



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**Análisis de parabenos y filtros UV en músculo de pescado
utilizando un sistema cromatográfico en línea**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

P R E S E N T A :

GUADALUPE SAMARA GARDUÑO DURÁN

ASESOR:

DR. JOSÉ DE JESÚS OLMOS ESPEJEL

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
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.**

Análisis de parabenos y filtros UV en músculo de pescado utilizando un sistema cromatográfico en línea.

Que presenta la pasante: **Guadalupe Samara Garduño Durán**

Con número de cuenta: **414015872** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

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 13 de agosto de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|----------------------|------------------------------------|-------|
| PRESIDENTE | Dr. Julio César Botello Pozos | |
| VOCAL | M. en C. Enrique Ramos López | |
| SECRETARIO | Dr. José de Jesús Olmos Espejel | |
| 1er. SUPLENTE | M. en C. Gabriel Israel Nava Nabté | |
| 2do. SUPLENTE | Dra. Berenice Gómez Zaleta | |

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

Investigación financiada por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) a través del proyecto PAPIIT (IA204717).

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

Parte de este trabajo se presentó en:

XXI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Química Analítica del 11 al 15 de junio del 2018 celebrado en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, Hidalgo, en la modalidad de cartel.

IV Congreso de Ciencia, Educación y Tecnología del 19 al 22 de junio de 2018 celebrado en la FES Cuautitlán, UNAM, Cuautitlán Izcalli, México, en la modalidad cartel.

Agradecimientos

A mis padres María Rosio y José Francisco, porque palabras en papel jamás podrán expresar el cariño, admiración y agradecimiento que siento por ustedes, gracias por siempre estar ahí, sin importar cómo o cuando. Mi vida ha sido increíble por estar ustedes en ella y soy muy afortunada por ello. Gracias por dejarme soñar y ayudarme a cumplir esos sueños, son parte vital de cada logro de mi vida. Pero sobre todo, gracias por ser mis papás y darme más de lo que merezco. Los amo.

A mi hermano Daniel, tíos, abuelos y primos por darme alegría, amor, apoyo y ánimos en los momentos más difíciles. Gracias por confiar y creer en mí. Son la mejor familia que pude tener.

A mi asesor José de Jesús Olmos, por todo el apoyo que me dio durante y después de la realización de este trabajo. Gracias por compartir conmigo todos sus conocimientos, por sus consejos y por ser paciente y comprensivo conmigo.

A mis profesores, amigos y facultad por todos los conocimientos compartidos y las experiencias increíbles que me hicieron vivir y que quedarán siempre en mi mente.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-UNAM) por la beca de apoyo a la titulación que me fue otorgada.

Índice de Contenido

| | |
|---|-----------|
| <i>Índice de Contenido</i> | IV |
| <i>Índice de Tablas</i> | 1 |
| <i>Introducción</i> | 3 |
| <i>Resumen</i> | 5 |
| <i>Abreviaturas</i> | 6 |
| <i>Objetivos</i> | 7 |
| Objetivo General | 7 |
| Objetivos Particulares | 7 |
| <i>Capítulo 1. Antecedentes</i> | 8 |
| 1.1 Contaminantes emergentes | 8 |
| 1.1.1 Productos de cuidado personal | 9 |
| 1.2 Propiedades fisicoquímicas de los analitos de interés | 11 |
| 1.2.1 Parabenos | 11 |
| 1.2.2. Oxibenzona..... | 12 |
| 1.3 Extracción en Fase Sólida | 13 |
| 1.3.1 Extracción en Fase Sólida en línea | 14 |
| 1.4 Dispersión de Matriz en Fase Sólida | 16 |
| 1.5 Metodologías en línea para el análisis de parabenos y filtros UV | 19 |
| 1.6 Diseño factorial 3^k | 19 |

| | |
|---|-----------|
| Capítulo 2. Desarrollo Experimental | 28 |
| 2.1 Materiales y reactivos | 28 |
| 2.2 Instrumentación | 29 |
| 2.3 Preparación de los estándares | 30 |
| 2.4 Obtención de las muestras y tratamiento previo | 30 |
| 2.5 Separación cromatográfica de los analitos | 31 |
| 2.6 Optimización de la preconcentración de los analitos en el sistema EFS-HPLC-UV en línea utilizando un diseño factorial tipo 3^k | 31 |
| 2.7 Extracción en Fase Sólida en línea con Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (EFS-HPLC) | 32 |
| 2.8 Validación del sistema EFS-HPLC-UV en línea para el análisis de parabenos y filtros UV | 33 |
| 2.9 Dispersion de Matriz en Fase Sólida acoplada al método de EFS-HPLC-UV en línea para el análisis de músculo de pescado | 35 |
| 2.10 Validación del método por DMFS/EFS-HPLC-UV | 36 |
| 2.11 Aplicación del método al análisis de muestras de músculo de pescado (Tilapia) provenientes de diferentes puntos de venta | 37 |
| Capítulo 3. Resultados y análisis | 38 |
| 3.1 Separación de los analitos | 38 |
| 3.2 Optimización de la preconcentración de los analitos en el sistema EFS-HPLC-UV | 39 |
| 3.3 Validación del sistema EFS-HPLC-UV en línea | 42 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4 Validación del método DMFS/EFS-HPLC-UV en línea | 43 |
| 3.5 Aplicación del método DMFS/EFS-HPLC-UV a muestras comerciales de músculo de Tilapia Mojarra | 46 |
| <i>Capítulo 4. Conclusiones</i> | 48 |
| <i>Perspectivas</i> | 49 |
| <i>Anexos</i> | 50 |
| Anexo I | 50 |
| Anexo II | 53 |
| Anexo III | 56 |
| Referencias | 59 |

