos sustituido.....	12
Figura 6 Fórmulas estructurales de algunos HAPs de estudio.....	12
Figura 7 Representación gráfica de la técnica de DMFS.....	20
Figura 8 Principales componentes de un cromatografo de gases. DIF= Detector de ionización de flama.....	23
Figura 9 Representación gráfica del tipo de inyección <i>split</i> (con división).....	25
Figura 10 Representación gráfica del tipo de inyección <i>splitless</i> (sin división).....	26
Figura 11 Cromatógrafo de gases. DIF= Detector de ionización de flama marca ThermoScientific	28
Figura 12 Diagrama del sistema CG-EM acoplado	31
Figura 13 Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas marca Perkin Elmer utilizado en el desarrollo de esta tesis	32
Figura 14 Ejemplar de <i>M. Californicus</i> del Archipiélago de Revillagigedo.	40
Figura 15 Esquema general de la metodología experimental	42
Figura 16 Condiciones para la separación de los HAPs por DMFS.....	46
Figura 17 Cromatograma de la inyección en modo <i>split</i> de una disolución estándar de tridecano (E.I.) a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ y HAPs a $40 \mu\text{g mL}^{-1}$	50

Figura 18 Cromatogramas obtenidos de la mezcla de HAPs a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente inyectados en modo <i>split</i> (color azul) y <i>splitless</i> (color rojo) al intervalo de tiempo 5 a 15 minutos	52
Figura 19 Cromatogramas obtenidos de la mezcla de HAPs a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente inyectados en modo <i>split</i> (color azul) y <i>splitless</i> (color rojo) al intervalo de tiempo 15 a 24 minutos	53
Figura 20 Cromatogramas obtenidos de la disolución de mezcla de estándares de Tridecano (E.I.) y HAPs (A) a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ y una muestra fortificada a $0.333 \mu\text{g mg}^{-1}$ (B) respectivamente, al intervalo de tiempo de 5 a 10 minutos	59
Figura 21 Cromatogramas obtenidos de la disolución de mezcla de estándares de Tridecano y HAPs (A) a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ y una muestra fortificada a $0.333 \mu\text{g mg}^{-1}$ (B) respectivamente, al intervalo de tiempo de 10 a 15 minutos.....	59
Figura 22 Cromatogramas obtenidos de la disolución de mezcla de estándares de Tridecano (E.I.) y HAPs (A) a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ y una muestra fortificada a $0.333 \mu\text{g mg}^{-1}$ (B) respectivamente, al intervalo de tiempo de 15 a 20 minutos	60
Figura 23 Cromatogramas obtenidos de la disolución de mezcla de estándares de Tridecano (E.I.) y HAPs (A) a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ y una muestra fortificada a $0.333 \mu\text{g mg}^{-1}$ (B) respectivamente, al intervalo de tiempo de 20 a 24 minutos	60
Figura 24 Cromatograma TIC de una disolución estándar de HAPs a $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$	64
Figura 25 Cromatograma de un extracto de músculo de <i>M. birostris</i> (MG67).	65
Figura 26 Concentraciones de HAPs en 4 muestras diferentes de músculo de mantarraya <i>M. birostris</i>	66
Figura 27 Espectros de masas de los analitos de interés en la sección 1 del cromatograma.	69

Figura 28 Espectro de masas del Naftaleno en blanco fortificado a 1 ppm	69
Figura 29 Espectro de masas del 2- Metil naftaleno en blanco fortificado a 1 ppm	70
Figura 30 Espectro de masas del 1- Metil naftaleno en blanco fortificado a 1 ppm	70
Figura 31 Espectros de masas de los analitos de interés en la sección 2 del cromatograma.	71
Figura 32 Espectro de masas del Acenaftileno en blanco fortificado a 1 ppm.....	71
Figura 33 Espectro de masas del Acenafteno en blanco fortificado a 1 ppm.....	72
Figura 34 Espectro de masas del Fluoreno en blanco fortificado a 1 ppm.....	72
Figura 35 Espectro de masas del Fenantreno en blanco fortificado a 1 ppm	73
Figura 36 Espectro de masas del Antraceno en blanco fortificado a 1 ppm.....	73
Figura 37 Espectros de masas de los analitos de interés en la sección 3 del cromatograma.	74
Figura 38 Espectro de masas del Fluoranteno en blanco fortificado a 1 ppm	74
Figura 39 Espectro de masas del Pireno en blanco fortificado a 1 ppm.....	75
Figura 40 Espectro de masas del Benzo(a)antraceno en blanco fortificado a 1 ppm	75
Figura 41 Espectro de masas del Criseno en blanco fortificado a 1 ppm.....	76
Figura 42 Espectros de masas de los analitos de interés en la sección 4 del cromatograma.	76
Figura 43 Espectro de masas del benzo(b)fluoranteno en blanco fortificado a 1 ppm.....	77
Figura 44 Espectro de masas del benzo(k)fluoranteno en blanco fortificado a 1 ppm.....	77
Figura 45 Espectro de masas del benzo(a)pireno en blanco fortificado a 1 ppm	78
Figura 46 Espectro de masas del Indeno(1,2,3,c,d)pireno en blanco fortificado a 1 ppm....	78
Figura 47 Espectro de masas del dibenzo(a,h)antraceno en blanco fortificado a 1 ppm.....	79
Figura 48 Espectro de masas del benzo(g,h,i)perileno en blanco fortificado a 1 ppm.....	79

Índice de tablas

Tabla 1 Propiedades fisicoquímicas de los HAPs	14
Tabla 1 Propiedades fisicoquímicas de los HAPs. (Continuación)	15
Tabla 1 Propiedades fisicoquímicas de los HAPs. (Continuación)	16
Tabla 2 Métodos recientes de análisis de HAPs en muestras de organismos marinos	35
Tabla 2 Métodos recientes de análisis de HAPs en muestras de organismos marinos. (Continuación)	36
Tabla 2 Métodos recientes de análisis de HAPs en muestras de organismos marinos (Continuación)	37
Tabla 3 Programa de temperatura del horno del CG-DIF	43
Tabla 4 Programa de temperatura del horno del CG-EM.....	48
Tabla 5 Condiciones para el análisis por SIM de PAHs en los extractos.....	49
Tabla 6 Orden de elución de los HAPs y del Estándar Interno	51
Tabla 7 Resultados de la validación del sistema de CG-DIF con disoluciones estándar	55
Tabla 8 Resultados del efecto matriz entre la disolución estándar de HAPs y muestras fortificadas de músculo de mantarraya <i>M. californicus</i>	56
Tabla 9 Condiciones de extracción y análisis por CG-DIF para musculo de mantarraya <i>M.</i> <i>californicus</i>	58
Tabla 10 Resultados de la validación del método DMFS-CG-DIF para los HAPs en muestras de músculo de mantarraya <i>M. californicus</i> fortificadas.....	62
Tabla 11 Resultados del análisis de HAPs en muestras de <i>M. birostris</i>	66

Abreviaturas

HAPs: hidrocarburos aromáticos policíclicos.

COPs: contaminantes orgánicos persistentes.

EPA: agencia de protección ambiental.

ACN: acetonitrilo.

ppm: partes por millón.

ppb: partes por billón.

tr: tiempo de retención.

g/s: gramos sobre segundo.

eV: electrón volt.

m/z: relación masa carga.

uma: unidad de masa atómica.

TIC: cromatograma de iones totales (por sus siglas en inglés).

SIM: monitoreo de iones seleccionados (por sus siglas en inglés).

CG: cromatografía de gases.

CG-DIF: cromatografía de gases con detector de ionización de flama.

CG-EM: cromatografía de gases con acoplamiento a espectrometría de masas.

E.I: estándar interno.

C.V%: coeficiente de variación porcentual.

L.D: límite de detección.

L.D: límite de cuantificación.

S/N: relación señal ruido (por sus siglas en inglés).

EFS: extracción en fase sólida.

DMFS: dispersión de matriz en fase sólida.

QhEChERS: rápido, fácil, barato, eficaz, robusto y seguro (por sus siglas en inglés).

GPC: cromatografía de permeación en gel (por sus siglas en inglés).

SPE: extracción en fase sólida

(por sus siglas en inglés).

HS-SPME: microextracción en

fase sólida en espacio de cabeza

(por sus siglas en inglés).

SBSE: extracción por sorción con

barras magnéticas agitadoras

(por sus siglas en inglés).

Nap: naftaleno.

Acy: Acenaftileno.

Ace: Acenafteno.

Flo: floureno.

Phe: Fenantreno.

Ant: antraceno.

Pyr: Pireno.

Fla: flouranteno.

BaA: benzo(a)antraceno.

Chy: criseno.

BbF: benzo(b)flouranteno.

BkF: benzo(k)flouranteno.

BaP: benzo(a)pireno.

IcdP: indeno(1,2,3-c,d)pireno.

DahA: dibenzo(a,h)antraceno.

BghiP: benzo(g,h,i)perileno.

Introducción

El archipiélago de Revillagigedo es un área natural en el pacífico mexicano que se caracteriza por poseer una rica diversidad en flora y fauna y que actualmente se encuentra protegido por las leyes mexicanas, se ha convertido en un gran refugio para muchas especies incluyendo las marinas como la mantarraya gigante *M. birostris* considerada un ícono y principal atractivo turístico de la región. El buceo turístico es la principal actividad realizada y la que genera una importante derrama económica. Del mismo modo, existe un claro interés en el ámbito científico, principalmente para monitorear los patrones de comportamiento de la *M. birostris* lo que ha dado lugar a establecer su hábitat natural, migraciones y ciclo de vida. Ha sido tal el interés, que la determinación de contaminantes orgánicos persistentes como los HAPs en estas especies marinas fueron el objetivo de estudio de este trabajo. [1]

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) son un grupo de contaminantes conocido como COPs (Contaminantes Orgánicos Persistentes) que se caracterizan por ser hidrofóbicos y por su toxicidad debido a que presentan actividad mutagénica y carcinogénica. Estos contaminantes pueden encontrarse de forma natural en erupciones volcánicas o incendios forestales pero también pueden presentarse por la influencia de la actividad humana a partir de actividades que generan combustiones incompletas de materia orgánica o las descargas de desechos en los diferentes ecosistemas, tal es el caso del marino.

Existen una amplia cantidad de trabajos donde se reporta la presencia y los niveles de concentración de los HAPs en diversos organismos marinos de varias partes del mundo, la mayoría abarcan especies de consumo humano como mejillones, salmón, crustáceos y peces endémicos. Sin embargo, no existen antecedentes donde se informe sobre la presencia de

dichos contaminantes en mantarraya *M. birostris* por lo que este trabajo de tesis representa un importante estudio para iniciar a evaluar el impacto de la contaminación sobre dicha especie.

Las investigaciones más recientes enfocan sus metodologías de preparación de muestra con una marcada tendencia por el respeto al medio ambiente, así como la simplicidad y la miniaturización para disminuir tiempo y costo de los análisis. [21-32]

En ese sentido, en el presente trabajo se aborda el desarrollo de una metodología analítica para la extracción de HAPs en muestras de músculo de mantarraya *M. birostris* utilizando como método de extracción a la Dispersión de Matriz en Fase Solida (DMFS) y como técnica de análisis la Cromatografía de gases con detector de ionización de flama (CG-DIF) y Cromatografía de gases con acoplamiento a espectrometría de masas (CG-EM).

En el capítulo uno se presentan los antecedentes teóricos del trabajo como la descripción y la importancia del organismo marino estudiado, las propiedades de los analitos de interés, la descripción de la muestras utilizada para el análisis, los fundamentos básicos del método de extracción y de la técnica de análisis. También se aborda una revisión general de algunos trabajos publicados recientemente que se relacionan con el tema de esta tesis.

En el capítulo dos se presentan las condiciones experimentales que se desarrollaron para optimizar el método de extracción y análisis de los HAPs, así como las condiciones de análisis de las muestras reales.

En el capítulo tres se presentan y discuten los resultados más relevantes del trabajo abarcando desde la optimización de la separación cromatográfica de los analitos en el sistema hasta la

aplicación del método de extracción para el análisis de las muestras de *M. birostris* provenientes del Archipiélago de Revillagigedo.

Finalmente en el capítulo cuatro se presentan las conclusiones y las perspectivas de este trabajo de acuerdo a los resultados obtenidos.

Resumen

En el presente trabajo se monitoreó la presencia de 18 HAPs incluyendo a los 16 prioritarios de acuerdo a la Agencia de protección Ambiental de Estados Unidos de América (EPA) en muestras de músculo de mantarraya gigante *M. birostris* seguida de un análisis por CG-DIF. Para la validación del método se utilizaron muestras de músculo de mantarraya *M. californicus* que permitieron la cuantificación de los contaminantes.

Para la extracción de los HAPs se desarrolló un método por Dispersión de Matriz en Fase Solida (DMFS) optimizando las cantidades de dos adsorbentes sólidos (C18 y florisil) y la elución probando diferentes disolventes y volúmenes. El método de cuantificación empleado fue por curva de calibración con estándar interno. A excepción de los analitos (naftaleno, 2-metilnaftaleno y 1-metilnaftaleno), el método desarrollado presentó buena sensibilidad en 15 HAPs con límites de detección entre 0.015 y 0.071 $\mu\text{g mg}^{-1}$ y recobros globales entre 71.37 – 102.08 %.

La metodología de extracción se extrapoló para aplicarse en conjunto con la Cromatografía de Gases Acoplada a Espectrometría de Masas (CG-EM) permitiendo analizar 18 diferentes muestras de *M. birostris* y determinar la presencia de acenaftileno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno y benzo[a]pireno en 4 de ellas.

Se espera que esta metodología sea utilizada para un muestreo más exhaustivo en los organismos del Archipiélago de Revillagigedo y de otros sitios y así poder obtener información que permita determinar el estado en el que se encuentran los organismos de *M. birostris*.

Objetivo general

Desarrollar una metodología analítica para la extracción de HAPs en muestras de músculo de mantarraya gigante *M. birostris* mediante Dispersión de Matriz en Fase Solida y su determinación por Cromatografía de Gases con acoplamiento a Espectrometría de Masas que permita el monitoreo de muestras provenientes del Archipiélago de Revillagigedo.

Objetivos Particulares

- Determinar las condiciones óptimas para la separación cromatográfica de los analitos con detector DIF.
- Realizar la validación del sistema cromatográfico para el análisis cualitativo de los compuestos en estudio.
- Optimizar las condiciones de extracción de los HAPs en músculo de mantarraya *M. californicus* mediante la técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida.
- Realizar la validación del método de DMFS desarrollado.
- Determinar las condiciones óptimas para la separación cromatográfica de los HAPs por CG-EM.
- Analizar y cuantificar las muestras de músculo de mantarraya *M. birostris* provenientes del Archipiélago de Revillagigedo para poder monitorear muestras de otros individuos de mantarrayas.

Capítulo 1 Antecedentes

1.1 Características del organismo en estudio.

La *Manta birostris* es una mantarraya gigante cuyo cuerpo es aplanado similar a un romboide, generalmente de color negro con manchas blancas y con una cola delgada similar a un látigo. En la figura 1 se presenta una fotografía de este organismo. Esta especie puede llegar a medir hasta 7 metros de punta a punta de las aletas que le dan una característica única y se le puede encontrar en aguas tropicales y subtropicales. [1]



Figura 1 *Manta birostris* en San Benedicto. [2]

La dieta de *M. birostris* consiste de poblaciones superficiales de zooplancton, siendo ésta la principal fuente de alimento de dicha especie. [3]

Las hembras de la mantarraya gigante maduran sexualmente alrededor de los 13 años y una vez alcanzada dicha etapa llega a tener una o dos crías que se desarrollan dentro de su cuerpo por alrededor de un año. La mantarraya gigante puede llegar a vivir más de 50 años. A menudo se le encuentra en la superficie del agua navegando de forma lenta y elegante, están acostumbradas a la presencia humana, específicamente nadan alrededor de buzos y presentan

un comportamiento amistoso por lo que son muy apreciadas para el desarrollo de diferentes actividades turísticas como el buceo. [1]

1.2 Hábitat de *M. birostris*.

M. birostris es una especie ícono del archipiélago de Revillagigedo el cual se encuentra en el océano pacífico oriental a unos 390 km al suroeste del extremo sur de la península de Baja California sur, y abarca entre 720 a 970 km al oeste de la parte continental de México. El archipiélago está compuesto por cuatro islas remotas: Isla San Benedicto, Isla Socorro, Isla Roca Partida e Isla Clarión. El área abarca alrededor de 636,684 hectáreas e incluye un área marina protegida que se extiende a 12 millas náuticas alrededor de cada una de las islas. Una zona de amortiguamiento rectangular rodea las cuatro islas y las profundidades oceánicas dentro de la zona alcanzan los 3700 m. El archipiélago forma parte de una cadena de montañas submarinas con las cuatro islas que representan los picos de los volcanes que emergen sobre el nivel del mar.

El archipiélago se sitúa en una área de convergencia de dos regiones biogeográficas marinas: la del pacífico nororiental y el pacífico oriental. Específicamente, se encuentra en la zona donde se mezclan las corrientes de California y de Ecuador, generando una zona de transición compleja y altamente productiva. Debido a su ubicación, el Archipiélago de Revillagigedo influye en la conectividad dentro del océano pacífico tropical y sus islas son reconocidas como paradas de diversas especies migratorias. [2]

En la figura 2 se muestra un esquema de las direcciones de las corrientes que convergen cerca del Archipiélago de Revillagigedo.

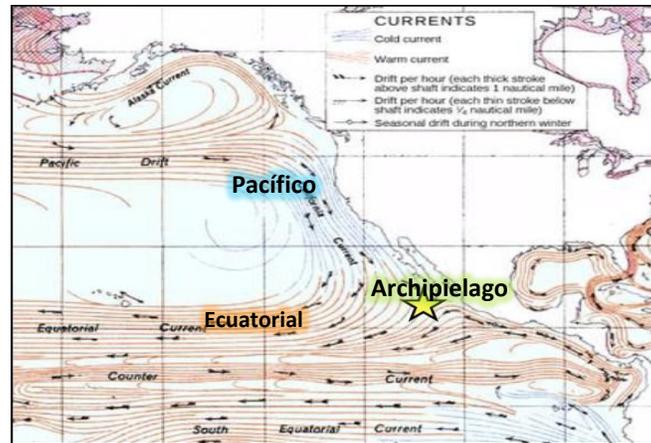


Figura 2 Corrientes superficiales en el Océano Pacífico Oriental. [4]

De acuerdo a estudios de seguimiento de larga duración utilizando rastreadores satelitales, se sabe que las mantas gigantes no realizan largas migraciones y que de las nueve mantas gigantes marcadas en México (cuatro en Bahía banderas y cinco en el Archipiélago de Revillagigedo) ninguna migró hacia otra región siendo que éstas poblaciones están separadas por aproximadamente 600 km, dicho comportamiento se presenta de igual forma en poblaciones de Indonesia como se representa en la figura 3. Las zonas oscuras a claras representan el 95%, 75% y 50% de probabilidad de que *M. birostris* pase su tiempo de vida. [5]

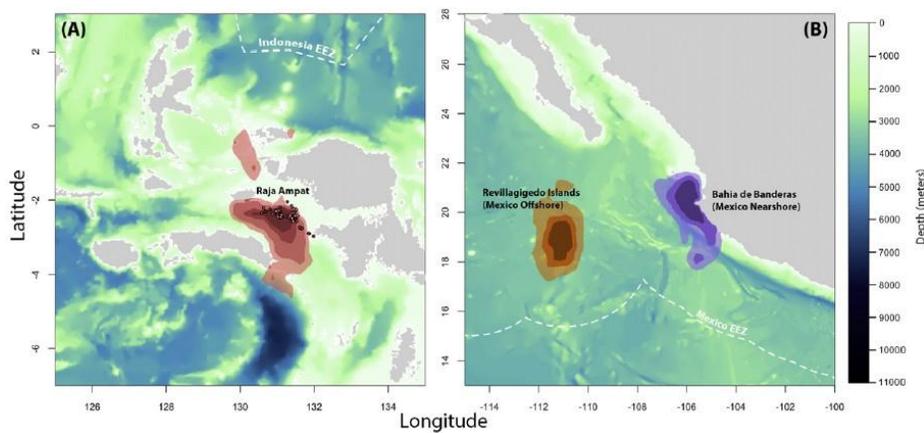


Figura 3 Ubicación de *M. birostris* en Indonesia (A) y pacifico mexicano (B) [5]

1.3 Importancia del estudio de *M. birostris*.

El archipiélago de Revillagigedo fue declarado Área Natural Protegida y Reserva de la Biosfera Mexicana en 1994. Además, también fue designado como un humedal de importancia internacional por la Convención de Ramsar en 2004. [2] El aislamiento y la protección que se le ha dado al lugar lo ha convertido en un gran refugio para muchas especies marinas como la *M. birostris*, la cual se ha convertido en un importante atractivo turístico de la región, ya sea para bucear cerca de ellas como se aprecia en la figura 4 ó para realizar investigaciones sobre sus patrones de migración y ciclo de vida.

Anualmente el negocio del buceo turístico deja una derrama económica por cerca de 14 millones de dólares anuales e incrementan los números conforme pasan los años, es preciso señalar que más de la mitad de los turistas que visitan el Archipiélago únicamente van con la intención de apreciar a la *M. birostris*, por lo que se ha convertido en la principal atracción natural de dicho lugar.

A pesar de los esfuerzos para proteger a la *M. birostris* de las amenazas ésta sigue siendo muy endeble por la pesca directa e indirecta que realiza el humano, ya que muchas veces no se obedece el perímetro permitido para dicha actividad, el desconocimiento de la importancia a nivel turístico y científico de dicho organismo ha hecho dañar sus poblaciones en México y el mundo. [1]

Así mismo, la *M. birostris* y otras especies marinas enfrentan un problema de contaminación ya que podrían ser afectados por la llegada de desechos flotantes del Gran Parche de Basura del Pacífico, así como por los desechos provenientes de las costas desde Panamá hasta

México. [4] Interacciones de los desechos con la *M. birostris* podrían ocasionar daños de tipo físico y químico. El estudio de este último es el principal interés en el presente trabajo.



Figura 4 Buzo acercándose a *M. birostris* en actividades recreativas en el archipiélago de Revillagigedo. [6]

1.4 Características de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.

1.4.1 Fuentes de origen.

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) son compuestos orgánicos que se producen por combustiones incompletas o procesos a presiones altas y están ampliamente dispersos en el ambiente.

Naturalmente, los HAPs están presentes cuando se producen incendios forestales y erupciones volcánicas pero la mayoría de estos compuestos se generan en procesos tales como:

- Quema de combustibles como carbón, madera, petróleo y sus derivados.
- Quema de desperdicios, llantas usadas, polipropileno, poliestireno.
- Refinación de petróleo.
- Producción de coque.
- Vehículos motores.

Debido a la presencia de los HAPs en la atmósfera por los procesos antes mencionados, los más pesados (más de cuatro anillos aromáticos) tienden a adsorberse a las partículas en suspensión, mientras que los más ligeros (menos de cuatro anillos) permanecen gaseosos hasta que se eliminan por las precipitaciones pluviales. [7]

Además, los HAPs pueden ser encontrados en el agua en concentraciones bajas debido a su baja solubilidad, lo que da lugar a acumulaciones en sedimentos y organismos acuáticos. Una de las principales fuentes de contaminación de los ecosistemas marinos son los desechos generados por el humano que son descargados en las corrientes del Pacífico Norte y la del Ecuador, lo que podría dar lugar a la presencia de HAPs en organismos como la *M. birostris*.