Índice de Tablas

| | |
|---|-----------|
| Tabla1. Clasificación general de los PCPs..... | 9 |
| Tabla 2. Ejemplos de estudios utilizando DMFS para el análisis de Parabenos y filtros UV..... | 18 |
| Tabla 3. Publicaciones recientes de análisis de parabenos y filtros UV utilizando un sistema en línea. | 20 |
| Tabla 4. Tipos de cromatografía | 23 |
| Tabla 5. Gradiente utilizado para la separación de los analitos evaluados | 31 |
| Tabla 6. Orden y condiciones de los experimentos realizados del diseño factorial 3k | 32 |
| Tabla 7. Procedimiento de la preconcentración en línea..... | 33 |
| Tabla 8. Análisis estadístico para la combinación de factores estudiados | 39 |
| Tabla 9. Porcentaje de recobro predicho con las condiciones óptimas de preconcentración para cada analito..... | 40 |
| Tabla 10. Condiciones cromatográficas utilizadas | 40 |
| Tabla 11. Resultados de los parámetros de validación del sistema EFS-HPLC-UV en línea | 42 |
| Tabla 12. Resultados obtenidos para la validación del método DMFS/EFS-HPLC-UV en línea | 44 |
| Tabla 13. Resultados de la validación del método DMFS-HPLC-UV | 45 |
| Tabla 14. . Comparación entre los límites de cuantificación alcanzados con el método de DMFS-HPLC reportado previamente y el método de DMFS/EFS-HPLC desarrollado..... | 45 |

Índice de Figuras

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Esquema del proceso en el que los PCPs llegan a los seres humanos | 10 |
| Figura 2. Estructura química de Metilparabeno (MP), Etilparabeno (EP) | 11 |
| Figura 3. Estructura química de la Oxibenzona | 13 |
| Figura 4. Procedimiento general de la EFS | 14 |
| Figura 5. Esquema de un sistema de EFS-HPLC en línea | 15 |
| Figura 6. Esquema general de la DMFS | 17 |
| Figura 7. Cromatograma típico..... | 24 |
| Figura 8. Elementos del pico cromatográfico..... | 25 |
| Figura 9. Procedimiento para la extracción de los analitos por DMFS | 35 |
| Figura 10. Cromatograma obtenido de una disolución estándar a una concentración de 200 ppb..... | 38 |
| Figura 11. Cromatogramas obtenidos con las condiciones óptimas para el sistema EFS-HPLC-UV a 254 nm..... | 41 |
| Figura 12. Cromatogramas obtenidos de los análisis realizados a las muestras de músculo | 46 |
| Figura 13. Espectros de las muestras de la laguna de Hidalgo comparados con el espectro de la oxibenzona..... | 47 |

Introducción

Los parabenos son antimicrobianos utilizados como conservadores en una amplia variedad de productos. Se estima que entre el 75 y 90 % de los productos cosméticos contienen parabenos para prevenir el crecimiento de bacterias y hongos, pero también pueden causar efectos secundarios en los consumidores. Los compuestos metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno y butilparabeno son los analitos comúnmente utilizados en diferentes productos.

Por otro lado, la excesiva exposición a la radiación UV es considerada un problema de salud pública en todo el mundo. Los filtros UV son un grupo amplio de compuestos químicos que proporcionan protección efectiva contra este tipo de radiación. La benzofenona-3, es el filtro UV de mayor uso en los bloqueadores solares donde el 59 % de los productos lo contienen y también es encontrado en las superficies de las envolturas de diferentes alimentos ya que se utiliza como estabilizador. Estos compuestos se han relacionado a problemas de fertilidad, sensibilidad de la piel e incluso al aumento en los casos de cáncer de mama. Aunque la exposición en humanos se da principalmente a través de la permeación cutánea, la exposición vía oral no se puede descartar por la ingesta de alimentos y agua contaminada.

La EFS en línea es una técnica alternativa adecuada para la preparación de muestras, ya que el procedimiento de pretratamiento de la muestra es mínimo y los límites de cuantificación se reducen drásticamente [2]. Además, es una técnica muy poco costosa al utilizar muy pocas cantidades de reactivos y muestra, fácil de realizar, rápida, se disminuye la cantidad de residuos analíticos y los errores de manipulación de la muestra son mínimos

[2], así como también se eliminan las impurezas o interferentes de la muestra que pueden afectar el análisis de los analitos [3].

Existen pocos estudios respecto a este tema por lo que en esta tesis se presenta el acople de una metodología de extracción de parabenos y filtros UV mediante Dispersión de Matriz en Fase Sólida, previamente reportada en la tesis de León (2018) [4] con un sistema de EFS-HPLC-UV en línea para el análisis de extractos obtenidos a partir de muestras de músculo de pescado (Tilapia Mojarra), con el objetivo de disminuir los límites de detección y cuantificación de estos analitos. El acople del sistema en línea permitirá monitorear concentraciones de los analitos a niveles de trazas y se espera que sea una herramienta útil para el monitoreo de estos contaminantes.

En el primer capítulo se encuentran los temas considerados como antecedentes de este trabajo entre los que se incluyen una breve descripción de los contaminantes emergentes que fueron analizados, así como el sistema en línea utilizado para su análisis y el diseño de experimentos aplicado para la optimización del método.

En el segundo capítulo se aborda la metodología llevada a cabo para la realización de esta tesis, en la cual se explican las condiciones de la separación cromatográfica, así como de la preconcentración y análisis con el sistema EFS en línea.

Finalmente se encuentran los resultados y conclusiones a las que se llegaron en este trabajo.

Resumen

Para el análisis de parabenos y filtros UV, la técnica de preparación de muestra más recurrida es la Extracción en Fase Sólida (EFS), la cual permite realizar la extracción, limpieza, concentración y fraccionamiento de compuestos orgánicos de diversos tipos de muestras [1].

En el presente trabajo se desarrolló un método utilizando la técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) para la extracción de estos compuestos en muestras de músculo de Tilapia Mojarra, utilizando sílice C18 y músculo de Tilapia Mojarra. Después de homogenizar la mezcla, ésta se empaca en un cartucho para EFS de 6 mL que contiene una co-columna de florisil y los analitos se eluyen con acetonitrilo. Después de evaporar a sequedad el extracto, se resuspende con 4 mL de una mezcla metanol:agua (10:90). La mezcla se preconcentra y analiza utilizando un sistema de Extracción en Fase Sólida y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución en línea (EFS-HPLC), que consiste de una precolumna C18 conectada a una válvula de dos posiciones y seis vías, y un cromatógrafo de líquidos con detector UV y una columna analítica C18. Como fase móvil se utilizó un gradiente lineal con metanol (A) y agua (B) y los analitos se monitorearon a 240 y 290 nm.

El método permite analizar a los cuatro parabenos y oxibenzona con límites de cuantificación mayores a $40 \mu\text{g kg}^{-1}$, buena repetibilidad con coeficientes de variación porcentual (% C.V.) menores a 20%. Se alcanzaron recobros entre 40 a 73 % que resultaron constantes en el intervalo de concentraciones de 80 a $2000 \mu\text{g kg}^{-1}$. El método se aplicó a muestras de músculo de Tilapia Mojarra comerciales y se encontraron residuos de oxibenzona en dos de las muestras analizadas.

Abreviaturas

PCPs: Productos de cuidado personal

EFS: Extracción en Fase Sólida

HPLC: Cromatografía de Líquidos de
Alta Resolución

DMFS: Dispersión de Matriz en Fase
Sólida

MeOH: Metanol

Vol.: Volumen

LD: Límite de detección

LC: Límite de cuantificación

C.V. Coeficiente de Variación

MP: Metilparabeno

EP: Etilparabeno

PP: Propilparabeno

BP: Butilparabeno

BP-3: Oxibenzona

ng: nanogramos

µg: microgramos

mL: mililitro

ACN: Acetonitrilo

B.A. Bomba Auxiliar

B.C. Bomba Cromatográfica

UVA: Rayos Ultravioleta de onda larga

UVB: Rayos Ultravioleta de onda media

DEET: N,N-Dietil-meta-toluamida

2-EHMC: Metoxiciamato de Etilbexilo

Objetivos

Objetivo General

- Desarrollar una metodología que acople la extracción en fase sólida en línea con un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución y detección UV para el análisis y monitoreo de los compuestos metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno y oxibenzona en muestras de músculo de pescado adquiridas en diferentes puntos de venta.