1.4.2 Propiedades Físicoquímicas de los HAPs.

Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) son compuestos orgánicos cuya estructura consiste de dos o más anillos aromáticos formados a partir de átomos de carbono e hidrógeno y pueden estar sin sustituir o sustituidos. En la figura 5 se muestra un HAP sustituido. [8]

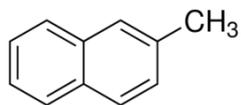


Figura 5 Molécula del 1-metilnaftaleno, un sistema de anillos sustituido [7]

La configuración de los anillos puede representar diferencias en las propiedades de cada compuesto ya que muchos de los HAPs tienen la misma estructura molecular pero diferente ordenamiento como se aprecia en la figura 6.

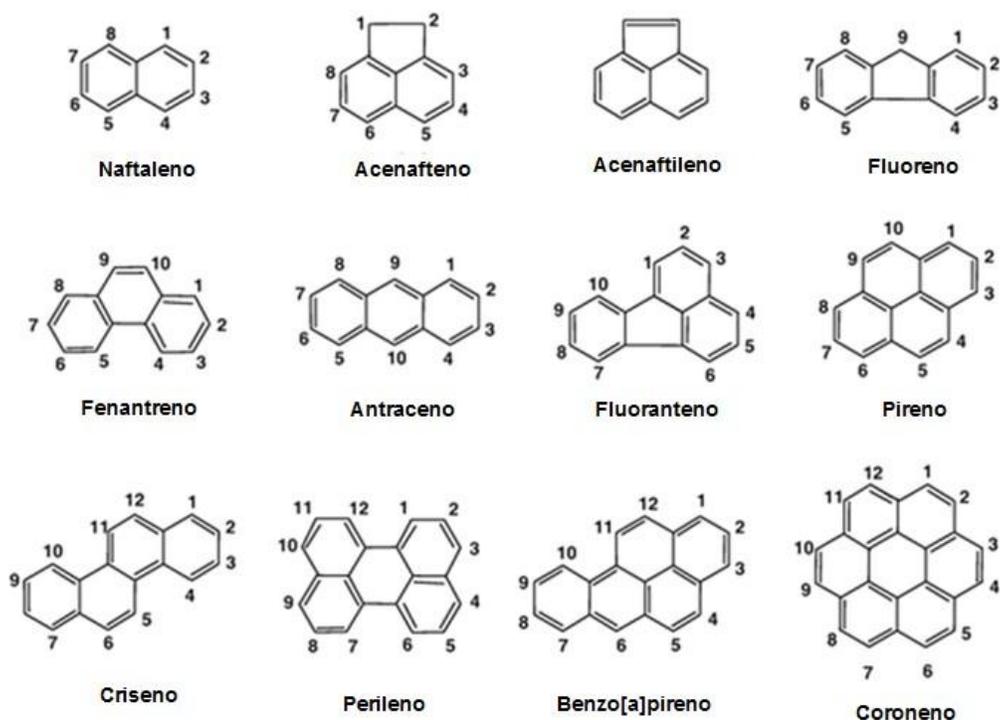


Figura 6 Fórmulas estructurales de algunos HAPs de estudio [9]

Los HAPs se presentan como moléculas semivolátiles o bien como moléculas con puntos de ebullición elevados y se pueden encontrar en forma gaseosa, en partículas suspendidas en el ambiente o en una mezcla de ambos, esta característica puede dar lugar a la acumulación de dichos compuestos en suelos, plantas o en diversos ecosistemas. [8]

En general los HAPs son compuestos orgánicos de naturaleza lipofílica, presentan una débil solubilidad en agua y son fotosensibles, ya que al estar en contacto con la luz pierden estabilidad fotoquímica y pueden llegar a degradarse. [10]

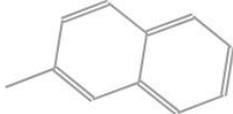
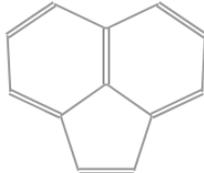
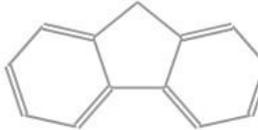
En la tabla 1 se presentan las propiedades fisicoquímicas de los HAPs estudiados en esta tesis.

1.4.3 Riesgos a la salud de los seres vivos.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los HAPs pueden ser encontrados en aire, suelo, agua e incluso alimentos, existen alrededor de 500 de estos compuestos que han sido detectados. Sin embargo, solo 16 HAPs son considerados como prioritarios para su monitoreo de acuerdo a la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América (EPA por sus siglas en inglés) y son: Naftaleno (Nap), Acenafteno (Ace), Acenaftileno (Acy), Fluoreno (Flo), Antraceno (Ant), Fenantreno (Phe), Fluoranteno (Fla), Pireno (Pyr), Benzo[a]antraceno (BaA), Criseno (Chy), Benzo[b]fluoranteno (BbF), Benzo[k] fluoranteno (BkF), Benzo[a]pireno (BaP), Dibenzo[a,h]antraceno (DahA), Benzo[g,h,i] Perileno (BghiP), Indeno[1,2,3-cd]pireno (IcdP). El BaP se considera como el principal marcador carcinogénico y genotóxico de toda la familia de HAPs. [8]

Las principales formas de exposición a los HAPs en general son: inhalación de aire contaminado, ingesta de alimentos carbonizados, contacto dérmico o por la combinación de estas formas de exposición. De acuerdo con datos de estudios realizados en animales, la cantidad absorbida va a depender del medio de transporte en el que se encuentren los HAPs así como las vías de exposición antes mencionadas. [7]

Tabla 1 Propiedades fisicoquímicas de los HAPs [11]

No.	Analito	Solubilidad (soluble en:)	logP	Estructura	Toxicidad
1	Naftaleno	Etanol, metanol, benceno, tolueno, cloroformo. Muy soluble en éter.	3.30		C, M, G
2	2-metilnaftaleno	Etanol y éter.	3.86		
3	1-metilnaftaleno	Muy soluble en etanol y éter. Soluble en Benceno	3.87		
4	Acenaftileno	Muy soluble en etanol, éter, benceno. Ligeramente soluble en cloroformo	3.93		M, G
5	Acenafteno	Etanol, metanol, propanol, cloroformo, benceno y tolueno.	3.92		
6	Fluoreno	Etanol caliente, acetona, éter etílico, benceno, disulfuro de carbono	4.18		M, G

C = Cancerígeno, M = Mutagénico, G = Genotóxico

Tabla 2 Propiedades fisicoquímicas de los HAPs. (Continuación)

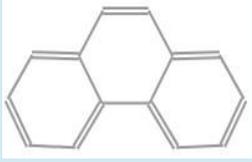
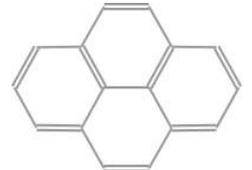
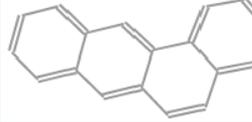
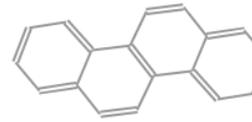
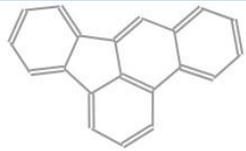
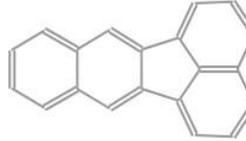
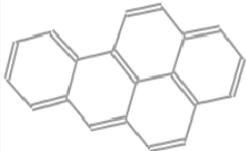
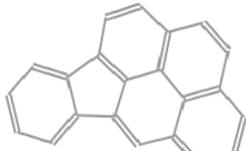
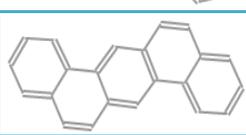
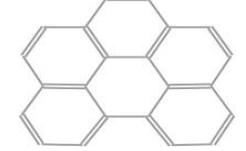
No.	Analito	Solubilidad	logP	Estructura	Toxicidad
7	Fenantreno	Etanol, etanol absoluto, tolueno, tetracloruro de carbono, éter anhidro	4.46		M, G
8	Antraceno	Etanol absoluto, metanol, benceno, cloroformo, éter, disulfuro de carbono.	4.45		C, M, G
9	Fluoranteno	Etanol, éter, benceno, cloroformo, disulfuro de carbono.	5.16		C, M, G
10	Pireno	Etanol, éter etílico, benceno, tolueno	4.88		M, G
11	Benzo(a)antraceno	Éter, etanol, acetona, benceno.	5.76		C, M
12	Criseno	Éter etílico, acetona, benceno, disulfuro de carbono	5.73		C, M, G
C = Cancerígeno, M = Mutagénico, G = Genotóxico					

Tabla 3 Propiedades fisicoquímicas de los HAPs. (Continuación)

No.	Analito	Solubilidad	logP	Estructura	Toxicidad
13	Benzo(b)fluoranteno	Benceno, ligeramente soluble en acetona.	5.78		C
14	Benzo(k)fluoranteno	Etanol, benceno y ácido acético.	6.11		C
15	Benzo(a)pireno	Muy soluble en cloroformo. Soluble en benceno, tolueno, xileno y éter.	6.13		C, M, G
16	Indeno(1,2,3-c,d)pireno	La mayoría de los solventes orgánicos.	6.70		C
17	Dibenzo(a,h)antraceno	Acetona, benceno, disulfuro de carbono, éter de petróleo, tolueno, xileno.	6.50		C
18	Benzo(g,h,i)perileno	1,4-dioxano, diclorometano, benceno, acetona.	6.63		
C = Cancerígeno, M = Mutagénico, G = Genotóxico					

Debido a su naturaleza lipofílica, los HAPs pueden acumularse en la leche materna y el tejido adiposo. Sin embargo, la excreción biliar y urinaria de los HAPs es relativamente eficiente debido a la amplia distribución de las enzimas que transforman los HAPs en metabolitos polares.

Diversos estudios han demostrado la carcinogenicidad de algunos HAPs en animales. Los principales tipos de cáncer reportados y que han tenido mayor incidencia en los organismos expuestos son cáncer de piel, cáncer de pulmón, vejiga, hígado y estómago, evidencia del riesgo que representa la exposición a los HAPs. [7]

De esta forma, la determinación de HAPs en *M. birostris* podría brindar un mejor panorama sobre la contaminación en ecosistemas marinos y el impacto no sólo en la manta gigante sino en otras especies que incluso podrían estar disponibles para el consumo humano.

1.5 Dispersión de matriz en fase sólida.

La Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) es una técnica de preparación, extracción y fraccionamiento de muestras sólidas, semisólidas, viscosas e incluso muestras líquidas y se aplica para la determinación de contaminantes orgánicos ambientales, fármacos, pesticidas y otros compuestos químicos. [12]

El fundamento de la DMFS consiste en homogenizar en un mortero de ágata o de vidrio la muestra con el agente dispersante con el propósito de disgregar la muestra y generar una nueva fase. La selectividad de la técnica depende básicamente de la naturaleza del agente dispersante y de las propiedades del solvente utilizado para la elución. La mayoría de los procedimientos emplean adsorbentes de carácter lipofílico tipo C18.

Las ventajas de la DMFS con respecto a los métodos clásicos de extracción son:

- Menor proceso de manipulación de la muestra.
- Elimina la formación de emulsiones.
- Disminuye el consumo de solventes ya que se puede miniaturizar.
- Aumenta la eficiencia de la extracción debido a la gran exposición del material al agente extractante.
- Es más amigable con el medio ambiente.

A pesar de que no existe un método universal de preparación de muestra porque dicho criterio depende de la naturaleza de la matriz, la naturaleza de los analitos y la medición final, la DMFS se ha convertido en uno de los métodos de extracción más utilizados en los últimos años debido a su flexibilidad, selectividad y versatilidad en la determinación de compuestos químicos de matrices complejas como la de los organismos marinos. En el presente trabajo se utilizó dicha técnica para la extracción de HAPs en tejido de músculo de *M. birostris* [13]

1.5.1 Procedimiento general de la DMFS.

El procedimiento básico para la DMFS consta de tres pasos los cuales a continuación se describen:

I) Dispersión de la muestra en el adsorbente

La muestra se coloca en un mortero de preferencia de ágata o de vidrio, se adiciona el adsorbente sólido y con la ayuda del pistilo se dispersa la muestra en el soporte sólido de tal forma que la nueva fase sea homogénea y uniforme.

II) Empaquetamiento de la columna de dispersión

Cuando se completa la mezcla se transfiere a una columna de vidrio, en cartuchos de acero inoxidable o en cartuchos para Extracción en Fase Solida (EFS) donde se coloca un filtro (frit) o un tapón de lana de vidrio silanizada en la parte inferior que permita contener la mezcla. Un segundo filtro se coloca en la parte superior de la fase y se comprime con la ayuda de un émbolo de jeringa. La compresión no debe ser completa y debe evitarse la compactación con el propósito de que el disolvente de extracción pueda interactuar al máximo con los analitos.

Adicionalmente, se puede incorporar una co-columna de otro tipo de materiales sólidos dentro de la columna de dispersión, esta adición ayuda considerablemente a la limpieza de los interferentes de la matriz eliminándolos así al mismo tiempo en que se realiza la extracción de los analitos de interés.

III) Elución de los analitos

La extracción de los analitos se realiza con el disolvente adecuado dependiendo las características de los analitos de interés. Generalmente el flujo del paso del disolvente por la columna ocurre por gravedad, aunque también se puede aplicar presión manteniendo un flujo adecuado, lo ideal es permitir la formación de la gota en la salida de la columna. El extracto obtenido se puede someter a un proceso de evaporación para la posterior reconstitución de los analitos o bien someter el extracto a otra técnica de limpieza si es necesario. [14]

En la figura 7 se muestra un esquema general de la DMFS.

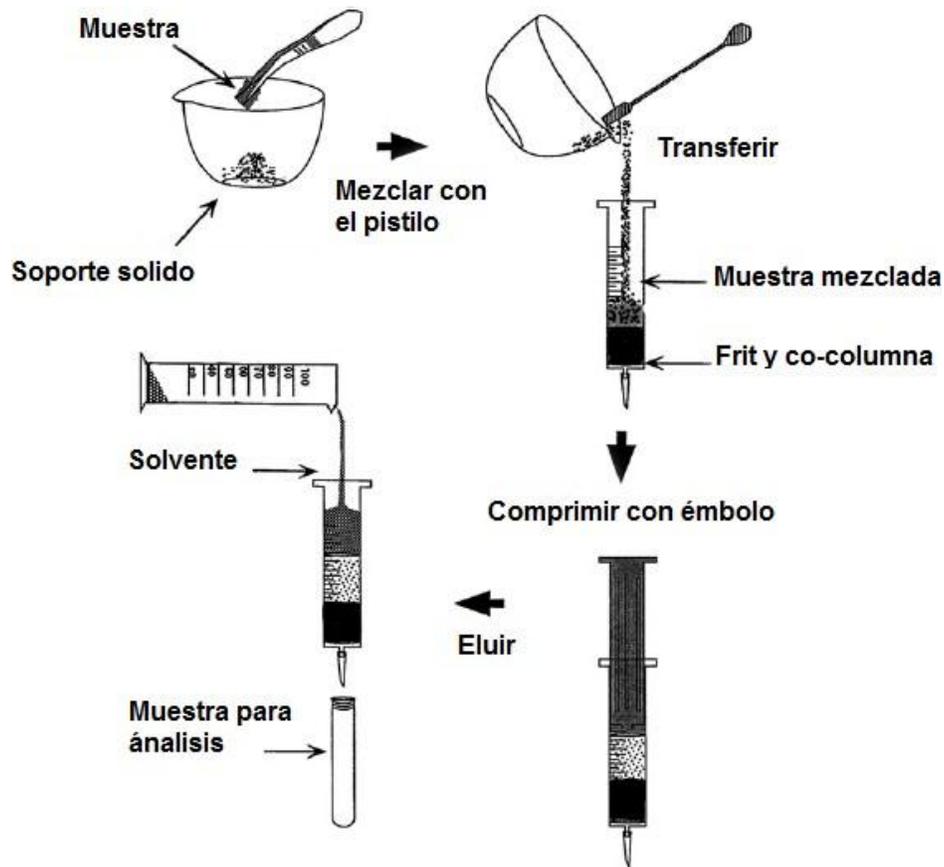


Figura 7 Representación gráfica de la técnica de DMFS [14]

1.5.2 Factores a considerar en una extracción DMFS.

Entre los factores que influyen en el desempeño de la DMFS se encuentran:

- **Naturaleza de la muestra:** la interacción que existe entre la muestra, el adsorbente y el disolvente es un factor a considerar ya que es probable que puedan eluir algunos de los componentes de la matriz lo que podría ocasionar un efecto matriz. Conocer la naturaleza de la muestra permite saber cuál adsorbente es el adecuado como soporte así como el disolvente de extracción para un mejor análisis. [14]

- Elección del adsorbente: existen diferentes tipos de adsorbentes, los hidrofóbicos, hidrofílicos, de intercambio iónico y los adsorbentes mixtos, dependiendo del estudio que se realice y de las propiedades de los analitos se elige el más adecuado. La mayoría de los métodos reportados han demostrado que los adsorbentes C18 Y C8 (Adsorbentes hidrofóbicos) o materiales de fase reversa son los más utilizados, su carácter lipofílico se cree que facilita la dispersión y retención de las entidades lipófilas. [15]
- Relación muestra-adsorbente: la proporción más utilizada es 1:4, por ejemplo 0.5 g de muestra por 2.0 g de adsorbente respectivamente, aunque puede llegar a variar y deberá ser examinada como una variable durante el desarrollo del método de extracción. [14]
- Elección del disolvente de extracción: La naturaleza del disolvente es un factor importante ya que los analitos de interés deben ser desorbidos eficientemente mientras que la mayor parte de los componentes restantes de la matriz deberán permanecer en la columna. En general la elección del disolvente está determinada principalmente por la polaridad de los analitos de estudio y la naturaleza de la matriz de la muestra. [15]

1.6 Cromatografía de gases.

La cromatografía de gases (CG) fue introducida por J. P. Martin y L. M. Synge en 1941 quienes sostuvieron que la fase móvil no tenía que ser necesariamente un líquido para llevar a cabo la separación en muestras complejas. En 1951, el mismo Martin publicó un trabajo donde describió el primer cromatógrafo de gases y a partir de ese año se reconoció la importancia de esta técnica principalmente en la industria petroquímica a partir de la cual se fue expandiendo a otras áreas.

En general, todas las técnicas cromatográficas tienen el mismo fundamento, el cual consiste en una separación basada en la distribución diferencial de los componentes de una mezcla entre dos fases, una estacionaria y otra móvil, cuando son arrastrados por la fase móvil que se desplaza a través de la fase estacionaria. La combinación de los dos efectos, el arrastre de los componentes por la fase móvil y su retención por la fase estacionaria con transferencia repetitiva de los componentes entre ambas fases, conduce a la separación por migración diferencial.

En cromatografía de gases la separación se basa en las diferencias de los puntos de ebullición de los analitos y sus interacciones con la fase estacionaria que permite separar compuestos de forma más completa. Es una técnica bien establecida para separar compuestos volátiles, así como para compuestos de pesos moleculares entre 400 y 500 uma o bien con presión de vapor mayores a 10 mm de Hg y puntos de ebullición hasta de casi 300 a 400 °C.

Dado que el gas acarreador (fase móvil) disminuye la presión de vapor y las concentraciones inyectadas en cromatografía de gases son pequeñas se pueden determinar compuestos semivolátiles que se volatilizan por encima de las temperaturas antes mencionadas. Normalmente los puntos de ebullición de los compuestos a una presión atmosférica de 1 (bar) se pueden encontrar en la literatura lo cual ayuda en la predicción de los órdenes de elución de los compuestos de interés. [16]

1.6.1 Instrumentación general para cromatografía de gases.

Los principales componentes de un cromatógrafo de gases se muestran en la figura 8.

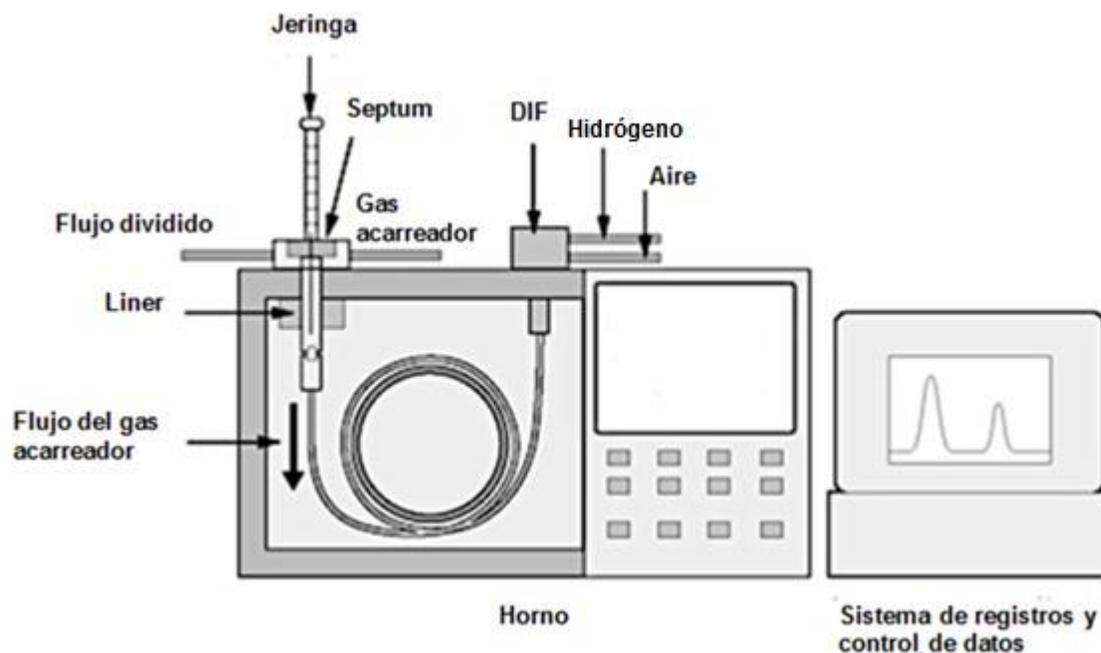


Figura 8 Principales componentes de un cromatógrafo de gases. DIF= Detector de ionización de flama.

Gas acarreador: cumple la función de transportar los componentes de la muestra a lo largo de la columna, se calienta mediante su paso por el exterior del portal de inyección antes de llegar a la columna para evitar condensaciones de los componentes en el mismo. El gas acarreador se presenta en cilindros de gas y el flujo se controla mediante reguladores de doble paso que disponen de dos manómetros, el primero indica la presión del cilindro y el segundo la presión del gas acarreador. Las características principales que deben cumplir los gases son: elevada pureza, inertes químicamente respecto a los componentes de la muestra, a los materiales de la columna y del cromatógrafo, además de que no generen respuesta o que

ésta sea mínima en el detector. Los gases comúnmente usados son nitrógeno, helio e hidrógeno.

Reguladores del flujo de gas acarreador: constituyen un elemento importante ya que los reguladores controlan la velocidad del gas acarreador el cual influye en la eficiencia de la columna, tiempo de retención y en la altura de los picos en detectores de caudal.

Inyector: la inyección de la muestra se realiza en una cámara conocida como “liner” que es un pequeño tubo de vidrio que se ubica en la parte central del portal de inyección, en esta cámara la temperatura debe ser lo suficientemente alta para que la muestra se vaporice de forma instantánea así como para minimizar la interacción de los analitos con el *liner* mediante puentes de hidrógeno.