Objetivos Particulares

- Optimizar la preconcentración de los analitos en el sistema de Extracción en Fase Sólida y Cromatografía de Líquidos en línea (EFS-HPLC-UV) mediante la aplicación de un diseño de experimentos tipo 3^k para obtener los mejores recobros para todos los analitos.
- Validar el sistema EFS-HPLC-UV en línea con las condiciones óptimas para la recuperación de los analitos evaluando la repetibilidad, linealidad, exactitud, límites de detección y de cuantificación.
- Acoplar un método desarrollado previamente para la extracción de los analitos en muestras de músculo de pescado mediante Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) y realizar el análisis de los extractos con el sistema EFS-HPLC-UV.
- Validar el método DMFS fuera de línea acoplado al sistema EFS-HPLC-UV en línea (DMFS/EFS-HPLC-UV) para determinar parabenos y filtros UV en músculo de pescado evaluando la repetibilidad, linealidad, exactitud, límites de detección y de cuantificación.
- Analizar muestras de músculo obtenidas de diferentes puntos de venta mediante el método de DMFS/EFS-HPLC-UV para determinar si se encuentran contaminadas con los analitos de interés.

Capítulo 1. Antecedentes

1.1 Contaminantes emergentes.

Para satisfacer la creciente demanda de la población mundial por mejorar su apariencia personal, miles de productos se elaboran diariamente, ocasionando un aumento descontrolado en las emisiones de contaminantes químicos al ambiente. Algunos de éstos son tóxicos, persistentes, bioacumulables y biomagnificables [5]. Investigaciones recientes revelan la presencia de una multitud de contaminantes orgánicos en diferentes cuerpos de agua y que se concentran en el intervalo de los ng L^{-1} a $\mu\text{g L}^{-1}$ [6].

Algunos ejemplos de estos contaminantes son los fármacos, productos de cuidado personal y de belleza, surfactantes, retardantes de fuego, esteroides, hormonas y desinfectantes. Estos productos corresponden en la mayoría de los casos a contaminantes que pueden ser candidatos a regulación. Sin embargo, aún se requiere de una amplia investigación sobre sus efectos potenciales en la salud [5].

La atenuación natural de estos contaminantes y los tratamientos convencionales de las aguas residuales no son capaces de removerlos totalmente y se ha reportado que se acumulan en diferentes entidades, como los organismos acuáticos e inclusive en humanos [6].

Dentro de los contaminantes emergentes se encuentran los parabenos y filtros UV. Los primeros son ésteres del ácido p-hidroxibenzoico ampliamente utilizados como conservadores en productos cosméticos, farmacéuticos y en el procesamiento de alimentos [7]. Mientras que los filtros UV se han usado desde hace dos décadas para mitigar los efectos perjudiciales los rayos UVA y UVB que son lo suficientemente fuertes para

contribuir a la predisposición de la piel a desarrollar cáncer [8]. Sin embargo, es poco lo que se conoce sobre el impacto que los filtros UV causan a la salud de las personas y se ha reportado en algunos trabajos que también pueden actuar como disruptores endócrinos [9].

1.1.1 Productos de cuidado personal

Los Productos de cuidado personal (PCPs) son un grupo diverso de artículos de uso cotidiano como jabones, lociones, pastas dentales, fragancias y protectores solares, por mencionar algunos. Las principales clases de PCPs se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación general de los PCPs

| Clase | Ejemplos |
|-------------------------------|------------------------------------|
| Desinfectantes | Triclosán y triclocarbán |
| Fragancias | Almizcles y nitroalmizcles |
| Repelentes de insectos | DEET y 1,4 Diclorobenceno |
| Conservadores | Parabenos |
| Filtros UV | Oxibenzona, Octocrileno, 2-EHMC |

Las fuentes de origen de los PCPs en el ambiente provienen de la gran variedad de productos de uso personal y para el cuidado del hogar y sus ingredientes han comenzado a llamar la atención como contaminantes emergentes debido a su existencia ubicua en el medio ambiente. [10].

La mayoría de los PCPs terminan en las aguas residuales de los hogares que normalmente son tratadas en plantas de tratamiento de aguas residuales o son directamente liberadas al medio ambiente. Debido a la remoción incompleta de los PCPs en las plantas de

tratamiento, éstos pueden ser detectados en los efluentes, en cuerpos de agua superficial, así como en los sedimentos [10].

La peligrosidad de los contaminantes emergentes radica en que se pueden bioacumular en los organismos acuáticos y se ha reportado su presencia en muestras de tejido de peces, los cuáles posteriormente pueden ser consumidos por los seres humanos contribuyendo así al proceso de biomagnificación en la cadena alimenticia [10]. En la Figura 1 se presenta un esquema general del proceso de distribución de los PCPs en el ambiente.

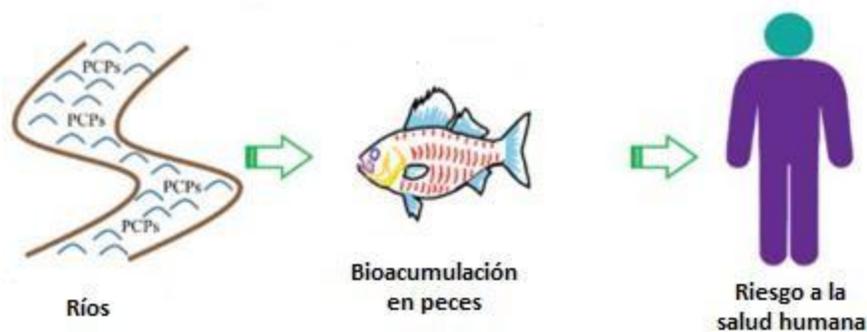


Figura 1. Esquema del proceso en el que los PCPs llegan a los seres humanos.

Según las investigaciones de Brausch y Rand [9] en donde se reportan estudios en diferentes organismos, se ha demostrado que la exposición a contaminantes como los parabenos en concentraciones relevantes puede causar efectos estrogénicos, ya que estos funcionan como disruptores endócrinos. Estudios adicionales en ratas han demostrado que el butil y el propilparabeno inhiben significativamente la espermatogénesis.

De igual manera los filtros UV pueden causar alteraciones hormonales como actividad estrogénica o afectaciones a la producción de hormonas esteroideas [9].

1.2 Propiedades fisicoquímicas de los analitos de interés.

1.2.1 Parabenos

Los parabenos (alquil-p-hidroxibenzoatos) son conservantes antimicrobianos utilizados en cosméticos, artículos de tocador, productos farmacéuticos y alimentos. Actualmente hay siete diferentes tipos de parabenos en uso (bencilo, butilo, etilo, isobutilo, isopropilo, metilo y propilo). El metilparabeno y propilparabeno son los más utilizados en cosméticos y generalmente se aplican conjuntamente para aumentar los efectos conservantes. Hasta la fecha, pocos estudios han examinado las concentraciones de parabenos en aguas superficiales [9]. En la Figura 2 se presenta la estructura química de los parabenos.

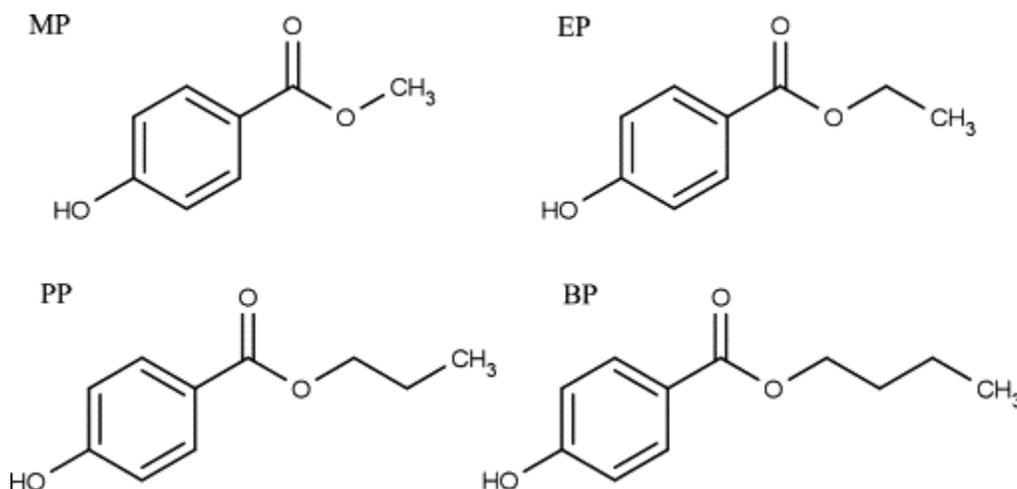


Figura 2. Estructura química de Metilparabeno (MP), Etilparabeno (EP), Propilparabeno (PP) y Butilparabeno (BP).

Desde un punto de vista químico, los parabenos son ésteres del ácido parahidroxibenzoico. Cada parabeno tiene una estructura química diferente que hace que cada uno de ellos tenga propiedades distintas. Cuanto más larga es la cadena hidrocarbonada del éster, mayor es su liposolubilidad y menor su hidrosolubilidad [11].

Todos los parabenos presentan buena estabilidad entre pH 4 y 8, son poco solubles en agua, fácilmente solubles en etanol al 96% y en metanol.

Las preocupaciones mencionadas anteriormente sobre los riesgos a la salud que estas sustancias representan, provocaron su regulación en productos comerciales por organizaciones nacionales y transnacionales. De esta forma, la Unión Europea establece concentraciones máximas de 0.4% (p/p) para cada parabeno individual y un límite de 0.8% (p/p) para los parabenos totales en productos comerciales, expresados como equivalentes al ácido p-hidroxibenzoico [12].

1.2.2. Oxibenzona

Es un compuesto químico también conocido como benzofenona-3 y utilizado como filtro solar, tiene un carácter liposoluble y absorbe las radiaciones UVA (320-360 nm), UVB (290-320 nm) y una parte de la UVC (250-290 nm). La oxibenzona se encuentra en el número 4 de la lista de filtros ultravioletas que pueden contener los productos cosméticos [13]. La estructura química de la oxibenzona se puede apreciar en la Figura 3.