Para que la muestra pueda acceder al *liner* la jeringa debe penetrar un tapón o *septa* hecho de silicona que es un material con una estabilidad química, térmica y de flexibilidad muy sobresalientes, estas propiedades permiten su recuperación después de la inyección, el propósito de este componente es cerrar el portal de inyección para que no se pierda muestra.

Existen dos tipos de inyectores en CG, con división (*Split*) y sin división (*Splitless*), en general los componentes del inyector con división son los mismos que los del inyector sin división, por esta razón la mayoría de los fabricantes emplean la misma entrada al inyector.

En la inyección con división (*split*) se introduce la muestra líquida en el *liner*, se vaporiza en su totalidad lo más rápido posible, se mezcla y se diluye parcialmente con el gas portador que fluye por la parte central del *liner* y una fracción definida por la relación de división, pasa a través de la columna, con la válvula de división abierta, el resto de la muestra es

venteada y sale al exterior a través de la línea de venteo. Un diagrama de este tipo de inyección se muestra en la figura 9.

Inyección con división

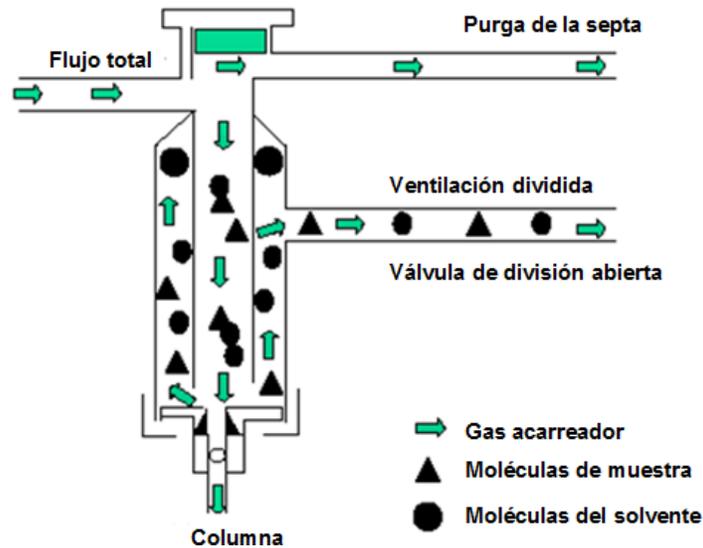


Figura 9 Representación gráfica del tipo de inyección *split* (con división). [17]

En la inyección en modo sin división (*splitless*) la muestra se vaporiza totalmente en el *liner* forzando su paso a través de la columna con la válvula de división cerrada para evitar pérdida de muestra. En principio toda la muestra es transferida al capilar por el gas portador pero como el flujo a través de la columna es pequeño la muestra se va diluyendo con el gas portador, por lo que transcurrido un tiempo (30-60 s) se abre la válvula de división y se ventean los restos de vapor remanente.

La ventaja de usar el modo *split* es que impide la sobrecarga de la columna ya que generalmente se inyecta 1 μL pero solo una fracción seleccionada entra y el restante es desechado. La desventaja es que se pierde una porción significativa de la muestra.

En el modo *splitless* la principal ventaja es que se inyecta la muestra completa incluyendo al disolvente y es ideal cuando se trabaja en concentraciones muy bajas porque permite incrementar la señal de los analitos. La desventaja es que si se asigna un tiempo muy corto para abrir la válvula de división se pierden analitos y si es muy largo se produce un pico del disolvente más grande del necesario que puede sepultar picos de interés. En la figura 10 se muestra un diagrama de este tipo de inyección.

Inyección sin división

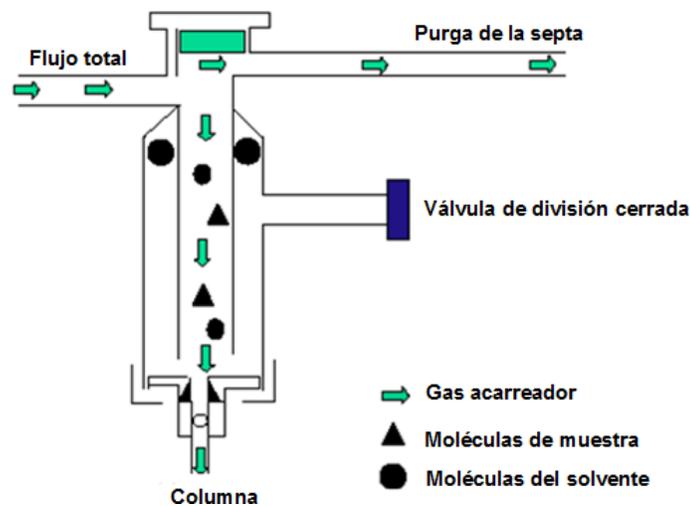


Figura 10 Representación gráfica del tipo de inyección *splitless* (sin división). [17]

Horno: es el dispositivo que contiene a la columna. La función principal del horno es mantener, controlar o modificar la temperatura de la separación cromatográfica. El funcionamiento consiste en calentar el aire que rodea a la columna dentro del horno a través de una resistencia que irradia calor y que se distribuye mediante un ventilador. La temperatura se controla con un termopar a partir de la cantidad de energía calorífica emitida

por la resistencia, de esta forma el horno puede ser trabajado en condiciones isotérmicas o bien a una temperatura programada.

Columna: es el componente que contiene la fase estacionaria y donde se produce la separación cromatográfica. Existen dos tipos de columnas, las empaquetadas y las capilares. En la actualidad las columnas capilares son las comúnmente utilizadas para CG con longitudes que van desde los 5 m hasta 100 m, el diámetro interno de estas columnas es menor a 1 milímetro, entre 0.1 y 0.5 mm. La eficiencia puede alcanzar los 5000 platos teóricos por metro, llegando a tener hasta 250 000 platos totales.

Detector: el detector de ionización de llama (DIF) es uno de los más utilizados para CG, posee una sensibilidad del orden de 10^{-12} g/s con un margen de linealidad de siete ordenes de magnitud, tiene una respuesta rápida y excelente estabilidad. Se considera un detector casi universal ya que responde a compuestos orgánicos con $-CH$. El detector DIF no responde a grupos orgánicos con carbonos oxidados como ácidos y grupos carbonilo, además de gases permanentes y compuestos inorgánicos como óxidos de nitrógeno, de azufre, de carbono y agua.

El funcionamiento consiste en un mechero con llama de hidrógeno-aire que sirve de electrodo y un electrodo colector situado encima de la llama generalmente en forma de malla circular. Entre los dos electrodos se aplica una diferencia de potencial de 200-300 voltios. La resistencia eléctrica de la llama es elevada en ausencia de analito, del orden de $10^{12} \Omega$ (intensidad cero) que explica el bajo ruido de fondo. El efluyente se mezcla con hidrógeno que a la salida de la llama entra en combustión con el oxígeno del aire. De esta forma cuando el efluyente se quema en la llama se producen pares electrón-radical CHO^+ lo que da lugar a

una corriente eléctrica. La cantidad de iones producidos es proporcional al número de átomos de carbono no oxidados que entran en el detector por unidad de tiempo y por tanto al número de moléculas, dicha señal eléctrica llega al sistema de registro de datos.

Sistema de registro y análisis de datos: la señal eléctrica que proviene del detector es digitalizada y almacenada en forma de datos primarios en un ordenador. Dicho lo anterior, es posible visualizar un cromatograma que es la representación gráfica de la respuesta del detector en función del tiempo de elución del analito. Los picos cromatográficos son las zonas resultantes de la separación en las que se encuentra el soluto, pueden ser integrados en el mismo ordenador.

En la figura 11 se muestra el cromatógrafo de gases utilizado en el desarrollo de esta tesis.



Figura 11 Cromatógrafo de gases. DIF= Detector de ionización de flama marca ThermoScientific.

1.6.2 Cromatografía de gases con acoplamiento a espectrometría de masas (CG-EM)

La combinación CG-EM es muy adecuada debido a que el cromatógrafo de gases separa los componentes de una muestra, suministrando compuestos puros y la espectrometría de masas permite su identificación y confirmación. Las columnas capilares de cromatografía de gases se pueden conectar directamente con el espectrómetro ya que sus flujos son compatibles con la capacidad de bombas requerido para producir el vacío en el analizador del espectrómetro.

El espectrómetro de masas actúa como un detector para el cromatógrafo de gases. De ésta forma los picos separados se eluyen del cromatógrafo de gases secuencialmente y entran en el espectrómetro. Una línea de transferencia caliente entre el cromatógrafo y el espectrómetro mantiene los compuestos del efluente en fase gas después de salir del horno del cromatógrafo.

Los iones se obtienen mediante ionización electrónica aplicando al efluente una diferencia de potencial estándar de 70 eV entre el filamento que emite electrones y el contraelectrodo. Se emplean 70 eV porque el proceso de ionización se ha estabilizado y pequeñas variaciones en la energía electrónica tienen un efecto despreciable sobre las abundancias de los iones. La identificación de los picos cromatográficos se realiza comparando los espectros de masas obtenidos con los disponibles de las bibliotecas de los espectros comerciales.

El analizador es el dispositivo en el que se realiza la separación de los iones. Para su funcionamiento adecuado el espectrómetro debe tener vacío en su interior. El sistema de vacío hace posible que los iones se muevan desde la fuente de ionización hasta el detector sin chocar con otros iones o moléculas.

El analizador de masa cuadrupolar es uno de los más usados y consta de cuatro barras situadas espacialmente en los vértices de un cuadrado, dejando un espacio longitudinal en su interior donde entran y por el que se desplazan los iones. Entre barras opuestas se aplican alternadamente, potenciales de corriente continua y de corriente alterna, iguales en magnitud pero de signo contrario, que generan un campo de cuadrupolo en el espacio entre las barras. Los campos eléctricos oscilantes individuales aplicados entre cada dos barras opuestas producen un movimiento ondulatorio en los iones que se desplaza a través del cuadrupolo. La combinación de estos movimientos ondulatorios confiere a los iones una trayectoria compleja, de tipo ondular en espiral, funcionando el cuadrupolo como un filtro de corte agudo, que tras la aplicación de unos determinados potenciales transmite solamente el ion que posee una determinada m/z .

El multiplicador de electrones tiene la función de detectar cada ion de la masa seleccionada que pasa por el filtro de masa. El proceso físico que permite que un multiplicador funcione se llama emisión de electrones secundaria. En el dinodo discreto los iones provenientes del analizador de masas son enfocados sobre un dinodo que emite electrones en proporción directa al número de iones bombardeados hacia él. Los electrones secundarios del dinodo (iones en electrones) son acelerados y enfocados hacia un segundo dinodo, el cual también emite electrones secundarios (electrones en electrones). De este modo, la amplificación es llevada a cabo a través de un “efecto cascada” de electrones secundarios de dinodo a dinodo, ya que el número de electrones que llegan a un dinodo es menos al que sale del mismo. Cada etapa es un dinodo de cobre-berilio conectado a un potencial sucesivamente mayor por un divisor de voltaje. Pueden llegar a tener de 10 a 20 etapas amplificando la señal en un orden de hasta 10^7 . La salida análoga del detector es típicamente una señal de voltaje que varía en

función del tiempo, esta es convertida a una señal digital por medio de un convertidor análogo-digital. Los datos digitales son procesados y almacenados en el CPU de una computadora donde se realiza su interpretación. En la figura 12 se presenta un diagrama de un sistema de CG-EM.

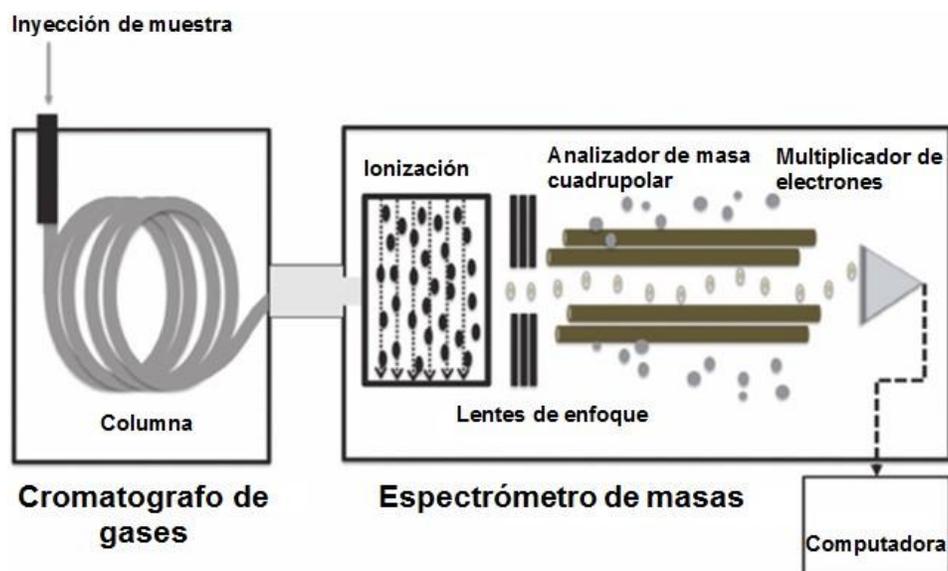


Figura 12 Diagrama del sistema CG-EM acoplado. [18]

Cromatograma de iones totales (TIC): Un cromatograma de iones totales se obtiene sumando las intensidades de todos los iones procedentes de un mismo barrido a lo largo del tiempo del cromatograma. El proceso de barrido de los iones de un analizador tiene lugar muy rápidamente de forma que un barrido de un espectro de masas a un determinado tiempo del cromatograma incluye una medida de los diferentes iones detectados durante ese barrido. La suma de iones totales de cada barrido de masas a lo largo del tiempo del cromatograma aumenta cuando el pico aumenta su intensidad hasta su máximo y decrece cuando disminuye la concentración en el pico. De esta forma, la suma de iones totales para cada barrido de masas representa la cantidad de analito en ese instante. El cromatograma en un barrido CG-

EM es justamente la corriente total de iones (TIC). Frente al tiempo, esta corriente de iones se registra mediante un ordenador cuyo programa reconoce las relaciones m/z específicas que salen del analizador en cada instante.

Monitoreo de iones seleccionados (SIM): En el monitoreo de iones seleccionados (SIM), el cuadrupolo se ajusta para permitir solamente el paso a través de una masa seleccionada, la sensibilidad es mayor en modo SIM que en modo TIC, del orden de 100-1000 veces.

En modo TIC la mayor parte del tiempo se emplea para detectar los iones en un margen de masa más grande, en la mayor parte del cual no existe información, en cambio en modo SIM todo el tiempo se emplea en detectar los iones seleccionados. La precisión en modo SIM es mayor que en modo TIC y los límites de detección son más bajos debido al efecto de integración y que se dispone de más datos para determinar el comienzo y final de un pico cromatográfico, resultando más adecuado para la determinación cuantitativa de trazas. [16].

En la figura 13 se muestra el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas utilizado en el desarrollo de esta tesis.



Figura 13 Cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas marca Perkin Elmer utilizado en el desarrollo de esta tesis.

1.6.3 Empleo del método de estándar interno en cromatografía de gases.

En cromatografía de gases la mayor precisión se obtiene al utilizar estándares internos (E.I) debido a que se minimizan las incertidumbres ocasionadas por la inyección de la muestra, la velocidad de flujo y las variaciones de la columna. En este procedimiento, una cantidad de un estándar interno de concentración conocida se introduce en cada estándar y muestra y se utiliza como parámetro analítico la relación entre el área del pico del analito y el área del pico del estándar interno. [19] Así mismo, para que este método resulte exitoso debe cumplir con las siguientes características:

- Ser de alta pureza, estable y no deberá reaccionar con los componentes de la muestra.
- Propiedades fisicoquímicas del analito y del estándar interno semejantes (polaridad, formación de complejos, etc.).
- Que el pico del estándar interno esté bien separado de los picos de todos los componentes de la muestra.
- En el cromatograma debe eluir cerca del pico del analito.
- No debe ser componente natural de la muestra.

1.7 Metodologías recientes para el análisis de HAPs en muestras de organismos marinos.

En la tabla 2 se presentan algunos trabajos recientes donde se analizan HAPs en diversos organismos marinos, la mayoría son especies de consumo humano y el monitoreo de estos analitos radica principalmente por la toxicidad que presentan y el riesgo que conlleva su consumo.

La tendencia en los métodos de extracción es la miniaturización con principal enfoque a solventar el problema que representan los lípidos en este tipo de matrices, la limpieza adicional a la extracción es un factor a considerar porque representa la diferencia para obtener mejores resultados. En los trabajos de la tabla 2 se presentan diferentes métodos de extracción, en todos usan un método adicional de limpieza para disminuir este tipo de interferencias, además de que disminuyen el uso de disolventes a excepción del método por Soxhlet que si bien puede arrojar resultados satisfactorios es de considerar que requiere mucho más tiempo y gasto de disolventes pero no deja de ser una forma de comparar resultados con otros métodos.

Los principales contaminantes monitoreados son 16 de acuerdo a la EPA pero en algunos trabajos se enfocan en algunos en específico, todo esto depende de muchos factores como el tamaño de la muestra, su contenido de lípidos, la acumulación total de contaminantes y las condiciones de exposición. Los trabajos que usan QuEChERS GPC-SPE, HS-SPME, MSPD, SPE y SBSE como método de extracción resulta la mejor opción, son más selectivos, hay una menor manipulación de la muestra y disminuyen el uso de disolventes generando menores residuos. En general, los recobros reportados van desde 23.63 a 120 % a excepción del trabajo de Bandowe [20] que reportó recobros de hasta 172 %.

La técnica cromatográfica utilizada en los diferentes trabajos es cromatografía de gases con acoplamiento con espectrometría de masas, este acoplamiento potencializa la detección, identificación y cuantificación de los analitos de interés obteniendo límites de detección de 0.1 ng g^{-1} hasta 183 ng g^{-1} . Los datos de estos trabajos son relevantes porque brindan un mejor panorama sobre los valores obtenidos al analizar HAPs en organismo marinos.

Tabla 4 Métodos recientes de análisis de HAPs en muestras de organismos marinos.

Autor (Año)	Muestra	Analitos	Método de Extracción	Método De Análisis	Recobros	L.D.
(Cloutier, 2017) [21]	Mejillones azules (<i>Mytilus edulis</i>) y salmón (<i>Salmo salar</i>)	(2-MeNa), (Ace), (Acy), (Ant), (Phe), (Pyr), (BaP), (3-MC), (DahP) y (Flo).	QuEChERS-GPC-SPE	GC-HRMS	72.12-113.6 %	0.05 - 0.25 µg /kg
(Aguinaga, 2008) [22]	Salmón: <i>salmo salar</i>	(Nap), (Acy), (Ace), (flo), (Phe), (Ant), (Fla) y (Pyr).	HS-SPME	CG-MS	88 – 111%	0.58-3.1 ng/ g
(Olson, 2016) [23]	Pez: <i>Brevoortia patronus</i>	(Nap), (Acy), (Ace), (Flo), (Phe), (Ant), (Fla), (Pyr), (BaA), (Chy), (BbF), (BkF), (BaP), (IcdP), (DahA) y (BghiP).	MSPD	CG-MS	70 – 120%	33 – 183 ng/ g
(Pena, 2003) [24]	Pescado Familia: <i>Mucrouridae</i> Camarones: (<i>Penaeus duorarum</i> ,	(Nap), (Acy), (Ace), (Flo), (Phe), (Ant), (Fla), (Pyr), (BaA), (Chy), (BbF), (BkF), (BaP), (IcdP), (DahA) y (BghiP).	SPE	CG-MS	23.63–64.51%	75 ng/ g
(Lacroix, 2014) [25]	Bacalao europeo (<i>Dicentrarchuslabrax</i>) y mejillón azul (<i>Mytilus spp.</i>)	(Nap), BT, (B), (Acy), (Ace), (Flo), (DBT), (Phe), (Ant), (Flo), (Pyr), (BaA), (Chy), (BbF), (BkF), (BeP), (BaP), (IcdP), (DahA) y (BghiP).	SBSE	GC-MS/MS	71% y 119%	0.03-0.13 ng / g
(Hossain,2014) [26]	Peces baim, bata, puti, chapilla, gamba y taki.	(Nap).	Soxhlet	GC -MS	79.14 %	0.030 -1.004 µg / g

Tabla 2 Métodos recientes de análisis de HAPs en muestras de organismos marinos. (Continuación)

Autor (Año)	Muestra	Analitos	Método de Extracción	Método De Análisis	Recobros	L.D.
(Ligouri, 2006) [27]	Mejillón (<i>Mytilus edulis</i>) y salmón (<i>Salmo salar</i>)	(Nap), (2-MeNa), (2,6-(DiMeNap), (2, 3, 6-TriMeNap), (Acy), (Ace), (Flo), (Ant), (Phe), (2-MePhe), (3,6-DiMePhe), (Fla), (Pyr), (1-(MePyr), (BaA), (Chy), (Try), (BbF), (BkF), (BaP), (6-MeBaP), (IcdP), (DahA) y (BghiP).	ASE-GPC	CG-MS	75- 121 %	0.11 – 0.88 pg/ g
(Bandowe, 2014) [20]	Peces demersales: <i>Drapane africana</i> , <i>Cynoglossus senegalensis</i> y <i>Pomadasy peroteti</i>	(Nap), (2-MeNa), (1-Me), (B), (1,3-DiMeNap), (Acy), (Ace), (Flo), (Phe), (Ant), (1-MePhe), (3,6-DiMePhe), (Fla), (Pyr), (BaA), (Chy + Try), (B[b + j + k]F), (BghiP) y (Cor).	ASE	CG-MS	108 – 172 %	0.06 -0.9 ng / g
(Sun-Lin, 2016) [28]	20 especies diferentes de peces pelágicos y 3 de crustáceos.	(Nap), (Acy), (Ace), (Flo), (Phe), (Ant), (Fla), (Pyr), (BaA), (Chy), (BbF), (BkF), (BaP), (IcdP), (DahA) y (BghiP).	Sonicación con solventes	CG-MS	69% al 113%	0.01 - 0.16 ng / g
(Ke,Gu, 2017) [29]	Peces: <i>Auxis tapeinosoma</i> , <i>Brama japonica</i> , <i>Decapterus macrosoma</i> , <i>Cubiceps squamicep</i> , <i>Gemphylus serpens</i>	(Nap), (Acy), (Ace), (Flo), (Phe), (Ant), (Fla), (Pyr), (BaA), (Chy), (BbF), (BkF), (BaP), (IcdP), (DahA) y (BghiP).	Sonicación con solventes	CG-MS	79- 117 %	0.02 - 0.16 ng / g

Tabla 2 Métodos recientes de análisis de HAPs en muestras de organismos marinos. (Continuación)

Autor (Año)	Muestra	Analitos	Método de Extracción	Método De Análisis	Recobros	L.D.
(Sun, 2018) [30]	12 especies diferentes de peces, 11 de crustáceos, 2 de moluscos y 2 de cefalópodos.	(Nap), (Acy), (Ace), (Flo), (Phe), (Ant), (Fla), (Pyr), (BaA), (Chy), (BbF), (BkF), (BaP), (IcdP), (DahA) y (BghiP)	Sonicación con solventes	CG-MS	76 – 104 %	0.03-0.25 ng / g
(Xu, 2011) [31]	Carpa criolla, pez cabeza de serpiente, carpa herbívora y carpa plateada	(Nap), (Acy), (Ace), (Flo), (Phe), (Ant), (Fla), (Pyr), (BaA), (Chy), (BbF), (BkF), (BaP), (IcdP), (DahA) y (BghiP).	Soxhlet	CG-MS	43.9 - 133.2%	1.56 – 48.08 ng/ g
(Chatterjee, 2016) [32]	Músculo de cobia (<i>Rachycentron canadum</i>)	(Nap), (Acy), (Ace), (Flo), (Phe), (Ant), (Fla), (Pyr), (BaA), (Chy), (BbF), (BkF), (BaP), (IcdP), (DahA) y (BghiP).	Extracción solido - liquido	GC-MS/MS	60 – 120%	0.001 -0.004 mg / kg

(GC-MS/MS): Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem. (GC-MS): Cromatografía de gases con acoplamiento a espectrometría de masas. (QuEChERS): Rápido, Fácil, Barato, Eficaz, Robusto y Seguro. (HS-SPME): Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza. (MSPD): Dispersión de matriz en fase sólida. (SPE): Extracción en fase sólida. (SBSE): Extracción por sorción con barras magnéticas agitadoras. (ASE): Extracción acelerada por solvente. (GPC): Cromatografía de permeación en gel. (GC-HRMS): Cromatografía de gases de alta resolución acoplada a espectrometría de masas. (Nap): Naftaleno. (Acy): Acenaftileno. (Ace): Acenafteno. (Flo): Floureno. (Phe): Fenantreno. (Ant): Antraceno. (Fla): Fluoranteno. (Pyr): Pireno. (BaA): Benzo [a] antraceno. (Chy): Criseno. (BbF): Benzo[b]fluoranteno. (BkF): Benzo [k] Fluoranteno. (BaP): Benzo [a] Pireno. (IcdP): Indeno [1, 2, 3-c, d] pireno. (DahA): Dibenzo[a, h] antraceno. (BghiP): Benzo [g, h, i] perileno. (1-MePyr): 1-metilpireno. (DahP): (BeP): Benzo [e] Pireno: Dibenzo [a,h]pireno. (3-MC): 3-metilcolantreno. (B): Bifenilo. (BT): Benzotiofeno. (DBT): Dibenzotiofeno. (2,6-DiMeNa): 2,6-dimetilnaftaleno. (2, 3 ,6-TriMeNa): 2, 3, 6-trimetilnaftaleno. (2-MePhe): 2-metilfenantreno. (3,6-DiMePhe): 3,6-dimetilfenantreno. (6-MeBaP): 6-metil benzo (a) Pireno. (1-MeNa): 1-metilnaftaleno. (1,3-DiMeNap): 1,3-dimetilnaftaleno. (1-MePhe): 1-metilfenantreno. (Chy+Try): Criseno mas trifenileno. (B [b + j + k] F): Benzo [b + j + k] Fluoranteno. (Cor): Coroneno.