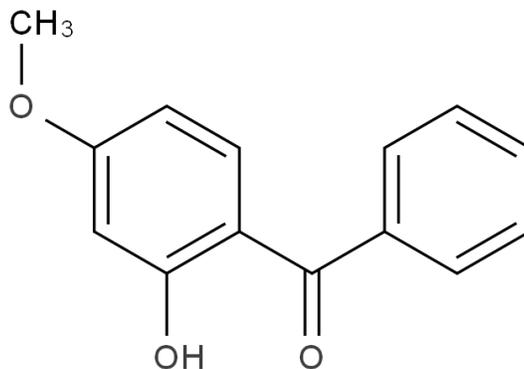


Figura 3. Estructura química de la Oxibenzona

Respecto a su apariencia física, es un polvo ligeramente amarillo que disuelto en agua proporciona valores de pH cercanos a 6.2 y tiene un punto de ebullición de 315 °C [14]. La oxibenzona presenta buena estabilidad entre pH 5 y 7, es poco soluble en agua, fácilmente soluble en etanol y muy soluble en cloroformo y éter.

1.3 Extracción en Fase Sólida.

Como señala Nigel Simpson (2000), “la extracción en fase sólida (EFS) es una técnica que los analistas pueden usar como una herramienta para lograr obtener una muestra que sea compatible con el instrumento analítico requerido para su análisis, la cual puede estar acoplada con una técnica analítica u otro método de preparación para incrementar los beneficios de cada técnica por separado” [15].

Los pasos básicos de la EFS se pueden observar en la Figura 4 y consisten básicamente en la retención, lavado y elución. En la retención, el analito es completamente adsorbido en la superficie de un adsorbente sólido. El lavado permite eliminar los compuestos que puedan crear interferencias con nuestros analitos durante el análisis. Finalmente, la elución es el

paso en el que el compuesto de interés deja de ser adsorbido mediante la aplicación de un disolvente que proporciona un ambiente más afín para el analito [15].

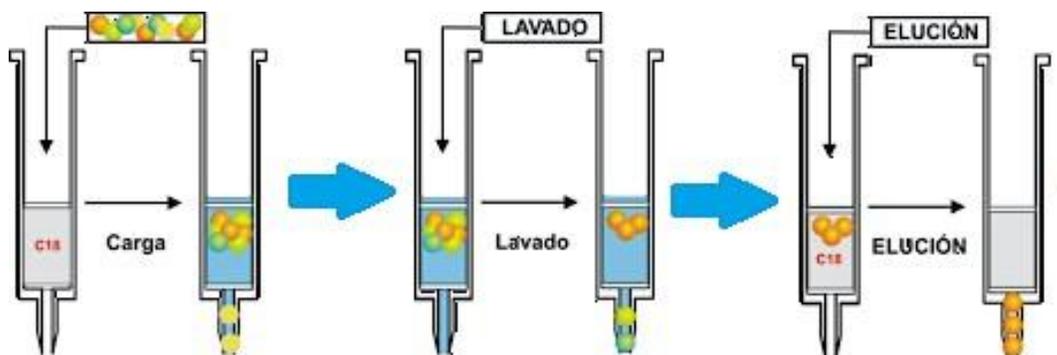


Figura 4. Procedimiento general de la EFS. Esquema adaptado de CromLab S.L. [37].

Para la detección de analitos a niveles de trazas, es necesario concentrarlos antes del análisis. La extracción en fase sólida (EFS) se ha convertido en la técnica de preparación de muestras más utilizada, con las ventajas de ser simple, rápida y con bajo consumo de disolvente, además de ser fácil de combinar con otras tecnologías [16].

1.3.1 Extracción en Fase Sólida en línea

El pretratamiento de las muestras es uno de los pasos más complicados para los analistas. Actualmente, se han realizado esfuerzos concertados para desarrollar métodos de pretratamiento de muestras con alta eficiencia, bajo consumo de disolventes y de tiempo. Una estrategia que ha resultado útil es el acople de la extracción fase sólida en línea con un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (EFS-HPLC) [17].

Un sistema de EFS-HPLC está formado por los siguientes componentes: una bomba auxiliar o de preconcentración, una precolumna que funciona como cartucho de EFS y una válvula de conmutación de seis o diez puertos que sirve para conectar el sistema cromatográfico. En la Figura 5 se presenta un esquema general de las conexiones realizadas para conformar el sistema en línea.