Capítulo 2 Metodología

2.1 Reactivos, materiales y equipos.

- Metanol grado cromatográfico marca J. T. Baker.
- Diclorometano grado cromatográfico marca Sigma Aldrich.
- Hexano grado cromatográfico marca Sigma Aldrich.
- Acetonitrilo grado cromatográfico marca J. T. Baker.
- Acetato de etilo grado cromatográfico marca Sigma Aldrich.
- Acetona marca J. T. Baker.
- Disolución estándar de mezcla de 18 Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) a 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ marca Supelco. Part Number: CRM47543.
- Estándar de Tridecano y Perileno deuterado marca Sigma Aldrich.
- Adsorbente Chromabond C18-PAH marca Macherey-Nagel (sílice C18).
- Florisil marca Sigma-Aldrich.
- Cartuchos de polipropileno de 6 mL para EFS y frits de teflón marca Agilent.
- Viales graduados de vidrio con tapones de interior laminado marca Supelco.
- Nitrógeno de ultra alta pureza > 99.99 % marca Praxair.
- Mortero y pistilo de ágata.
- Rallador de alimentos de acero inoxidable.
- Papel aluminio.
- Matraz kitasato 250 mL con tapón de caucho #8.
- Aguja de acero.
- Ultra sonido marca Brason modelo 2510E-MT.

- Micropipeta de volumen variable de 100-1000 μL marca Transferpette.
- Micropipeta de volumen variable de 20-200 μL marca Transferpette.
- Baño María.
- Desecador.
- Soporte universal con pinzas y nuez.
- Parrilla de calentamiento.
- Estufa de secado.
- Vasos de precipitado 10 mL y 50 mL.
- Pipetas graduadas de 1 mL.
- Matraz aforado de 1 mL y 10 mL.
- Termómetro de Hg.
- Espátula de acero inoxidable.
- Pinzas de disección de acero inoxidable.
- Aire comprimido.

2.2 Sistemas cromatográficos utilizados.

Equipo1: Cromatógrafo de gases Marca Thermo Modelo Trace 2000 Series GC

Inyector: *Split/Splitless*.

Detector: DIF.

Equipo 2: Cromatógrafo de gases Marca Perkin Elmer Clarus 680 acoplado a un espectrómetro de masas SQ 8C.

Inyector: *Split/Splitless*.

Todas las separaciones se realizaron utilizando una columna SLB 5ms con una longitud de 30 m, un diámetro interno de 0.25 mm y un grosor de película de 0.25 μm .

2.3 Muestra.

Como muestra se utilizó músculo liofilizado de mantarraya *M. californicus* y de *M. birostris* tomadas de la zona ventro-posterior de las aletas pectorales, proporcionadas por personal del Centro de Interdisciplinario de Ciencias Marinas IPN (CICIMAR-IPN) de Baja California Sur. Las muestras se mantuvieron en un desecador hasta su uso. En la figura 14 se muestra un individuo de mantarraya *M. californicus*.



Figura 14 Ejemplar de *M. Californicus* del Archipiélago de Revillagigedo.

2.4 Preparación de las disoluciones estándar.

Se preparó un stock de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ a partir de la disolución estándar de la mezcla de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Posteriormente se preparan disoluciones stock a cinco concentraciones diferentes, todas en acetato de etilo grado cromatográfico. Las disoluciones se mantuvieron en refrigeración a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.5 Acondicionamiento y almacenamiento de los adsorbentes.

La sílice C18 se acondicionó de la siguiente forma:

1. Se empacó 3 g de adsorbente en un cartucho de EFS colocándolo en un matraz kitazato el cual se conectó al vacío.
2. Se adicionaron al cartucho en el siguiente orden: 5 mL de agua desionizada y 10 mL de metanol grado cromatográfico.
3. Se sometió a vacío durante 15 minutos.
4. El adsorbente ya acondicionado se colocó en un vial de vidrio ámbar con tapa de rosca y se almacenó a temperatura ambiente hasta su uso.

Para acondicionar el florisil se realizaron los siguientes pasos:

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

La metodología se describe de forma general en la figura 15.

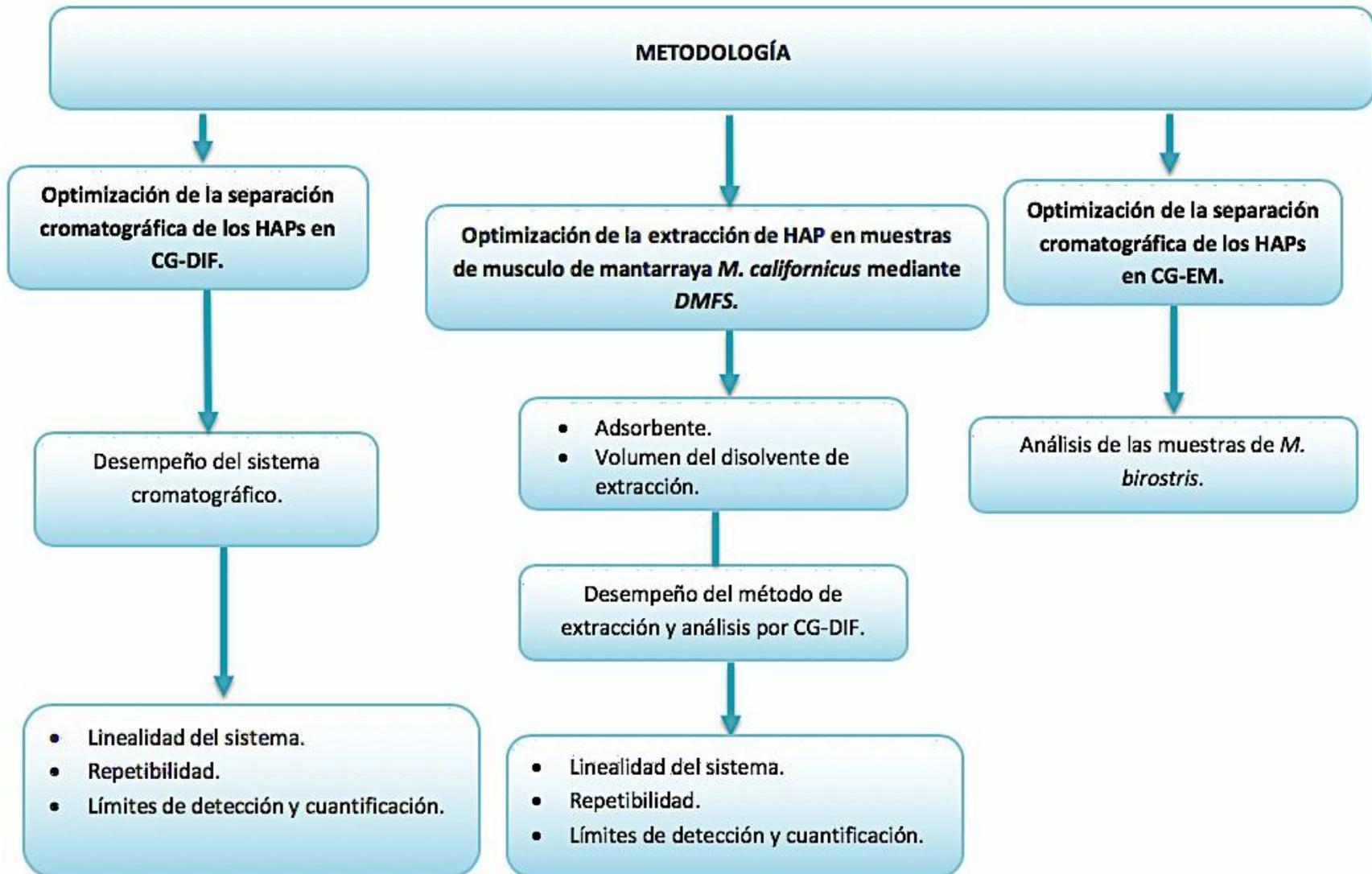


Figura 15 Esquema general de la metodología experimental.

2.6 Optimización de la separación cromatográfica CG-DIF.

El tipo de inyección utilizado fue en modo *split* con un volumen de inyección de 1 μL , la temperatura del inyector fue 250 $^{\circ}\text{C}$, el gas acarreador utilizado fue nitrógeno a 2 mL min^{-1} , la temperatura del detector se mantuvo en 270 $^{\circ}\text{C}$ y los gases del detector utilizados fueron aire a 350 mL min^{-1} e hidrógeno a 35 mL min^{-1} . En la tabla 3 se presenta el programa de temperatura utilizado en el CG-DIF.

Tabla 3 Programa de temperatura del horno del CG-DIF

	Rampa ($^{\circ}\text{C min}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo de espera (min)
Inicio		60	1.0
Rampa 1	20.0	250	0
Rampa 2	5.0	320	20.0

Para optimizar la separación cromatográfica se inyectó una disolución estándar de la mezcla de HAPs a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a las condiciones anteriormente descritas. Posteriormente, con el propósito de incrementar la respuesta para todos los HAPs se cambió el tipo de inyección a *splitless* a las mismas condiciones mejorando considerablemente las respuestas.

2.7 Metodología para la validación del sistema cromatográfico por CG-DIF.

2.7.1 Linealidad.

Para evaluar la linealidad del sistema cromatográfico, a partir del estándar de concentración 100 ppm de los analitos, se preparó una curva de calibración a las concentraciones de 5, 10, 20, 30 y 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Cada disolución fue inyectada por triplicado y se graficó la proporción de área en función de la proporción de concentraciones, en ambos casos respecto al E. I. Se obtuvo el coeficiente de determinación (r^2) y la ecuación de la recta de mejor ajuste.

2.7.2 Repetibilidad.

La repetibilidad se evaluó inyectando por triplicado en días diferentes las disoluciones estándar de 20 y 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, obteniendo a partir de éstas el promedio de la proporción de las áreas de cada analito respecto al E.I. Se calculó la desviación estándar (D.E.) y el coeficiente de variación porcentual (C.V%).

2.7.3 Límites de detección y cuantificación.

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

2.8 Extracción de HAPs en muestras de músculo de mantarraya mediante Dispersión de Matriz en Fase Sólida.

Para la optimización del método de extracción y análisis se utilizaron muestras de músculo liofilizado de mantarraya *M. californicus* proporcionadas por el CICIMAR-IPN. En un mortero de ágata se colocaron muestras de 30 mg fortificadas a partir de la disolución estándar de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a cinco diferentes concentraciones. Las muestras se dejaron secar a temperatura ambiente durante 20 minutos antes de realizar la extracción.

La proporción de muestra/adsorbente utilizada en todas las extracciones fue 1:4 como sugiere Barker [14], es decir, 30 mg de muestra de músculo fortificado de *M. californicus* por 120 mg de sílice C18. Con la ayuda del pistilo se homogeneizó la mezcla durante cinco minutos. Posteriormente, la mezcla se empacó en un cartucho de EFS previamente empacado con una co-columna de 30 mg de florisil.

Los analitos fueron recuperados de cada cartucho utilizando 4 mL de acetonitrilo grado cromatográfico. Cada extracto se evaporó hasta un volumen aproximado de 500 μL a una temperatura de 40 °C en baño María bajo corriente de N_2 . Después se adicionó a cada extracto una alícuota de 67 μL de la disolución estándar de Tridecano (E.I.) de concentración 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, se aforaron a 1 mL con acetato de etilo grado cromatográfico y se agitaron en vórtex durante un minuto.

Se inyectó al sistema CG-FID 1 μL de cada extracto y se obtuvieron las áreas de cada uno de los analitos y del E. I.

En la figura 16 se resumen gráficamente la metodología para la extracción de HAPs por DMFS en muestras de músculo de mantarraya.

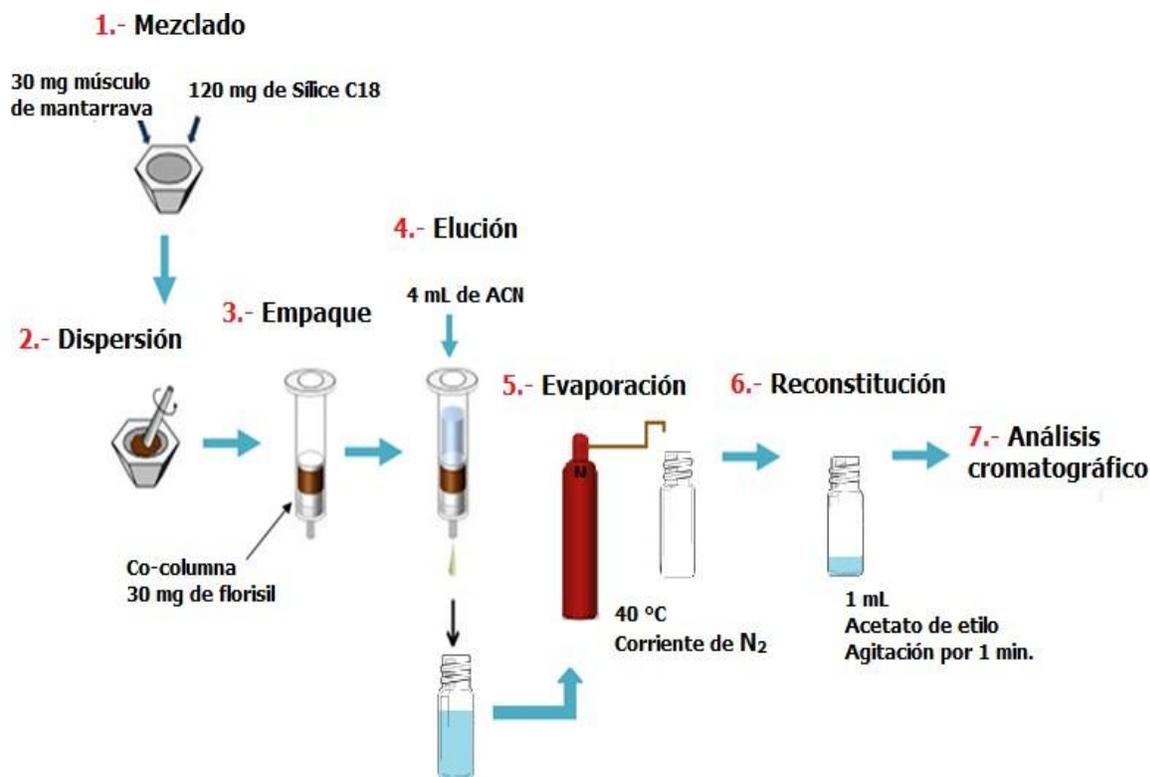


Figura 16 Condiciones para la separación de los HAPs por DMFS.

Para calcular el Factor de respuesta se inyectó un extracto blanco fortificado con los analitos a cinco diferentes concentraciones y el E.I a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ para todos los sistemas.

2.9 Validación del método de extracción y análisis por DMFS y CG-DIF.

2.9.1 Linealidad del método y exactitud (recobro).

Para evaluar la linealidad del método se fortificaron muestras de músculo de *M. californicus* por triplicado a las concentraciones de 0.167, 0.250, 0.333, 0.667 y $0.833 \mu\text{g mg}^{-1}$ para todos los analitos, teniendo como referencia un blanco fortificado para cada nivel de concentración. Se utilizan blancos fortificados porque es mejor trabajar con la matriz del sistema, de esta forma se puede averiguar si los componentes interfieren con las señales de los analitos.

Para cada analito se graficó la cantidad recuperada en función de la cantidad agregada y se obtuvo la ecuación de la recta de mejor ajuste por el método de mínimos cuadrados.

La linealidad se evaluó con el coeficiente de determinación (r^2), mientras que el recobro global en el intervalo de concentraciones utilizado se obtuvo multiplicando la pendiente de la recta de cada analito por cien.

2.9.2 Repetibilidad.

La repetibilidad se evaluó por medio de seis ensayos realizados en días diferentes a dos niveles de fortificación de la muestra 0.167 y 0.833 $\mu\text{g mg}^{-1}$, obteniendo a partir de éstas la concentración recuperada promedio, la desviación estándar (D.E.) y el coeficiente de variación porcentual (C.V%).

2.9.3 Límites de detección y cuantificación.

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

2.10 Condiciones para la separación cromatográfica CG-EM.

Se realizaron ajustes mínimos a las condiciones de separación optimizadas con el equipo de GC-FID por lo cual no hubo dificultad en la separación de los analitos en el equipo de CG-EM.

Todos los análisis con el sistema de CG-EM se realizaron con una temperatura del inyector de 280 °C, inyección en modo *Splitless* (0-1 min) y gas portador He a un flujo de 1 mL/min. El programa de temperatura utilizado en el horno se muestra en la tabla 4.

Tabla 4 Programa de temperatura del horno del CG-EM.

	Rampa (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo de espera (Minutos)
Inicio		60	1.0
Rampa 1	15.0	300	10.0

El tiempo total de análisis fue de 24 minutos.

Para la detección, el detector de masas fue de cuadrupolo simple manteniendo la temperatura de línea de transferencia a 250 °C. El método de ionización fue impacto electrónico a 70 eV y monitoreando la corriente iónica total (TIC) y los iones individuales (SIM) a las relaciones de m/z que se muestran en la tabla 5.

2.11 Análisis de las muestras de *M. birostris*.

Se utilizaron muestras liofilizadas de *M. birostris* proporcionadas por el CICIMAR-IPN a las que se les aplicó el método de extracción descrito en la página 45 de este trabajo y los extractos obtenidos se analizaron con las condiciones de CG-EM descritas en la página 46. Se analizaron un total de 18 muestras de músculo de mantarraya que corresponden a diferentes organismos y se calcularon las concentraciones de HAPs.

Tabla 5 Condiciones para el análisis por SIM de PAHs en los extractos.

Analito	tr (min)	Iones monitoreados (m/z)
Naftaleno	6.675	102, 127, 128
2-metilnaftaleno	7.741	115, 141, 142
1-metilnaftaleno	7.882	
Acenaftileno	9.134	151, 152, 153, 154
Acenafteno	9.415	
Fluoreno	10.225	163, 165, 166
Fenantreno	11.756	176, 178, 179
Antraceno	11.831	
Fluoranteno	13.642	200, 202, 203
Pireno	14.00	
Benzo(a)antraceno	15.905	226, 228, 229
Criseno	15.959	
Benzo(b)fluoranteno	17.526	250, 252, 253
Benzo(k)fluoranteno	17.570	
Benzo(a)pireno	18.051	
Perileno-d12 (IS)	18.167	260, 264, 265
Indeno(1,2,3-cd)pireno	20.388	276, 277, 278
Dibenzo(ah)antraceno	20.435	
Benzo(ghi)perileno	21.04	

Capítulo 3. Resultados y discusión

3.1 Optimización de la separación cromatográfica CG-DIF.

El programa de temperatura descrito en la página 43 permitió la identificación y separación de la mezcla del Estándar Interno y los 18 analitos de la disolución estándar de HAPs inyectados a 10 y 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Un ejemplo de los cromatogramas obtenidos se muestra en la figura 15.

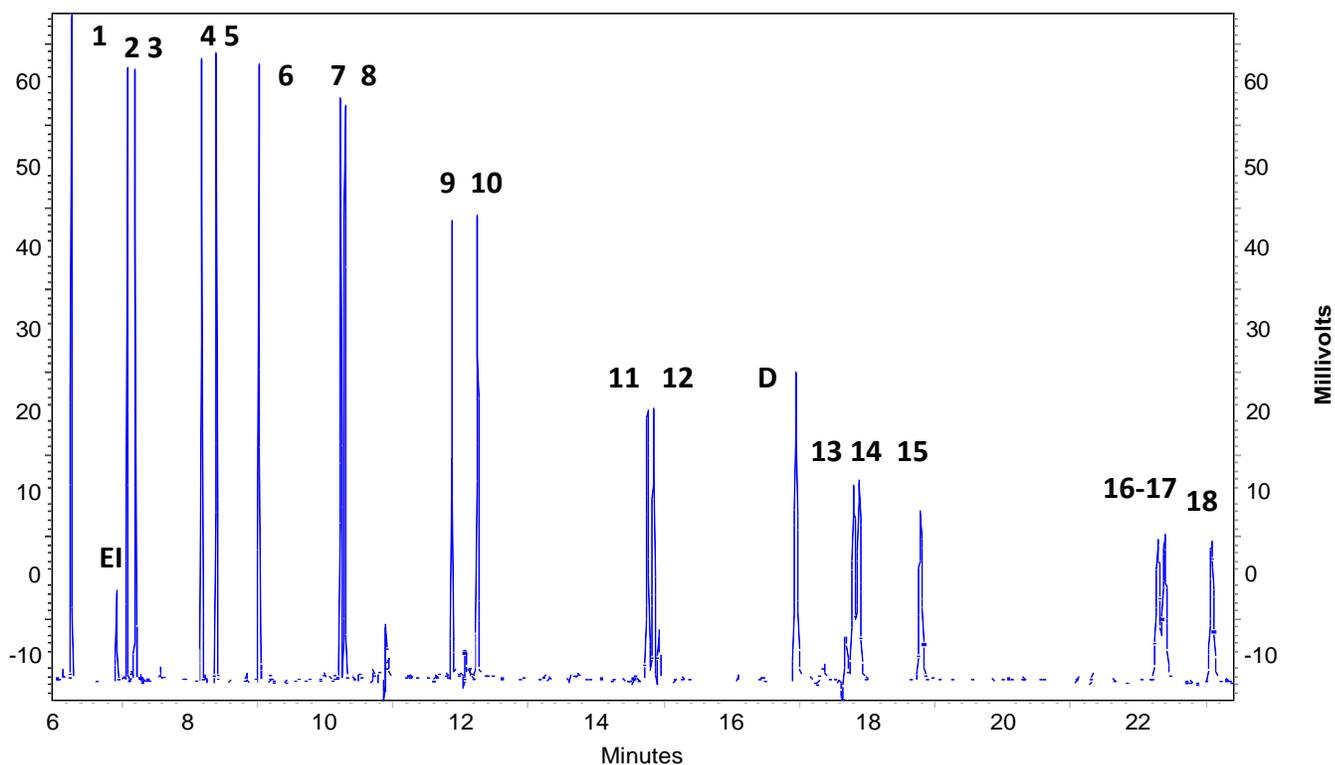


Figura 17 Cromatograma de la inyección en modo *split* de una disolución estándar de tridecano (E.I.) a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y HAPs a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

En la figura 17 se puede observar que los pares de picos (11-12), (13-14) y (16-17) se traslapan. Sin embargo, su grado de separación es suficiente para proporcionar áreas proporcionales a la concentración de los analitos. Debido a que las moléculas que

corresponden a esos analitos son isómeros, al tratar de optimizar su separación se provocaría el traslape del resto de las señales. En la tabla 6 se muestra el orden de elución de los analitos de interés.

Tabla 6 Orden de elución de los HAPs y del Estándar Interno

Analito	Nombre analito	tr (min)
1	Naftaleno	6.20
EI	Tridecano	6.85
2	2-metilnaftaleno	7.01
3	1-metilnaftaleno	7.13
4	Acenaftileno	8.10
5	Acenafteno	8.31
6	Fluoreno	8.95
7	Fenantreno	10.14
8	Antraceno	10.20
9	Fluoranteno	11.75
10	Pireno	12.13
11	Benzo(a)antraceno	14.62
12	Criseno	14.71
13	Benzo(b)fluoranteno	17.66
14	Benzo(k)fluoranteno	17.74
15	Benzo(a)pireno	18.64
16	Indeno(1,2,3-c,d)pireno	22.14
17	Dibenzo(a,b)antraceno	22.24
18	Benzo(g,h,i)perileno	22.93

Usando las mismas condiciones cromatográficas descritas en la página 43, se realizaron inyecciones cambiando el tipo de inyección a *splitless*, es decir que el volumen de 1 μ L inyectado se vaporiza por completo en el *liner* y pasa por la columna capilar dejando cerrada

la válvula de venteo para no perder muestra durante cierto tiempo establecido, el cual en este caso fue de 0.5 min.

En las figuras 18 y 19 se observan dos cromatogramas sobrepuestos en los dos modos de inyección con disoluciones estándar de los analitos a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$. En estas imágenes se comparan las respuestas obtenidas al realizar inyecciones en modo *split* y *splitless*. Se observa una mejora considerable de la respuesta para todos los HAPs al realizar la inyección en modo *splitless* por lo cual se eligió este modo de inyección para realizar la validación del sistema de CG-DIF.

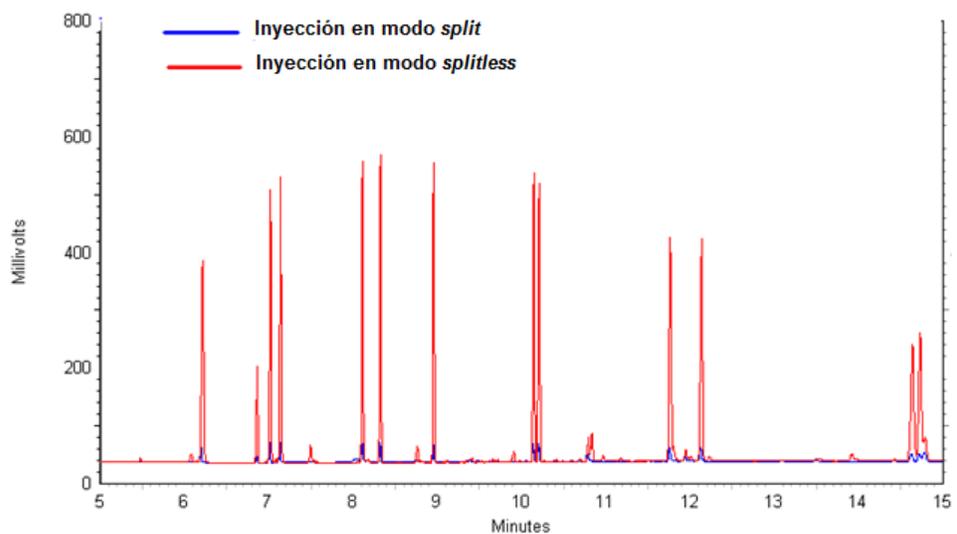


Figura 18 Cromatogramas obtenidos de la mezcla de HAPs a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente inyectados en modo *split* (color azul) y *splitless* (color rojo) al intervalo de tiempo 5 a 15 minutos.

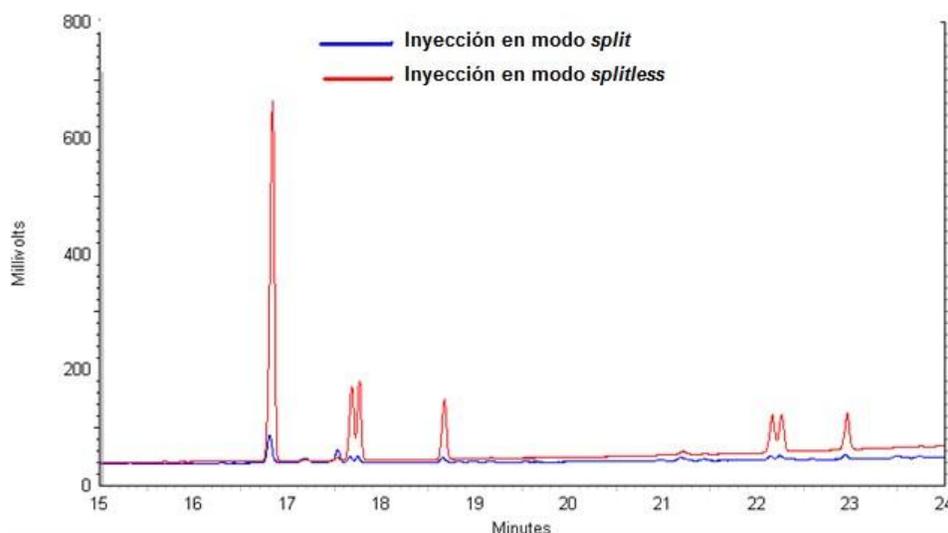


Figura 19 Cromatogramas obtenidos de la mezcla de HAPs a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente inyectados en modo *split* (color azul) y *splitless* (color rojo) al intervalo de tiempo 15 a 24 minutos.

3.2 Validación del sistema de cromatografía de gases con detector de ionización de flama (CG-DIF) para el análisis de HAPs.

En la tabla 7 se resumen los parámetros de validación del sistema para cada analito de la mezcla de HAPs.

El coeficiente de determinación (r^2) obtenido resultó mayor a 0.972 para todos los analitos, con lo cual se aprecia una buena correlación lineal del sistema cromatográfico en el intervalo de concentración de 5 a $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. [34, 35]

La repetibilidad del sistema fue buena con C.V. % inferiores a 14.83% de acuerdo a los Criterios para la validación interna y confirmación de métodos fisicoquímicos establecidos por la Cofepris los cuales deben ser ≤ 15 , a los dos niveles de concentración utilizados. [34]

Los límites de cuantificación experimentales estuvieron entre 0.76 y $4.83 \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que los límites de detección experimentales estuvieron entre 0.25 y $1.59 \mu\text{g mL}^{-1}$. El

benzo(k)fluoranteno fue el compuesto con los valores mayores de L.D. y L. C. debido a que presentó la menor sensibilidad en el sistema de análisis.

3.3 Evaluación del efecto matriz en la determinación de los HAPs por CG-FID.

Al realizar los primeros ensayos de recobro, se observaron resultados menores al 60 % para algunos analitos al momento de realizar la comparación de áreas contra una disolución estándar. Se evaluó el efecto matriz en las determinaciones con la finalidad de identificar la presencia de interferencias que pudieran causar una disminución de la respuesta de cada uno de los analitos.

El efecto matriz se evaluó calculando las proporciones de las pendientes de la curva de calibración preparada con extractos de muestras blanco (blanco fortificado) con las pendientes de la curva de calibración preparadas con disolvente puro (disolución estándar).

[34]

Los resultados se muestran en la tabla 8, en donde se puede apreciar que existe un efecto matriz positivo en todos los analitos porque las pendientes de la curvas con blanco fortificado tienen valores menores para todos los analitos en comparación a las pendientes de la curva de calibración con disolvente puro. Esto indica que la matriz extraída suprime la señal de los analitos por lo cual este efecto acarrea errores al momento de calcular los recobros, produciéndose valores bajos. De esta forma, se determinó que para minimizar los errores al cuantificar a los analitos se deben comparar las áreas obtenidas en las muestras contra las áreas de blancos fortificados.

Tabla 7 Resultados de la validación del sistema de CG-DIF con disoluciones estándar

No.	Analito	Ecuación*	r ²	C.V. 20 (µg/mL) n=3	C.V. 40 (µg/mL) n=3	L.D. (µg/mL)	L.C. (µg/mL)
1	Naftaleno	$y = 0.1476x - 0.0422$	0.990	50.0	5.17	0.66	2.0
2	2-metilnaftaleno	$y = 0.1407x - 0.0542$	0.995	0.21	1.47	0.45	1.36
3	1-metilnaftaleno	$y = 0.1453x - 0.0639$	0.995	0.35	2.11	0.43	1.30
4	Acenaftileno	$y = 0.1377x - 0.0324$	0.992	0.55	2.35	0.54	1.66
5	Acenafteno	$y = 0.143x - 0.0487$	0.998	0.40	3.07	0.53	1.60
6	Fluoreno	$y = 0.1396x - 0.0185$	0.999	0.53	7.18	0.57	1.66
7	Fenantreno	$y = 0.133x + 0.0409$	0.995	0.92	12.09	0.58	1.77
8	Antraceno	$y = 0.1272x + 0.0199$	0.992	0.63	12.75	0.62	1.89
9	Fluoranteno	$y = 0.1249x + 0.1046$	0.983	1.78	13.93	0.26	0.80
10	Pireno	$y = 0.1287x + 0.1861$	0.978	2.17	13.21	0.25	0.76
11	Benzo(a)antraceno	$y = 0.1008x + 0.0855$	0.976	4.44	12.04	0.67	2.05
12	Criseno	$y = 0.1051x + 0.0717$	0.972	4.56	12.34	0.65	1.97
13	Benzo(b)fluoranteno	$y = 0.0789x + 0.0757$	0.977	7.31	12.25	1.57	4.77
14	Benzo(k)fluoranteno	$y = 0.077x + 0.0819$	0.979	7.99	13.60	1.59	4.83
15	Benzo(a)pireno	$y = 0.0643x + 0.0197$	0.979	8.32	12.49	0.67	2.04
16	Indeno(1,2,3-c,d)pireno	$y = 0.0433x + 0.0155$	0.979	14.22	14.39	1.06	3.23
17	Dibenzo(a,b)antraceno	$y = 0.0405x + 0.0221$	0.978	13.93	11.72	1.08	3.30
18	Benzo(g,h,i)perileno	$y = 0.0397x + 0.0051$	0.976	14.83	13.53	0.68	2.07

* $y = (mV)$, $x = (\mu g/mL)$

Tabla 8 Resultados del efecto matriz entre la disolución estándar de HAPs y muestras fortificadas de músculo de mantarraya *M. californicus*.

No.	Analito	Pendiente Blanco Fortificado	Pendiente Disolución Estándar	Efecto matriz
1	Naftaleno	0.1102	0.1476	1.34
2	2-metilnaftaleno	0.1019	0.1407	1.38
3	1-metilnaftaleno	0.1055	0.1453	1.38
4	Acenaftileno	0.098	0.1377	1.41
5	Acenafteno	0.0983	0.143	1.45
6	Fluoreno	0.0937	0.1396	1.49
7	Fenantreno	0.0848	0.133	1.57
8	Antraceno	0.0798	0.1272	1.59
9	Fluoranteno	0.0734	0.1249	1.70
10	Pireno	0.0771	0.1287	1.67
11	Benzo(a)antraceno	0.0521	0.1008	1.93
12	Criseno	0.0532	0.1051	1.98
13	Benzo(b)fluoranteno	0.0318	0.0789	2.48
14	Benzo(k)fluoranteno	0.0316	0.077	2.44
15	Benzo(a)pireno	0.0245	0.0643	2.62
16	Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0.0159	0.0433	2.72
17	Dibenzo(a,h)antraceno	0.0157	0.0405	2.58
18	Benzo(g,h,i)perileno	0.0155	0.0397	2.56

3.4 Optimización de la extracción por DMFS.

En la extracción por DMFS se optimizaron tres parámetros, los primeros fueron el tipo y la proporción del adsorbente a utilizar para la extracción. Se utilizaron sílice C18 y florisil como adsorbente en una proporción 1:4 (muestra: adsorbente). La cantidad de muestra elegida fue de 30 mg de músculo de *M. californicus* porque los pesos de las muestras de *M. birostris* proporcionados se encontraban en ese orden. Así mismo, se utilizó una co-columna de 30 mg de adsorbente con el propósito de retener la mayor cantidad de compuestos lipídicos y obtener así un extracto más limpio.

Al realizar la extracción con sílice C18 para la dispersión y una co-columna de florisil, se obtuvieron recobros del 66 al 120% para todos los HAPs. Al invertir el orden de los adsorbentes a florisil para la dispersión y como co-columna sílice C18 los rendimientos fueron del 55 al 75%. Por lo tanto se eligió la primer combinación para realizar todas las extracciones.

El siguiente parámetro que se optimizó fue el volumen del disolvente de extracción. Se utilizó ACN grado cromatográfico debido a que tiene una menor afinidad por los compuestos lipídicos y los volúmenes evaluados fueron 4 y 8 mL. En ambos casos se presentaron recobros muy similares por lo que se eligió el menor volumen.

En cuanto a la evaporación del extracto, estos se llevaron a sequedad y se reconstituyeron en 1 mL de acetato de etilo para el análisis cromatográfico. En los cromatogramas obtenidos se apreciaba la ausencia de las señales de los 3 primeros analitos (naftaleno, 2-metilnaftaleno y 1-metilnaftaleno) mientras que en los demás analitos los recobros se mantenían.

Con el propósito de mejorar las señales de los primeros tres analitos, la evaporación se llevó casi a sequedad, reduciendo el extracto a 0.5 mL aproximadamente y aforando a 1 mL con acetato de etilo. En los cromatogramas obtenidos con estas condiciones se lograron apreciar las señales de los 3 analitos aunque no de forma reproducible como se explicará más adelante. El resto de los analitos mantuvieron sus valores de recobro. En la tabla 9 se resumen las condiciones óptimas de extracción y análisis de los HAPs utilizadas en esta tesis.

Tabla 9 Condiciones de extracción y análisis por CG-DIF para musculo de mantarraya *M. californicus*.

Condiciones cromatográficas			
Columna	Capilar SLB 5ms largo 30 m, diámetro interno 0.25 mm y grosor de película de 0.25 μm		
Detección	Ionización de flama		
Temperatura del detector	270 °C		
Gases del detector	Aire (350 mL min ⁻¹), Hidrógeno (35 mL min ⁻¹)		
Temperatura del inyector	250 °C		
Fase móvil y flujo	Nitrógeno de alta pureza >99.999% a 2 mL min ⁻¹		
Tipo de inyección	<i>Splitless</i> durante 0.5 minutos		
Volumen de inyección	1.0 μL		
Tiempo total de análisis	23 minutos		
Programa de temperatura del horno			
	Rampa (°C/min)	Temperatura °C	Tiempo de espera (min)
Inicio	---	60	1
Rampa 1	20	250	0
Rampa 2	5	320	20
Condiciones DMFS			
Muestra	30 mg de músculo de mantarraya <i>M. californicus</i>		
Adsorbente	120 mg Sílice C18		
Co-columna	30 mg Florisil		
Volumen de elución	4 ml Acetonitrilo grado cromatográfico		

En las figuras 20 a 23 se muestran cromatogramas típicos para la disolución de mezcla de estándares de HAPs y tridecano (E.I) y una muestra fortificada de músculo de mantarraya *M. californicus*. Se puede observar la presencia de algunas señales en el cromatograma de la disolución estándar que son propias del disolvente pero que no interfieren en el análisis de los HAPs. En cuanto al cromatograma de la muestra fortificada se observa la presencia de algunos compuestos coextraídos de la matriz pero que de igual forma no interfieren con los analitos de interés.

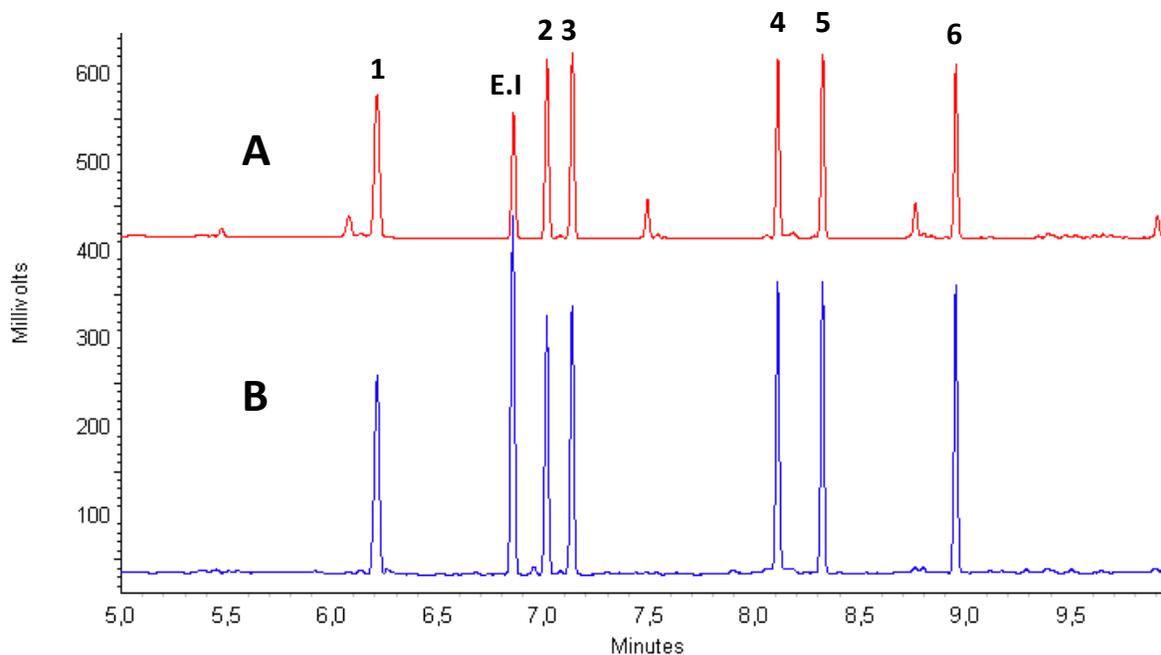


Figura 20 Cromatogramas obtenidos de la disolución de mezcla de estándares de Tridecano (E.I.) y HAPs (A) a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ y una muestra fortificada a $0.333 \mu\text{g mg}^{-1}$ (B) respectivamente, al intervalo de tiempo de 5 a 10 minutos.

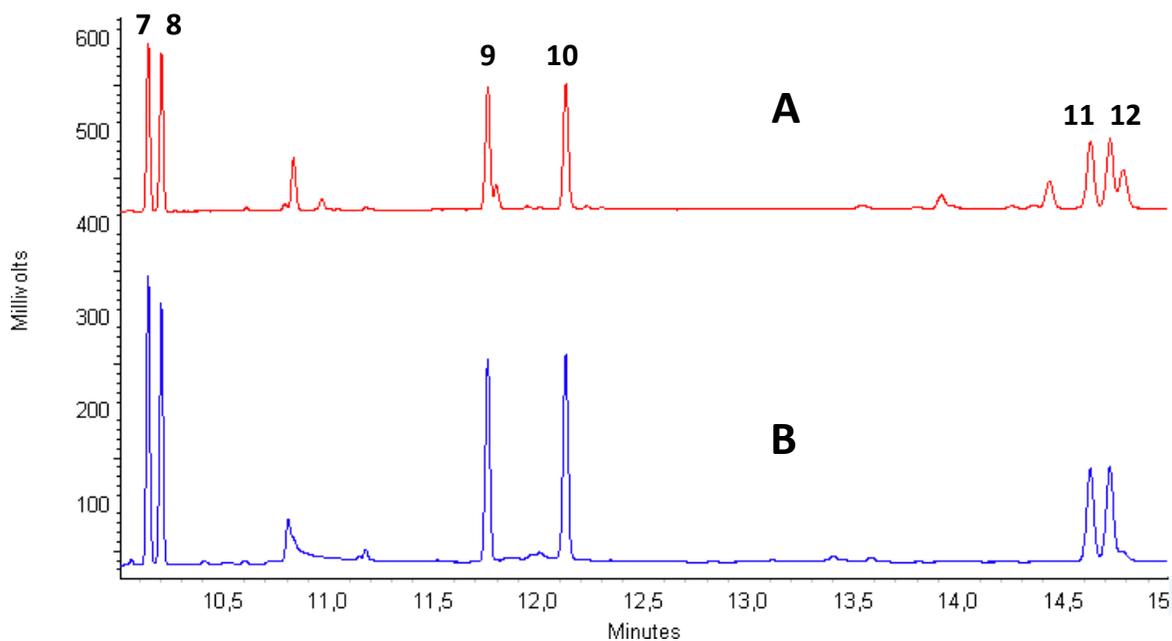


Figura 21 Cromatogramas obtenidos de la disolución de mezcla de estándares de Tridecano y HAPs (A) a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ y una muestra fortificada a $0.333 \mu\text{g mg}^{-1}$ (B) respectivamente, al intervalo de tiempo de 10 a 15 minutos.