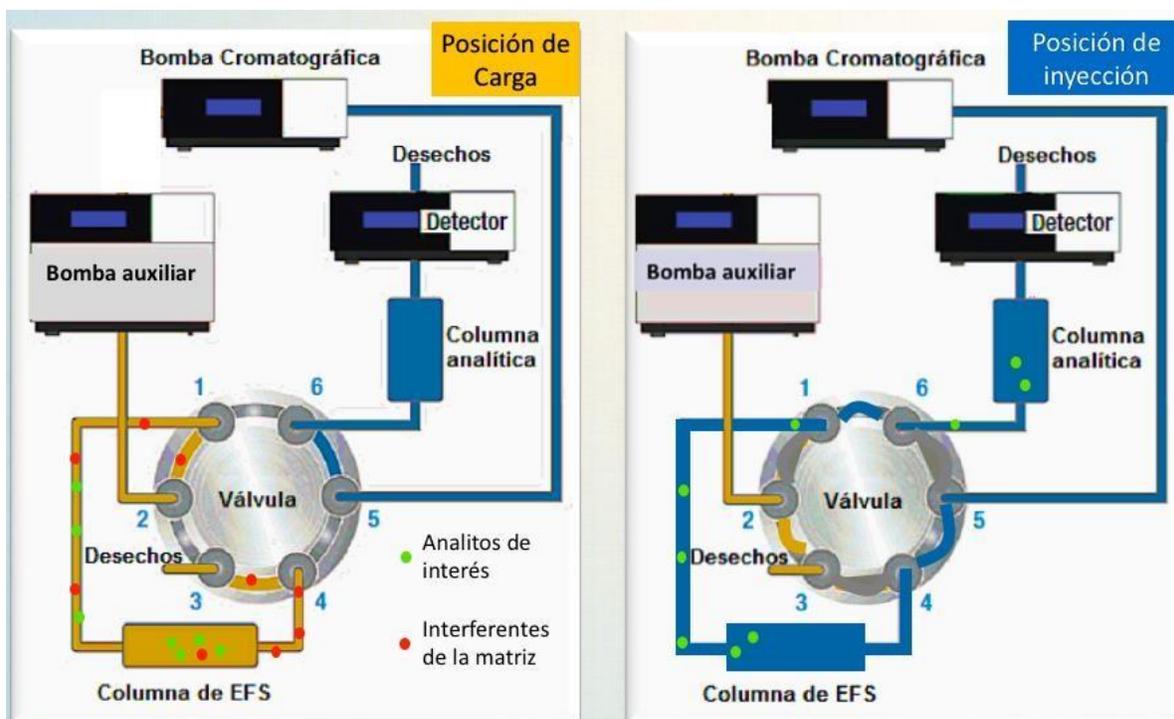


Figura 5. Esquema de un sistema de EFS-HPLC en línea.

Cuando la válvula se coloca en posición de carga, la muestra es transportada por la bomba de preconcentración y los analitos son retenidos en el cartucho de EFS, mientras que las interferencias de la matriz se eliminan a los residuos. Después de completar los pasos de carga y lavado de la muestra, se realiza el cambio de posición de la válvula, para conducir la fase móvil desde la bomba cromatográfica hasta el cartucho de EFS y desorber a los

analitos retenidos para dirigirlos a la columna cromatográfica y realizar el proceso de separación y análisis [2,3,18].

1.4 Dispersión de Matriz en Fase Sólida

La dispersión de matriz en fase sólida (DMFS), es una técnica de extracción y limpieza para la determinación simultánea de diferentes analitos. Fue desarrollada por Barker en 1989 [20]. El proceso general de esta técnica consiste en mezclar una muestra viscosa, sólida o semisólida con un soporte sólido, por ejemplo, sílice, alúmina o C18. La mezcla se homogeneiza en un mortero con pistilo, donde el soporte sólido actúa como un agente abrasivo que interrumpe la arquitectura bruta de la muestra y fracciona el material. La mezcla y la presencia del soporte sólido proporciona la dispersión de los componentes de la muestra en la superficie de las partículas. Después de realizar el mezclado, el material es transferido y empaquetado en un cartucho para su posterior elución con un solvente adecuado [21]. Un esquema general de la DMFS se puede apreciar en la Figura 6.

Una variación de la EFS es la técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS), la cual es utilizada para muestras viscosas, sólidas o semi-sólidas. En esta técnica la muestra se dispersa sobre un adsorbente sólido adecuado y la mezcla se empaca en una columna para la elución de los analitos de interés. Este proceso tiene las mismas ventajas que la EFS, además de ser más barato y rápido en comparación con las técnicas clásicas de interés como el Soxhlet por lo que puede ser implementado con una infraestructura sencilla en los laboratorios [19].