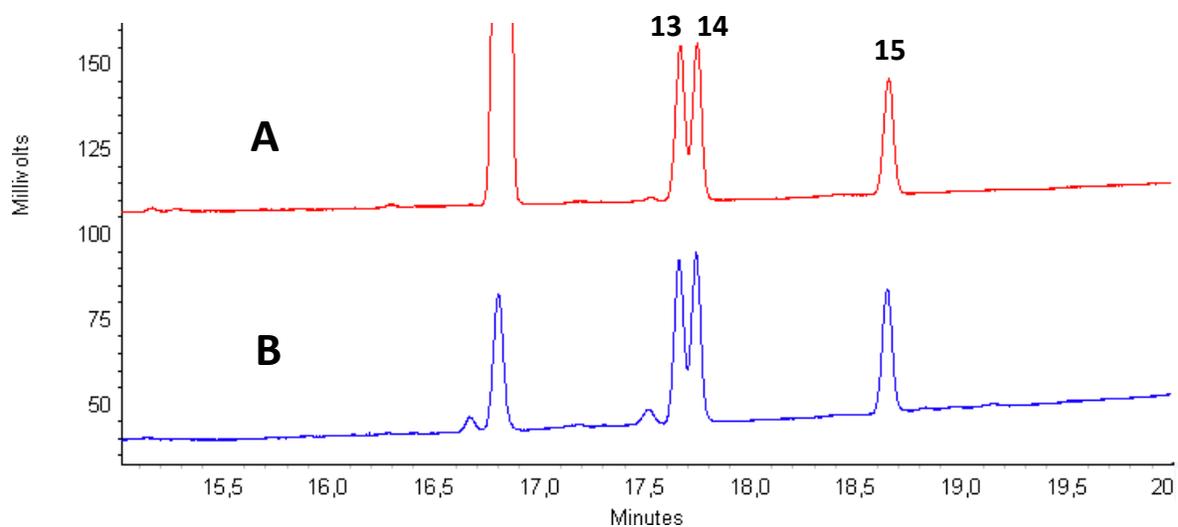


Figura 22 Cromatogramas obtenidos de la disolución de mezcla de estándares de Tridecano (E.I.) y HAPs (A) a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ y una muestra fortificada a $0.333 \mu\text{g mg}^{-1}$ (B) respectivamente, al intervalo de tiempo de 15 a 20 minutos.

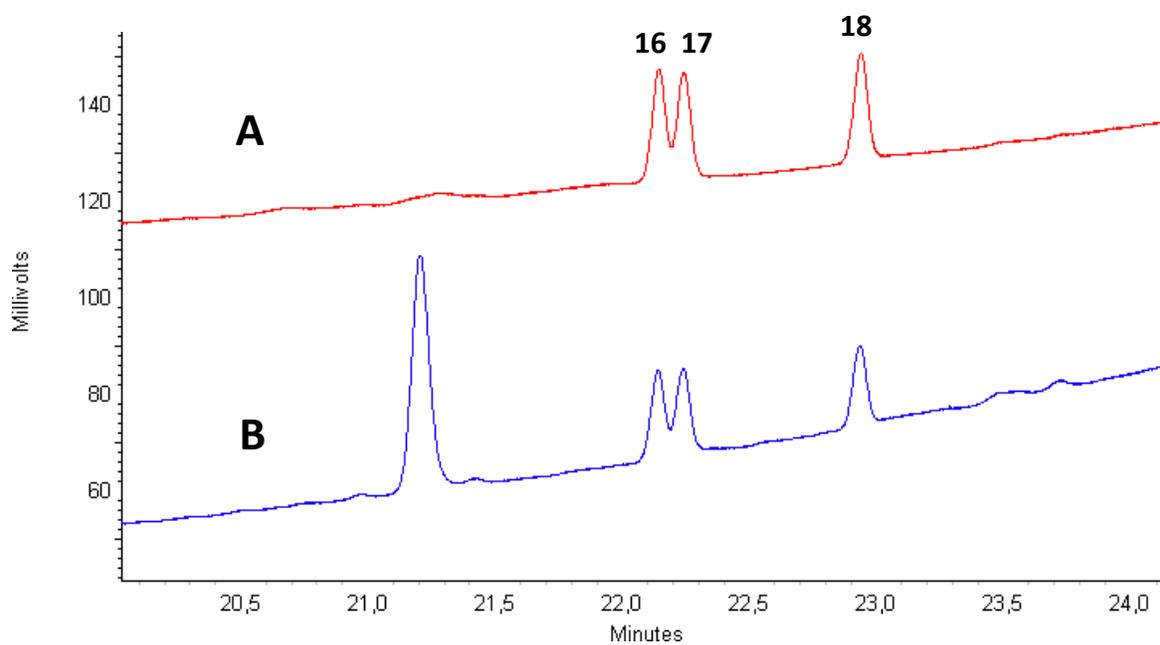


Figura 23 Cromatogramas obtenidos de la disolución de mezcla de estándares de Tridecano (E.I.) y HAPs (A) a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ y una muestra fortificada a $0.333 \mu\text{g mg}^{-1}$ (B) respectivamente, al intervalo de tiempo de 20 a 24 minutos.

3.5 Validación del método de extracción por Dispersión de matriz en Fase Sólida y análisis por Cromatografía de Gases con Detector de Ionización de Flama (DMFS-CG-FID).

En la tabla 10 se presentan los resultados de la validación del método con muestras fortificadas en músculo de mantarraya *M. californicus*.

Se obtuvieron las ecuaciones de la recta y el coeficiente de determinación con valores aceptables mayores a 0.962 para todos los compuestos de interés. [34, 35]

La repetibilidad fue evaluada a dos niveles de concentración 0.167 y 0.833 $\mu\text{g mg}^{-1}$, obteniéndose C.V. menores a 15%, asegurado una buena repetibilidad dado que estos valores de C.V% se encuentran por debajo de 15% para estos niveles de concentración. [34]

Los L.D. permiten identificar a los analitos a concentraciones entre 0.015 y 0.071 $\mu\text{g mg}^{-1}$, mientras que los L.C. permiten determinar concentraciones entre 0.045 y 0.105 $\mu\text{g mg}^{-1}$ a excepción del benzo(g,h,i)perileno que su L.C. resulto de 0.217 $\mu\text{g mg}^{-1}$, esto debido a que al ser el analito mas retenido proporciona la señal más baja de todos los HAPs.

La exactitud del método se evaluó a partir de las curvas de cantidad recuperada en función de la cantidad agregada para cada analito, en donde el valor de la pendiente multiplicado por 100 representa el recobro global. A excepción de los analitos naftaleno, 2-metilnaftaleno y 1-metilnaftaleno, se obtuvieron recobros entre 71.37 y 102.08 %, valores aceptables pues según los criterios de recuperación son de 70-110% de recobro para las concentraciones de trabajo establecidas. [34]

Tabla 10 Resultados de la validación del método DMFS-CG-DIF para los HAPs en muestras de músculo de mantarraya *M. californicus* fortificadas.

No.	Analito	r ²	% de recobro global *	C.V.% 0.167 (µg mg ⁻¹) n=3	C.V.% 0.833 (µg mg ⁻¹) n=3	L.D. (µg mg ⁻¹)	L.C. (µg mg ⁻¹)
1	Naftaleno	0.976	15.52	17.21	15.72	N/D	N/D
2	2-metilnaftaleno	0.984	39.96	10.90	7.88	N/D	N/D
3	1-metilnaftaleno	0.984	42.37	9.22	7.33	N/D	N/D
4	Acenaftileno	0.989	71.37	3.38	2.41	0.017	0.051
5	Acenafteno	0.986	78.01	1.86	2.23	0.017	0.051
6	Fluoreno	0.984	93.45	1.09	4.67	0.015	0.045
7	Fenantreno	0.977	101.81	1.49	7.98	0.017	0.052
8	Antraceno	0.962	93.94	0.17	10.44	0.018	0.055
9	Fluoranteno	0.971	102.08	0.33	9.20	0.018	0.054
10	Pireno	0.970	100.71	0.41	8.52	0.015	0.047
11	Benzo(a)antraceno	0.972	94.33	0.67	3.69	0.027	0.083
12	Criseno	0.972	95.55	1.29	3.63	0.025	0.075
13	Benzo(b)fluoranteno	0.986	89.07	1.07	3.00	0.035	0.105
14	Benzo(k)fluoranteno	0.988	88.77	1.16	3.11	0.033	0.102
15	Benzo(a)pireno	0.987	83.63	2.64	4.43	0.025	0.076
16	Indeno(1,2,3-c,d)pireno	0.997	77.78	0.37	13.73	0.029	0.089
17	Dibenzo(a,h)antraceno	0.997	79.24	2.07	14.55	0.030	0.092
18	Benzo(g,h,i)perileno	0.998	77.37	2.41	13.60	0.071	0.217

*Evaluado en el intervalo de concentraciones 0.167 a 0.833 µg mg⁻¹

Como es de esperarse al analizar un intervalo de analitos con polaridades tan diferentes, los compuestos intermedios son los que alcanzan los mayores rendimientos de extracción.

3.6 Optimización de la separación cromatográfica CG-EM.

Las condiciones de separación cromatográfica y el programa de temperatura descritos en la página 48 y 49 permitieron la identificación y separación de los 18 analitos de una disolución estándar de los HAPs a 0.5 µg mL⁻¹ disueltas en acetato de etilo.

La identificación y confirmación de los picos cromatográficos se realizó comparando el espectro de masas de cada analito con los espectros de la biblioteca del software del equipo considerados como una “huella química”. Los espectros obtenidos se muestran en el Anexo I.

Una vez obtenidos los espectros para cada analito, se seleccionaron los iones para hacer las cuantificaciones en los extractos obtenidos con muestras de mantarraya *M. birostris*.

En la figura 24 se muestra el cromatograma en modo TIC de una disolución estándar de HAPs a 0.5 ppm donde se monitoreo la suma de los iones totales para cada analito frente al tiempo. Los tiempos de retención son similares respecto al análisis con el sistema de CG-DIF, además de que se aprecia un menor ruido debido a la elevada sensibilidad del sistema.

La separación de los analitos fue satisfactoria, como se puede observar hay dos pares de picos (13-14) y (16 y 17) que se traslapan pero, su grado de separación es adecuado.

El monitoreo de iones por (modo SIM) es más selectivo ya que selecciona un ion o un conjunto de iones que son generados por la presencia de los analitos de interés. En la tabla 5 se muestran los iones monitoreados para cada uno de los analitos.

En relación al estándar interno, se utilizó perileno deuterado porque es un compuesto que pertenece al grupo de los HAPs y en caso de que se traslapara con algunas de las señales de los 18 analitos estudiados en este trabajo se podría separar su señal modificando los iones monitoreados ya que al no poseer átomos de hidrógeno en su estructura tiene un peso molecular diferente.

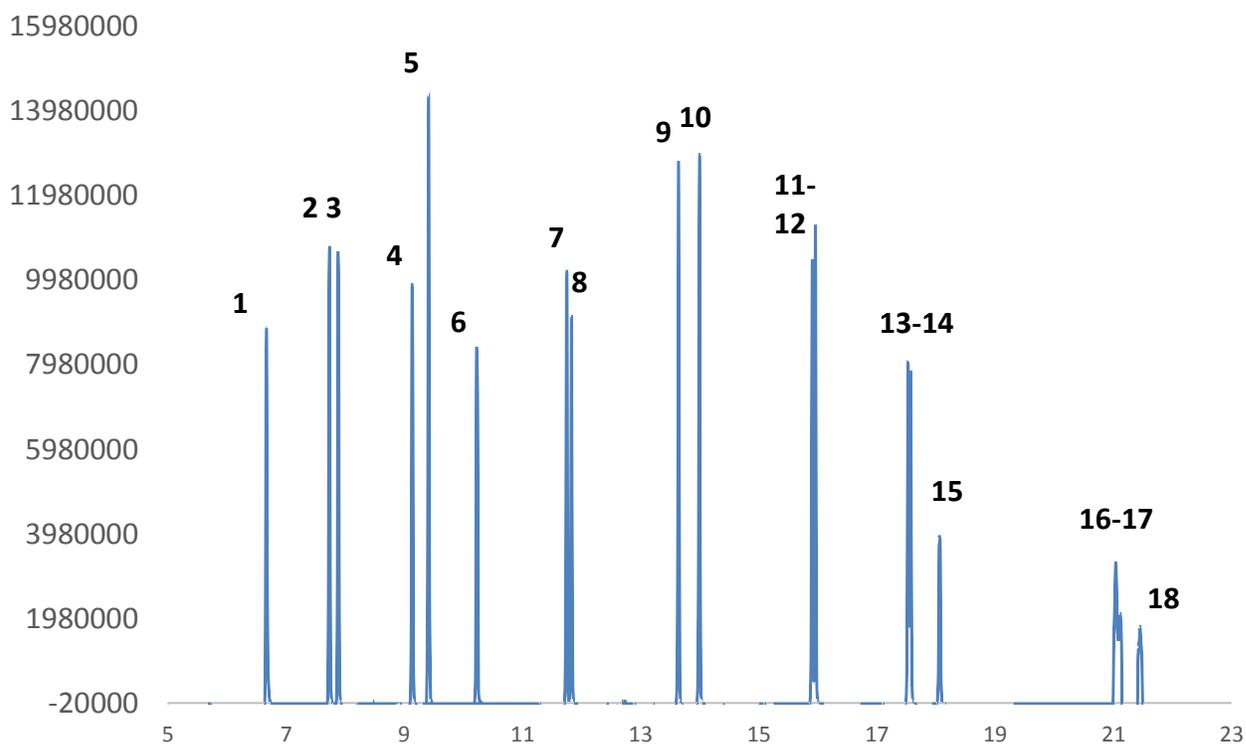


Figura 24. Cromatograma TIC de una disolución estándar de HAPs a $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$. 1= naftaleno; 2= 2-metilnaftaleno; 3=1-metilnaftaleno; 4= acenaftileno; 5= acenafteno; 6=fluoreno; 7= fenantreno; 8= antraceno; 9= fluoranteno; 10= pireno; 11=benzo[a]antraceno; 12= criseno; 13= benzo[b]fluoranteno; 14= benzo[k]fluoranteno; 15= benzo[a]pireno; 16= indeno[1,2,3-cd]pireno; 17= dibenzo[a,h]antraceno; 18= benzo[g,h,i]perileno.

3.7 Análisis de muestras *M. birostris* provenientes del Archipiélago de Revillagigedo.

Las dieciocho muestras proporcionadas por el CICIMAR-IPN se trataron a las condiciones de DMFS validadas y realizando el análisis por CG-EM monitoreando los iones señalados en la sección anterior. Las cuantificaciones se obtuvieron con el método del estándar interno comparando el área obtenida de los HAPs presentes en las muestras de músculo de mantarraya *M. birostris* con el área del perileno deuterado agregado a los extractos a una

concentración de $0.75 \mu\text{g mL}^{-1}$. En la figura 25 se muestra un ejemplo de los cromatogramas obtenidos para las muestras de mantarraya gigante analizadas.

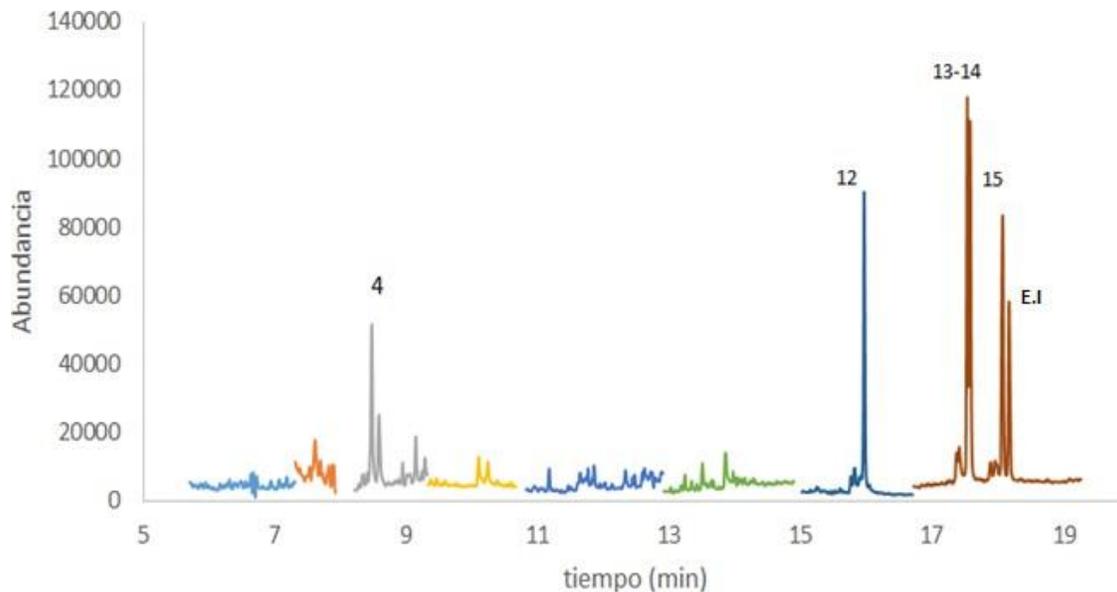


Figura 25 Cromatograma de un extracto de músculo de *M. birostris* (MG67).
4=Acenaftileno; 12=Criseno; 13=Benzo[b]fluoranteno; 14=Benzo[k]fluoranteno;
15= benzo[a]pireno; E.I.=Estándar interno.

En la tabla 11 se presentan los resultados de la presencia de HAPs en las dieciocho muestras analizadas.

Sólo se encontraron HAPs en cuatro de las muestras analizadas en el orden de las ppb (ng g^{-1}). Una muestra presentó HAPs ligeros (BB24716) mientras que otra presentó de los HAPs más pesados (MG57 M+D), el resto de las muestras presentaron HAPs intermedios. En la figura 26 se resumen las concentraciones de los HAPs encontrados.

Tabla 11 Resultados del análisis de HAPs en muestras de *M. birostris*.

Muestra*	Peso (mg)	Presencia de HAPs	Muestra	Peso (mg)	Presencia de HAPs
BB231216A	26.1	✓	MG57 M+D	47.8 **	✗
BB17416	20.6	✓	MG62	34.9	✗
BB19716	33.3	✗	MG67	50.7	✓
BB24716	46	✗	MG69 D	30	✗
MG44	28.6	✗	MG69 M	58	✗
MG47	33.9	✗	MG70	38	✗
MG49	26.6	✗	MG71	56	✓
MG51	44	✗	MG73	29	✗
MG54	35.3	✗	MG74	39	✗

* El nombre de las muestras se refiere al número de seriación asignado por el CICIMAR

** Se analizó la muestra sin separar el músculo de la dermis

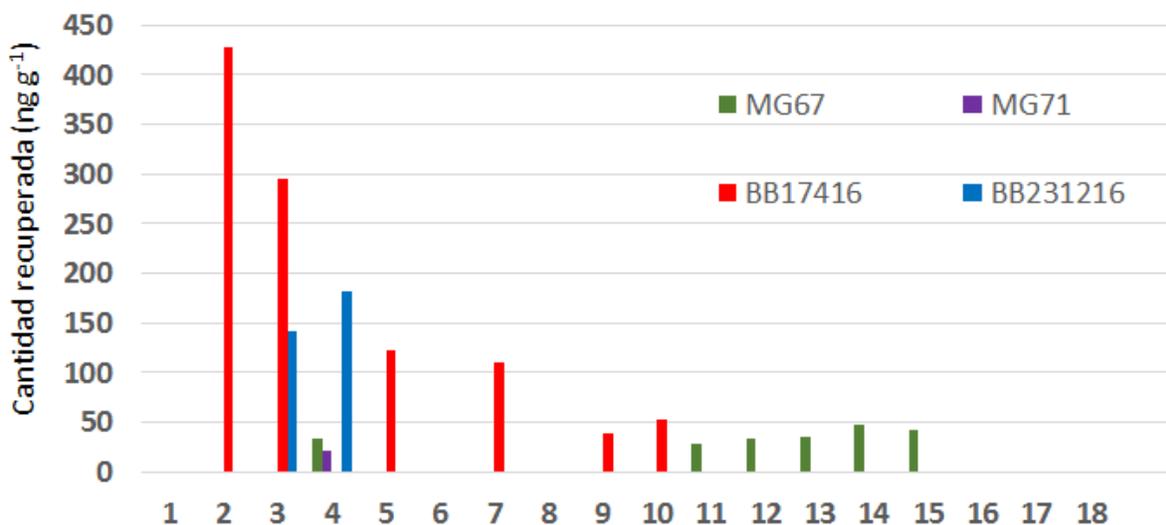


Figura 26 Concentraciones de HAPs en 4 muestras diferentes de músculo de mantarraya *M. birostris*. 1= naftaleno; 2= 2-metilnaftaleno; 3=1-metilnaftaleno; 4= acenaftileno; 5= acenafteno; 6=fluoreno; 7= fenantreno; 8= antraceno; 9= fluoranteno; 10= pireno; 11=benzo[a]antraceno; 12= criseno; 13= benzo[b]fluoranteno; 14= benzo[k]fluoranteno; 15= benzo[a]pireno; 16= indeno[1,2,3-cd]pireno; 17= dibenzo[a,h]antraceno; 18= benzo[g,h,i]perileno.

Con los resultados obtenidos se puede apreciar que los organismos de *M. birostris* sufren cierta exposición a los HAPs en su hábitat natural. Sin embargo, los niveles encontrados solo superan las 100 ng g⁻¹ en dos de los organismos estudiados con lo cual se refleja el control que tienen las autoridades en la zona muestreada desde que fue declarada como zona protegida.

En un estudio realizado por Wang [34] se reportan concentraciones de HAPs parecidas a las obtenidas en *M. birostris* con valores de 12.5 a 22.0 ng g⁻¹ en diferentes muestras de músculo de pescado de una presa en China, no obstante también podemos encontrar trabajos como el de Bandowe [20] donde la concentración en músculo de pescado encontrada fue 192 ng g⁻¹ en las costas del golfo de Guinea en Ghana, así como en el de Ramos [35] donde se reportaron concentraciones de HAPs de bajas a moderadas (38.96 a 243.59 ng g⁻¹) en mejillones marrones en una bahía del océano atlántico en la costa de Brasil.

Si bien los trabajos antes mencionados no corresponden a muestras de *M. birostris* ni a organismos de su hábitat, nos da un panorama sobre el impacto que puede generar la contaminación por HAPs en diversas especies marinas como peces y mejillones en diferentes partes del mundo.

Conclusiones

- El sistema cromatográfico CG-DIF demostró ser lineal con coeficientes de determinación (r^2) mayores a 0.972, preciso con valores de C.V menores a 15 % y con límites de cuantificación entre 0.25 y 1.59 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para todos los HAPs en estudio.
- Las condiciones óptimas de extracción del método de DMFS fueron: 30 mg de músculo liofilizado, 120 mg de sílice C18, 30 mg de florisil como co-columna y elución con 4 mL de ACN grado cromatográfico.
- El método DMFS-CG-DIF demostró valores aceptables para la linealidad con coeficientes de determinación (r^2) mayores a 0.962, buena exactitud con recobros entre 71.37 y 102.08 %, buena precisión con C.V% < 15 y límites de cuantificación entre 0.045 y 0.105 $\mu\text{g g}^{-1}$.
- El método no proporcionó resultados satisfactorios para los analitos: Naftaleno, 2-metilnaftaleno y 1-metilnaftaleno.
- De las 18 muestras de músculo de mantarraya *M. birostris* analizadas por CG-EM, se encontraron HAPs en cuatro muestras en concentraciones en el orden de ng g^{-1} y solo dos de las muestras superaron los 100 ng g^{-1} .

Perspectivas del trabajo

Se espera que el método desarrollado sea una herramienta que permita a los investigadores del CICIMAR-IPN determinar la presencia de HAPs en muestras pequeñas de tejido de diferentes poblaciones de *M. birostris* así como de otras especies de mantarraya, dejando así en evidencia el impacto de la contaminación por HAPs en la zona del Archipiélago de Revillagigedo.

Anexo I

Sección 1 cromatograma

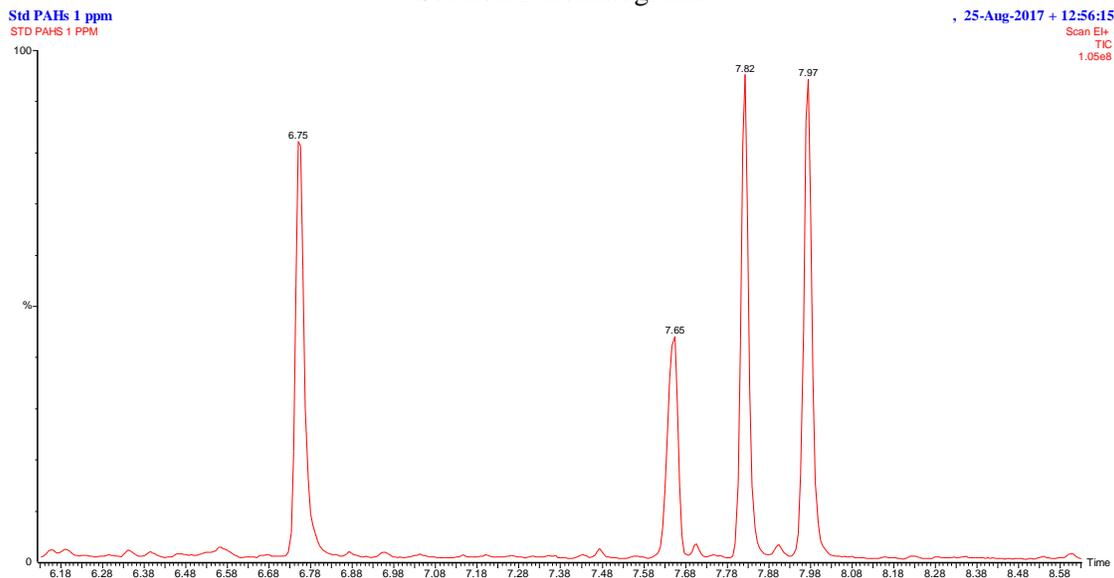


Figura 27 Espectros de masas de los analitos de interés en la sección 1 del cromatograma.

tr = 6.75 min Naftaleno (1)

Std PAHs 1 ppm

STD PAHS 1 PPM 472 (6.753)

, 25-Aug-2017 + 12:56:15

Scan EI+
4.15e7

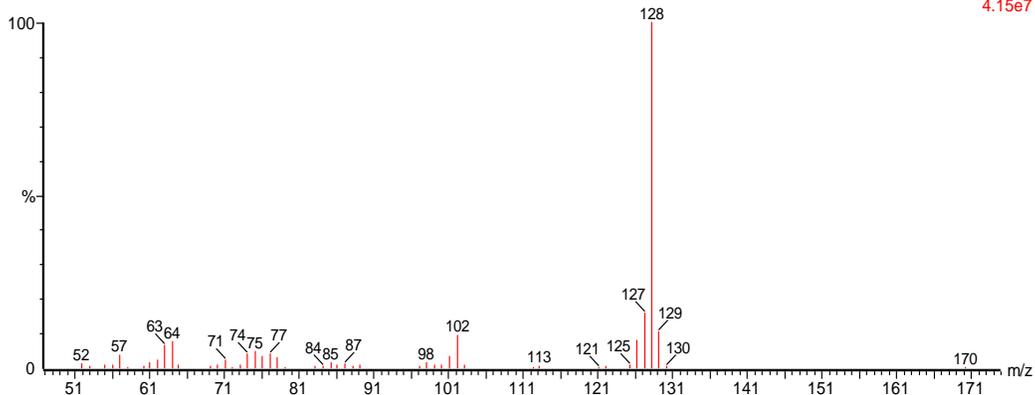


Figura 28 Espectro de masas del Naftaleno en blanco fortificado a 1 ppm.

tr = 7.82 min 2- Metil naftaleno (2)

Std PAHs 1 ppm

STD PAHS 1 PPM 655 (7.821)

, 25-Aug-2017 + 12:56:15

Scan EI+
2.98e7

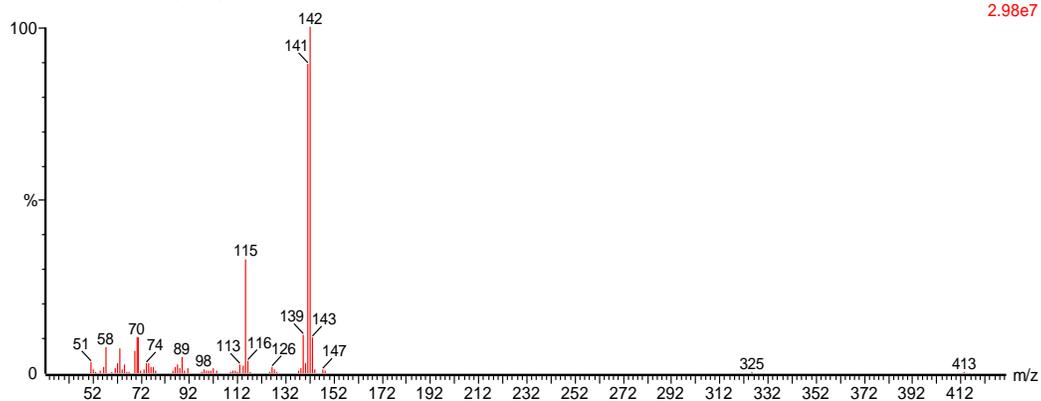


Figura 29 Espectro de masas del 2- Metil naftaleno en blanco fortificado a 1 ppm.

tr = 7.97 min 1-Metil naftaleno (3)

Std PAHs 1 ppm

STD PAHS 1 PPM 681 (7.973)

, 25-Aug-2017 + 12:56:15

Scan EI+
2.84e7

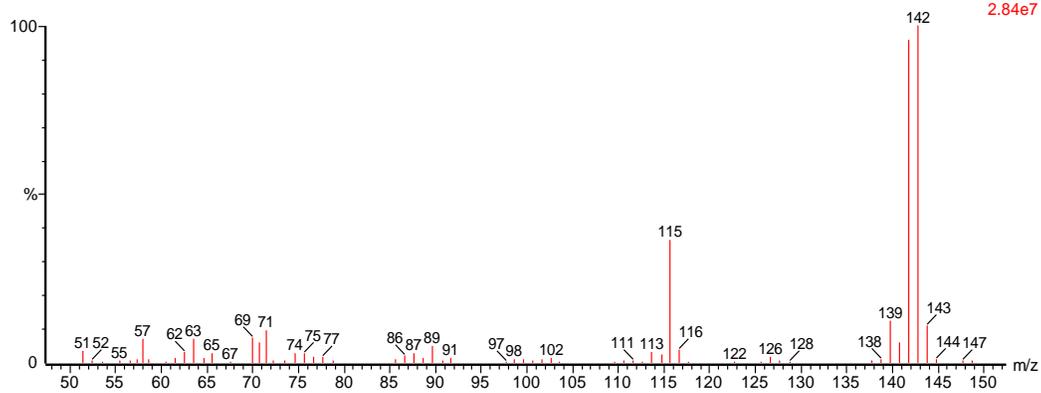


Figura 30 Espectro de masas del 1- Metil naftaleno en blanco fortificado a 1 ppm.

Sección 2 Cromatograma

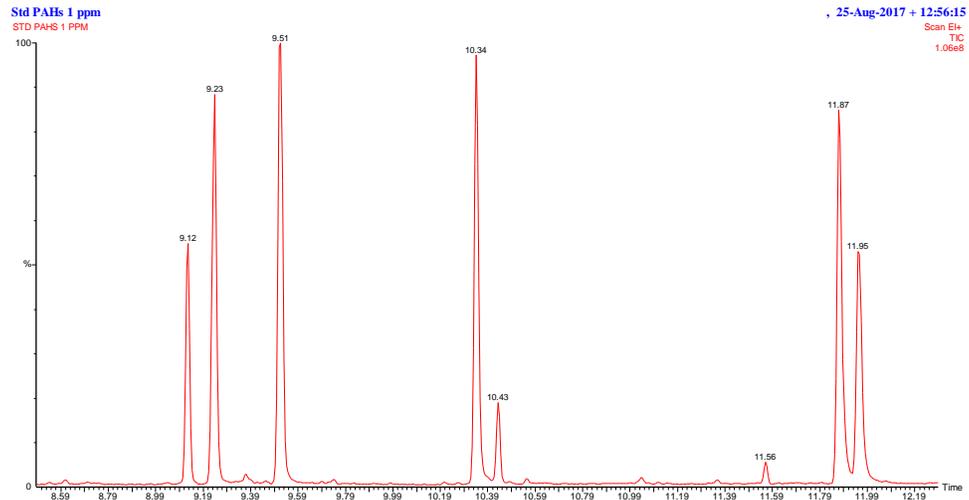


Figura 31 Espectros de masas de los analitos de interés en la sección 2 del cromatograma.

tr = 9.23 min Acenaftileno (4)

Std PAHs 1 ppm

STD PAHS 1 PPM 897 (9.234)

, 25-Aug-2017 + 12:56:15

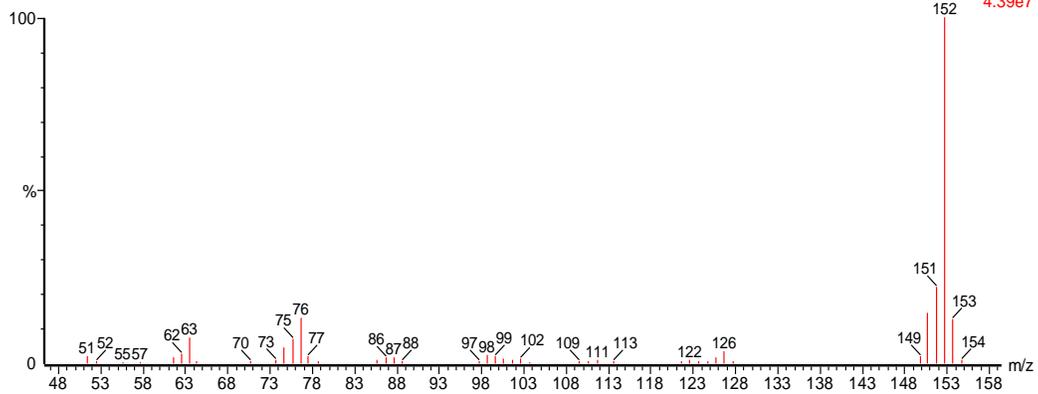
Scan EI+
4.39e7

Figura 32 Espectro de masas del Acenaftileno en blanco fortificado a 1 ppm.

tr = 9.51 min Acenafteno (5)

Std PAHs 1 ppm

STD PAHS 1 PPM 944 (9.508)

, 25-Aug-2017 + 12:56:15

Scan E1+
2.71e7

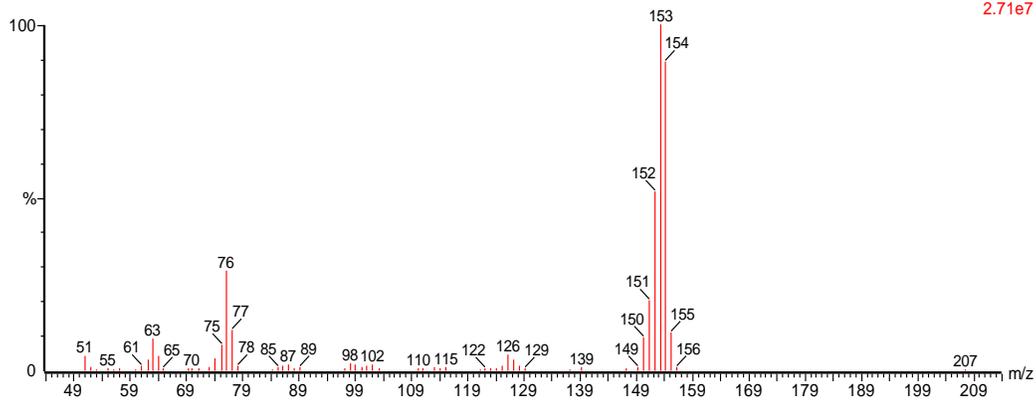


Figura 33 Espectro de masas del Acenafteno en blanco fortificado a 1 ppm.

tr = 10.34 min Fluoreno (6)

Std PAHs 1 ppm

STD PAHS 1 PPM 1086 (10.336)

, 25-Aug-2017 + 12:56:15

Scan E1+
2.88e7

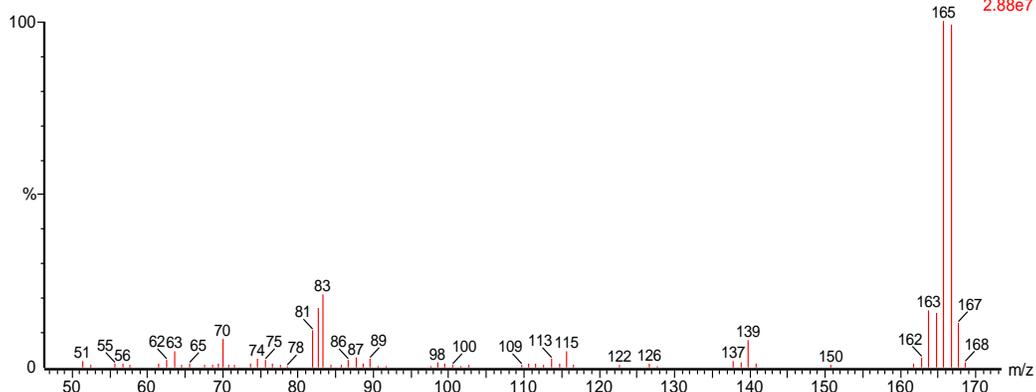


Figura 34 Espectro de masas del Fluoreno en blanco fortificado a 1 ppm.

tr = 11.87 min Fenantreno (7)

Std PAHs 1 ppm

STD PAHS 1 PPM 1349 (11.871)

, 25-Aug-2017 + 12:56:15

Scan EI+
3.25e7

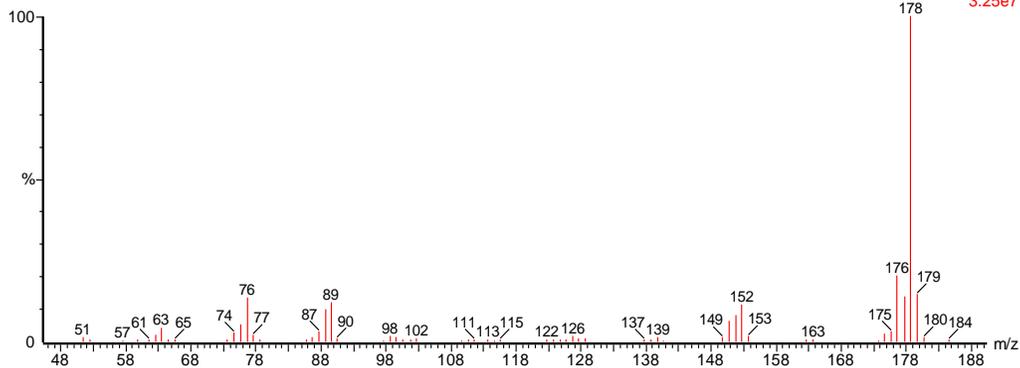


Figura 35 Espectro de masas del Fenantreno en blanco fortificado a 1 ppm.

tr = 11.95 min Antraceno (8)

Std PAHs 1 ppm

STD PAHS 1 PPM 1362 (11.947)

, 25-Aug-2017 + 12:56:15

Scan EI+
2.24e7

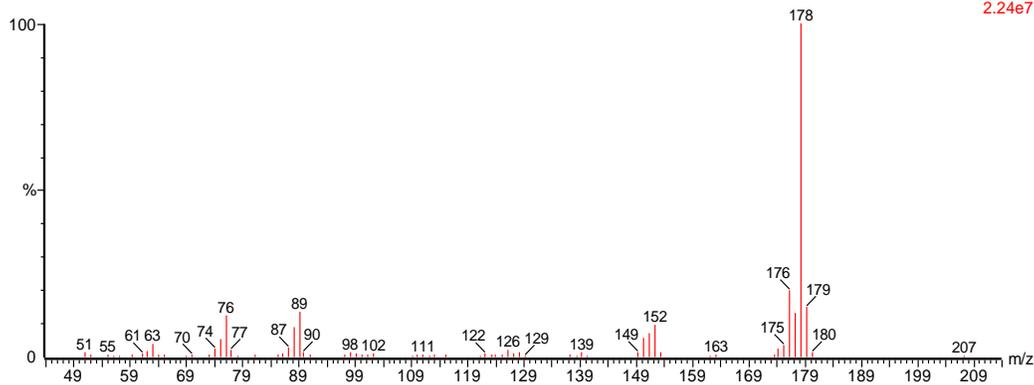


Figura 36 Espectro de masas del Antraceno en blanco fortificado a 1 ppm.

Sección 3 cromatograma

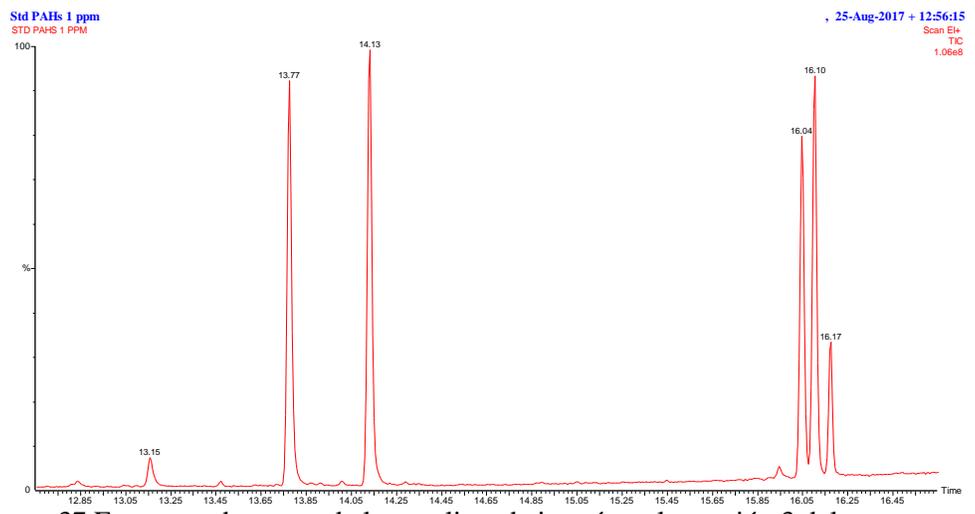


Figura 37 Espectros de masas de los analitos de interés en la sección 3 del cromatograma.

tr = 13.77 min Fluoranteno (9)

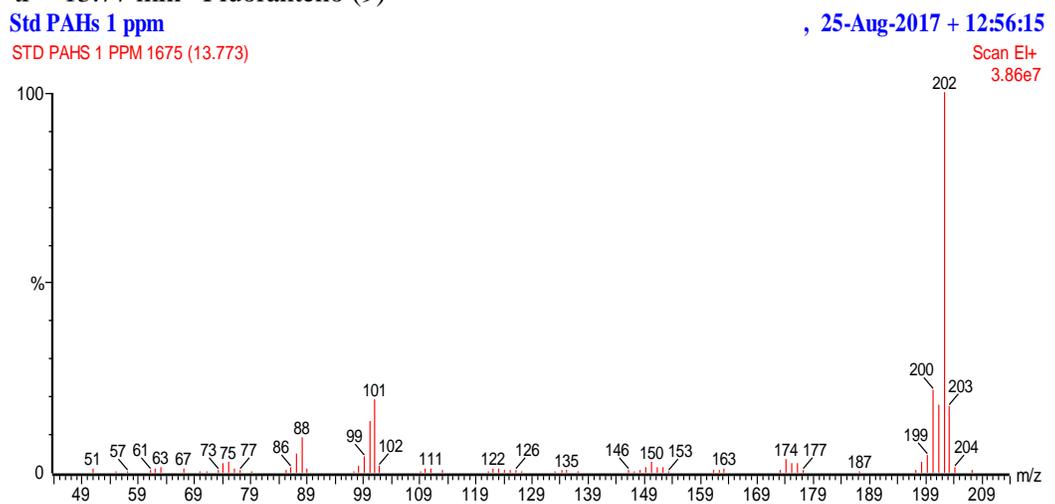


Figura 38 Espectro de masas del Fluoranteno en blanco fortificado a 1 ppm.

tr = 14.13 min Pireno (10)

Std PAHs 1 ppm

STD PAHS 1 PPM 1736 (14.129)

, 25-Aug-2017 + 12:56:15

Scan E1+
3.97e7

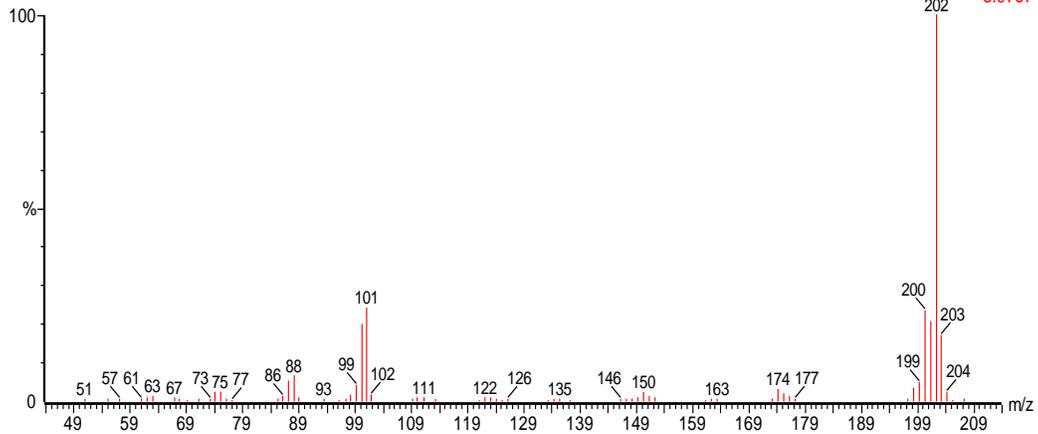


Figura 39 Espectro de masas del Pireno en blanco fortificado a 1 ppm.

tr = 16.04 min Benzo(a)antraceno (11)

Std PAHs 1 ppm

STD PAHS 1 PPM 2064 (16.043)

, 25-Aug-2017 + 12:56:15

Scan E1+
2.82e7

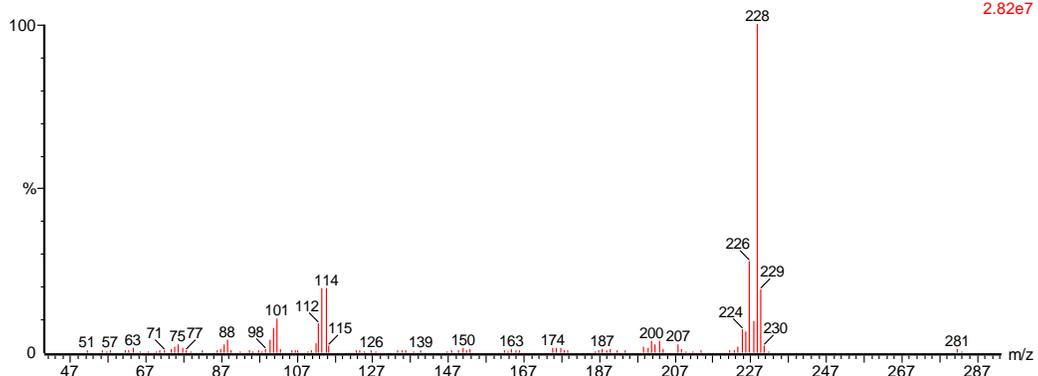


Figura 40 Espectro de masas del Benzo(a)antraceno en blanco fortificado a 1 ppm.

tr = 16.10 min Criseno (12)

Std PAHs 1 ppm

STD PAHS 1 PPM 2074 (16.102)

, 25-Aug-2017 + 12:56:15

Scan E1+
3.06e7

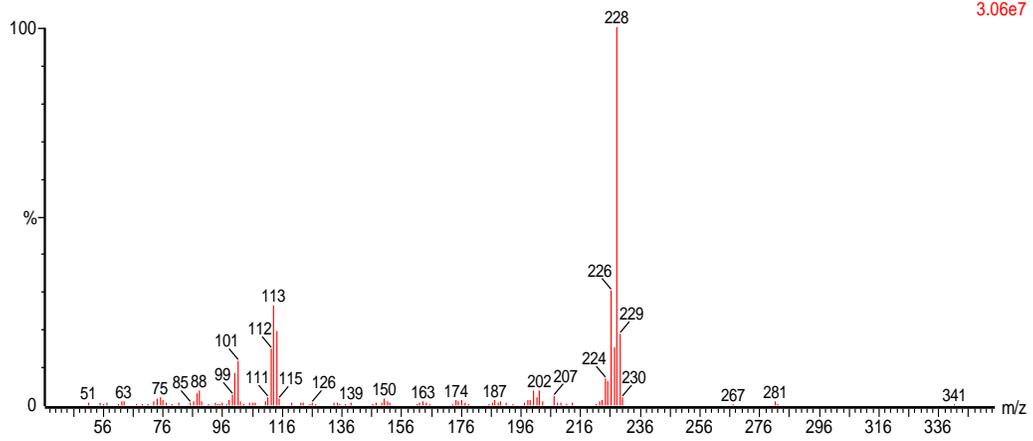


Figura 41 Espectro de masas del Criseno en blanco fortificado a 1 ppm.

Sección 4 cromatograma

Std PAHs 1 ppm
STD PAHS 1 PPM

, 25-Aug-2017 + 12:56:15
Scan E1+
TIC
8.49e7

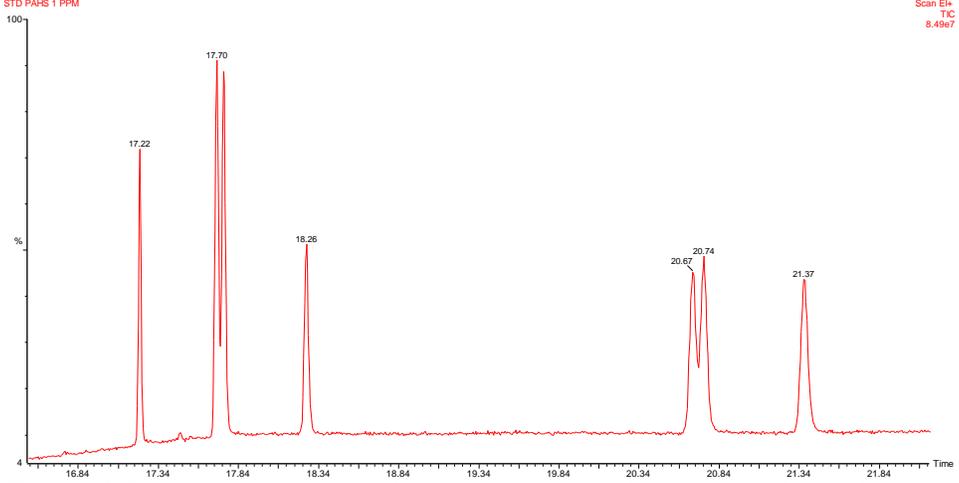


Figura 42 Espectros de masas de los analitos de interés en la sección 4 del cromatograma.

tr = 17.70 min benzo(b)fluoranteno (13)

Std PAHs 1 ppm

STD PAHS 1 PPM 2348 (17.701)

, 25-Aug-2017 + 12:56:15

Scan E1+
2.38e7

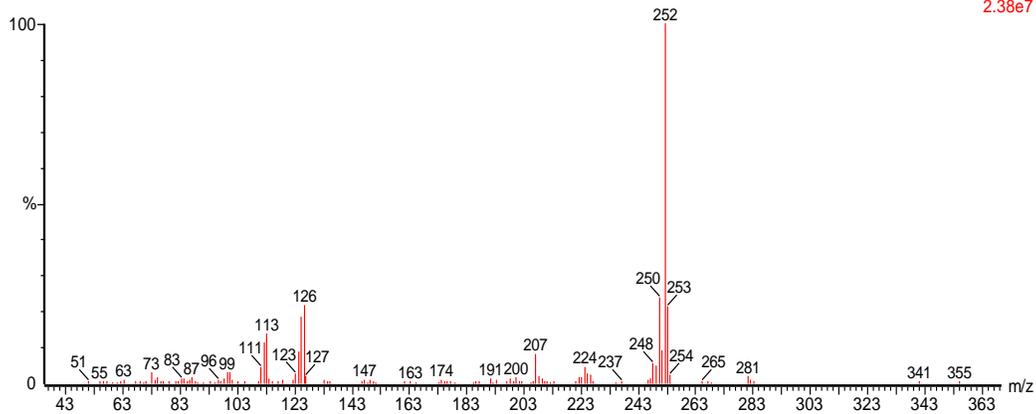


Figura 43 Espectro de masas del benzo(b)fluoranteno en blanco fortificado a 1 ppm.

tr = min 17.74 benzo(k)fluoranteno (14)

Std PAHs 1 ppm

STD PAHS 1 PPM 2356 (17.747)

, 25-Aug-2017 + 12:56:15

Scan E1+
2.13e7

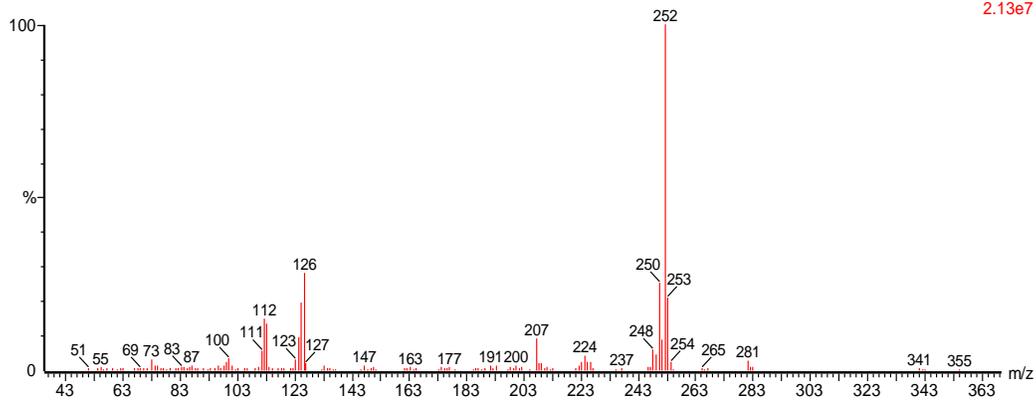


Figura 44 Espectro de masas del benzo(k)fluoranteno en blanco fortificado a 1 ppm.

tr = 18.26 min benzo(a)pireno (15)

Std PAHs 1 ppm

STD PAHS 1 PPM 2444 (18.261)

, 25-Aug-2017 + 12:56:15

Scan EI+
1.14e7

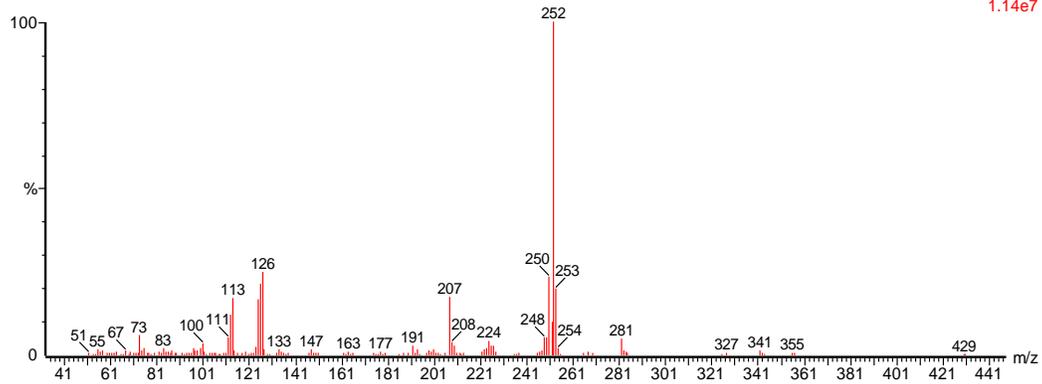


Figura 45 Espectro de masas del benzo(a)pireno en blanco fortificado a 1 ppm.

tr = 20.67 min Indeno(1,2,3,c,d)pireno (16)

Std PAHs 1 ppm

STD PAHS 1 PPM 2857 (20.671)

, 25-Aug-2017 + 12:56:15

Scan EI+
9.24e6

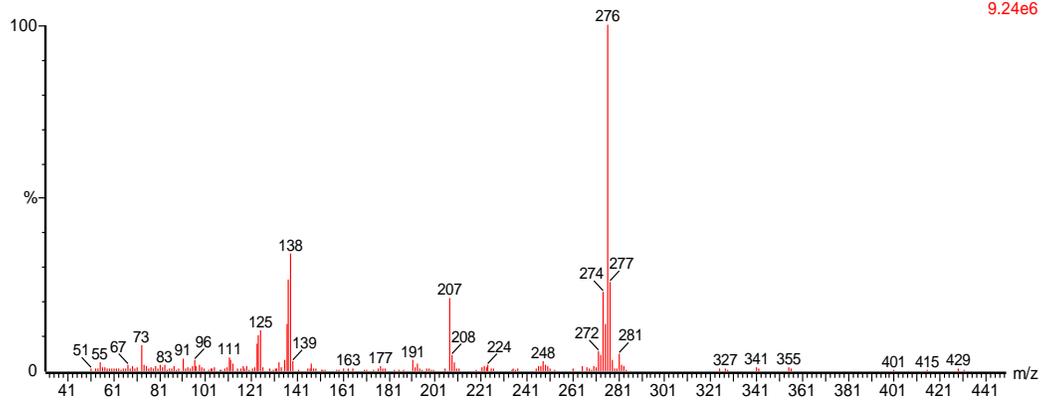


Figura 46 Espectro de masas del Indeno(1,2,3,c,d)pireno en blanco fortificado a 1 ppm.

tr = 20.74 min dibenzo(a,h)antraceno (17)

Std PAHs 1 ppm

STD PAHS 1 PPM 2869 (20.741)

, 25-Aug-2017 + 12:56:15

Scan E+
9.75e6

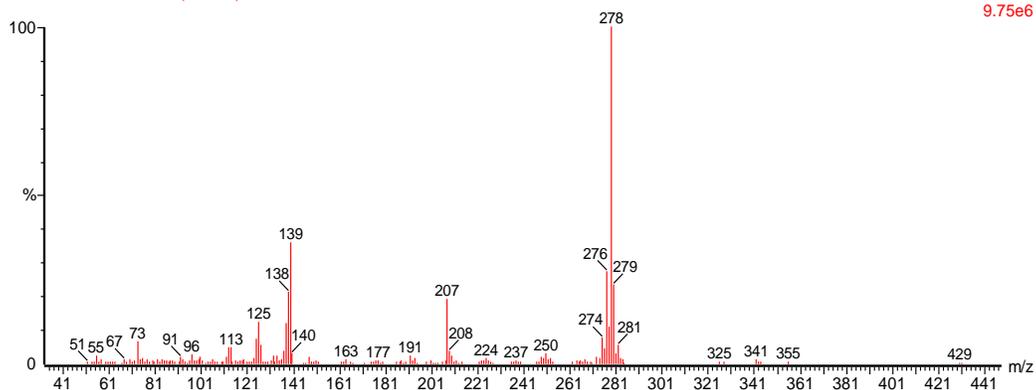


Figura 47 Espectro de masas del dibenzo(a,h)antraceno en blanco fortificado a 1 ppm.

tr = 21.37 min benzo(g,h,i)perileno (18)

Std PAHs 1 ppm

STD PAHS 1 PPM 2977 (21.371)

, 25-Aug-2017 + 12:56:15

Scan E+
8.90e6

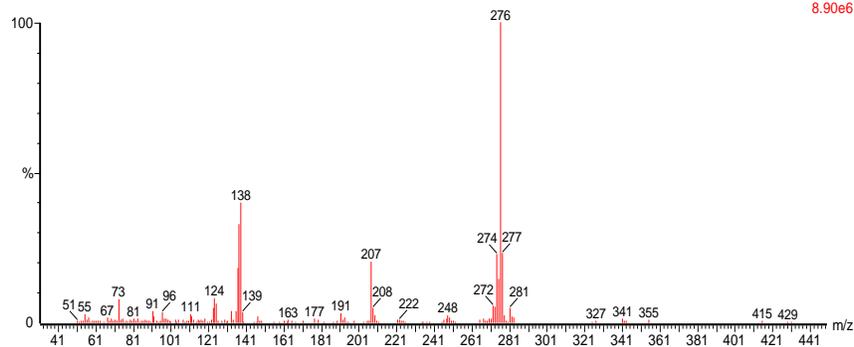


Figura 48 Espectro de masas del benzo(g,h,i)perileno en blanco fortificado a 1 ppm.

ANEXO II

Constancias de participación en Congresos Nacionales e internacionales.

Número de control: ICBJ-AMQ/193617/2018



La Asociación Mexicana de Química Analítica A. C. y el Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo otorgan el presente

RECONOCIMIENTO

A: David Olguín Luna, Irma Cruz Gavilán García, Tania Pelamatti,
José de Jesús Olmos Espejel

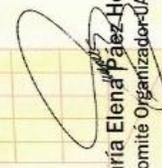
Por haber obtenido el **PRIMER LUGAR** en el concurso de trabajos libres estudiantiles en la modalidad **CARTEL** con la presentación **"ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN MUESTRAS DE MÚSCULO DE MANTARRAYA GIGANTE"**, en el marco de las actividades del **XXXI Congreso Nacional de Química Analítica** celebrado del 13 al 15 de junio de 2018 en el Centro de Negocios Universidad - UAEH.

Mineral de la Reforma, Hgo., a 15 de junio de 2018


Dr. Oscar Suárez Castillo
Director del ICBJ-UAEH


Dra. María Teresa Ramírez Silva
Presidenta del AMQA


Dra. Qijvia Zamora Martínez
Presidenta de la Junta de Representantes-AMQA


Dra. María Elena Páez Hernández
Comité Organizador-UAEH



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Otorga el presente

4° CONGRESO DE CIENCIA, EDUCACIÓN Y TECNOLOGÍA



RECONOCIMIENTO

A: David Olguín Luna, Irma Cruz Gavilán García,
Tania Pelamatti, José de Jesús Olmos Espejel

Por obtener el 2° LUGAR

En la exposición de carteles del área de Ciencias Químicas, con el trabajo titulado:

**“ANÁLISIS DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN
MUESTRAS DE MÚSCULO DE MANTARRAYA GIGANTE”**

que se llevó a cabo los días:
19 al 22 de junio de 2018
en las instalaciones de esta Facultad

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 22 de junio de 2018

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

4° CONGRESO

4° CONGRESO



4° CONGRESO
CIENCIA, EDUCACIÓN
Y TECNOLOGÍA

European Elasmobranch Association
22nd annual conference
 12 - 14 October, Peniche - Portugal
 Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar

POLICY AND CONSERVATION FOR A BRIGHTER BLUE FUTURE



best student platform presentation

Tania Pelamatti, Edgar Hoyos, Iliana Fonseca, Lorena Rios, Rogelio Gonzalez, Irma Gavilán, José Olmos, David Olguin, Ana Marmolejo, Felipe Galván
ARE OCEANIC MANTA RAYS EXPOSED TO THE THREAT OF PLASTIC POLLUTION?

Luís Alves
 Chair of the EEA2018



hosted by

Referencias

1. Ruiz Sakamoto, A., C. Sánchez Ortiz, J.D. Stewart, O. Aburto Oropeza and *La manta gigante: el diamante de Revillagigedo*, in *CONABIO. Biodiversitas*. 2018. p. 1-7.
2. IUCN, *Evaluación técnica del Archipiélago de Revillagigedo 2016: latinoamerica y caribe*. p. 83-93.
3. Freedman, R. and S. Sen Roy, *Spatial patterning of Manta birostris in United States east coast offshore habitat*. Applied Geography, 2012. **32**(2): p. 652-659.
4. Lavender Law Kara, M.t.F.S.E., Goodwin Deborah S., Zettler Erik R, Emelia DeForce, Kukulka Tobias, Proskurowski Giora, *Distribution of Surface Plastic Debris in the Eastern Pacific Ocean from an 11-Year Data Set*. Environ. Sci. Technol, 2014(48): p. 4732-4738.
5. Stewart, J.D., et al., *Spatial ecology and conservation of Manta birostris in the Indo-Pacific*. Biological Conservation. 2016. **200**: p. 178-183.
6. Alchetron. *Manta ray*. 2018; Available from: <https://alchetron.com/Manta-ray>.
7. ATSDR, *Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*, in *Case Studies in Environmental Medicine*. 2012: Atlanta, GA. p. 1-68.
8. Dybing E., S.E., Pennin M. T., *POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN AMBIENT AIR AND CANCER*, in *IARC Scientific Publications*. 2011. p. 75-89.
9. Hayakawa, K., *Chemistry of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons (NPAHs) and Other Oxidative Derivatives of PAHs*. Hayakawa K. (eds) Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, 2018.
10. Pérez Morales G., P.M.G., A. Haza Duaso, *Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs): toxicidad, exposición de la población y alimentos implicados.*, in *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 2016: Madrid, España. p. 2-10.
11. Kim S, T.P., Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, Han L, He J, He S, Shoemaker BA, Wang J, Yu B, Zhang J, Bryant SH., *PubChem Substance and Compound databases*. *Nucleic Acids Res*. 2016.
12. Claudio Jiménez Cartagena, D.E.L.P., Gustavo Antonio Peñuela Mesa, *Retos analíticos y perspectivas instrumentales del monitoreo de pesticidas.*, C.U. Lasallista, Editor. 2011. p. 324-325.
13. Capriotti, A.L., et al., *Recent advances and developments in matrix solid-phase dispersion*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2015. **71**: p. 186-193.
14. Barker, S.A., *Matrix solid phase dispersion (MSPD)*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2007. **70**(2): p. 151-162.
15. Kristenson, E.M., U.A.T. Brinkman, and L. Ramos, *Recent advances in matrix solid-phase dispersion*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2006. **25**(2): p. 96-111.
16. Polo L. M., *Fundamentos de Cromatografía*. 2015, España: Dextra Editorial.
17. Medical, T.S.a. *Training - GC injection*. 2018; Available from: <https://www.trajanscimed.com/pages/training-gc-injection>.
18. Kim, I.-Y.S., Sang-Hoon & Lee, In-Kyu & R. Wolfe, Robert, *Applications of Stable, Nonradioactive Isotope Tracers in In vivo Human Metabolic Research*. Experimental and Molecular Medicine, 2016(48).
19. Skoog D.A., W.D.M., Holler F., Crouch S., *Fundamentos de Química Analítica*. 2015, México D.F: CENGAGE Learning.

20. Bandowe, B.A.M., et al., *Polycyclic aromatic compounds (PAHs and oxygenated PAHs) and trace metals in fish species from Ghana (West Africa): Bioaccumulation and health risk assessment*. Environment International, 2014. **65**: p. 135-146.
21. Cloutier, P.-L., et al., *QuEChERS extraction for multi-residue analysis of PCBs, PAHs, PBDEs and PCDD/Fs in biological samples*. Talanta, 2017. **165**: p. 332-338.
22. Aguinaga, N., et al., *Evaluation of solid-phase microextraction conditions for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic species using gas chromatography*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **391**(4): p. 1419-1424.
23. Olson, G.M., B.M. Meyer, and R.J. Portier, *Assessment of the toxic potential of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) affecting Gulf menhaden (Brevoortia patronus) harvested from waters impacted by the BP Deepwater Horizon Spill*. Chemosphere, 2016. **145**: p. 322-328.
24. Peña A., M.J., Labastida C. & Capella S., *Extracción en Fase Sólida como una alternativa para el procedimiento de limpieza en la determinación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos por Cromatografía de Gases: aplicación a organismos marinos*, in Rev. Int. Contam. Ambient. 2003. p. 13-23.
25. Lacroix, C., et al., *Development of an innovative and “green” stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–tandem mass spectrometry method for quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine biota*. Journal of Chromatography A, 2014. **1349**: p. 1-10.
26. Hossain, M.A., et al., *Naphthalene, a polycyclic aromatic hydrocarbon, in the fish samples from the Bangsai river of Bangladesh by gas chromatograph–mass spectrometry*. Arabian Journal of Chemistry, 2014. **7**(6): p. 976-980.
27. Liguori, L., et al., *An automated extraction approach for isolation of 24 polyaromatic hydrocarbons (PAHs) from various marine matrixes*. Analytica Chimica Acta, 2006. **573-574**: p. 181-188.
28. Sun, R.-X., et al., *Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments and marine organisms from the Daya Bay, South China*. Marine Pollution Bulletin, 2016. **103**(1): p. 325-332.
29. Ke, C.-L., et al., *Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in wild marine organisms from South China Sea: Occurrence, sources, and human health implications*. Marine Pollution Bulletin, 2017. **117**(1): p. 507-511.
30. Sun, R., et al., *Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and marine organisms: Implications of anthropogenic effects on the coastal environment*. Science of The Total Environment, 2018. **640-641**: p. 264-272.
31. Xu, F.-L., et al., *Residual levels and health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons in freshwater fishes from Lake Small Bai-Yang-Dian, Northern China*. Ecological Modelling, 2011. **222**(2): p. 275-286.
32. Chatterjee, N.S., et al., *Multiresidue analysis of multiclass pesticides and polyaromatic hydrocarbons in fatty fish by gas chromatography tandem mass spectrometry and evaluation of matrix effect*. Food Chemistry, 2016. **196**: p. 1-8.
33. Fotografía de Tania Pellamatti. Archipiélago de Revillagigedo., (2018), Archivos de Tania Pellamatti, CICIMAR-IPN.
34. University of Tartu, Estonia, (2018)., Quantitative estimation of matrix effect, recovery and process efficiency; Available from:

https://sisu.ut.ee/lcms_method_validation/54-quantitative-estimation-matrix-effect-recovery-process-efficiency.

35. Cofepris-Comisión de control analítico y ampliación de cobertura (2017)., Criterios para la validación interna y confirmación de métodos fisicoquímicos.
36. European Commission, Directorate General for Health and Food Safety., Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed., (2017).
37. Wang, J., Bi, Y., Henkelmann, B., Pfister, G., Zhang, L., & Schramm, K.-W. (2016). *PAHs and PCBs accumulated by SPMD-based virtual organisms and feral fish in Three Gorges Reservoir, China*. Science of The Total Environment, 542, 899–907.
38. Ramos, A. B. A., Farias, C.O., Hamacher, C., & Araújo, M. (2017). *Assessment of PAHs occurrence and distribution in brown mussels (Perna perna Linnaeus 1758) subject to different levels of contamination in Brazil*. Regional Studies in Marine Science.