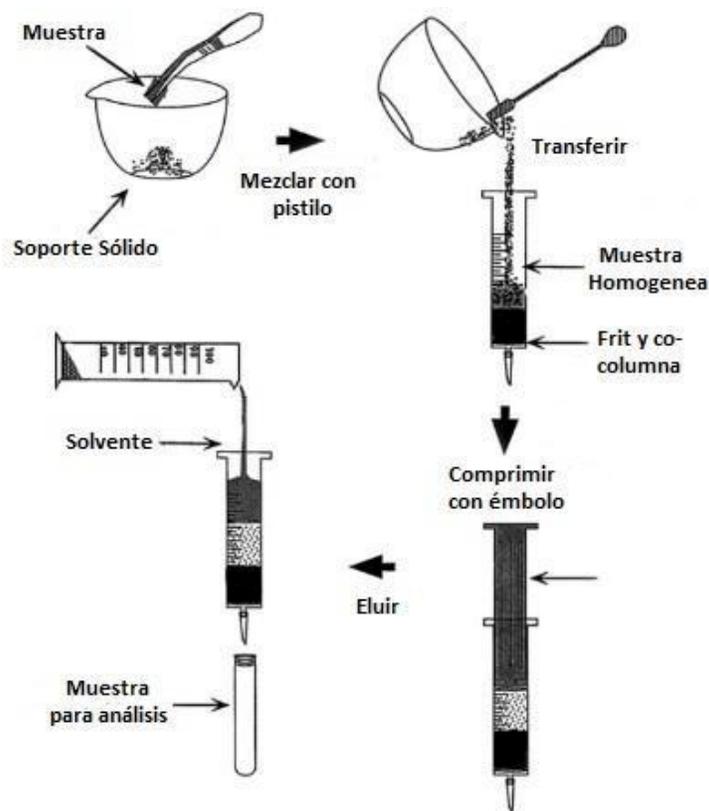


Figura 6. Esquema general de la DMFS.

La DMFS ha demostrado ser una técnica eficiente y versátil para el aislamiento de una amplia gama de sustancias como fármacos, pesticidas, constituyentes naturales y otros compuestos de una gran variedad de muestras vegetales y animales complejas [22]. Como muestra de esto, se presentan en la Tabla 2 un resumen de ejemplos de estudios en donde se utiliza la DMFS como método de preparación de muestra para la determinación de parabenos y oxibenzona en muestras de tejidos e incluso polvo. Como se puede apreciar, en la mayoría de las referencias se utiliza como material adsorbente a la sílice C18. Los rendimientos obtenidos son mayores al 83% y los límites de cuantificación están en el orden de los ng g^{-1} y ng mL^{-1} .

Tabla 2. Ejemplos de estudios utilizando DMFS para el análisis de Parabenos y filtros UV

| <i>Autor (año)</i> | <i>Muestra</i> | <i>Tipo de adsorbente</i> | <i>Disolvente de elución</i> | <i>Concentración</i> | <i>Técnica de Análisis</i> | <i>Rendimiento</i> | <i>Límites de Cuantificación</i> | <i># de referencia</i> |
|----------------------------|--|--|------------------------------|--|-------------------------------|--------------------|----------------------------------|------------------------|
| <i>P. Canosa, (2007)</i> | Polvo interior 0.5 g | 2 g Florisil 1. 25 g C18 | 10 mL ACN | Se evaporó a 1 mL | GC- MS/MS | 80-114% | 0.6 - 2.6 ng g ⁻¹ | [23] |
| <i>F.Vela-Soria (2014)</i> | muestras de tejido placentario humano 1 g | 1 g C18 | 20 ml Etanoato de etilo | El extracto evaporado se disolvió en 100 µL de una mezcla 60:40 (v/v) de metanol y agua. | UHPLC- MS/MS | 97-102% | 0.3 ng g ⁻¹ | [24] |
| <i>Fotouhi M (2017)</i> | Leche materna 200 µL | 50.0 mg de Óxido de grafeno magnético recubierto de indol-tiofeno (MGO @ PIT) y 550 mg de Sulfato de sodio | 5 mL de agua destilada | 1 mL metanol | MA- MSPD y LC- MS/MS | Mayores a 83% | 25-50 ng mL ⁻¹ | [25] |

GC-MS/MS: CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM

UHPLC-MS/MS: CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA RENDIMIENTO – ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM.

MA-MSPD: DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA ASISTIDA MAGNÉTICAMENTE

LC-MS/MS: CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA-ESPECTROMETRÍA DE MASA EN TÁNDEM

1.5 Metodologías en línea para el análisis de parabenos y filtros UV.

Para el análisis de parabenos y filtros UV comúnmente se utilizan análisis cromatográficos de gases y líquidos [26] utilizando algunas técnicas para limpiar la muestra como la EFS, Microextracción en Fase Sólida, Microextracción en Fase Líquida y DMFS [12].

Recientemente se han realizado algunos estudios utilizando el sistema en línea acoplado a alguno de estos métodos utilizando alimentos y orina humana, en donde se pretende que disminuyan los costos, el tiempo de análisis de la muestra y los límites de cuantificación que alcanzan niveles hasta de ng g^{-1} tal y como se puede apreciar en la Tabla 3.

1.6 Diseño factorial 3^k

Un diseño factorial es un diseño experimental que sirve para estudiar el efecto individual y de interacción sobre una o varias respuestas, cuando se tiene el mismo interés sobre todos los factores.

Uno de sus principales objetivos es determinar una combinación de niveles de los factores en la que el desempeño del proceso sea mejor, en un diseño factorial general la matriz de diseño que contiene el total de tratamientos a evaluar se obtiene encontrando todas las posibles combinaciones que se pueden formar con los niveles k de interés, que se representa con los símbolos (+,-).

Tabla 3. Publicaciones recientes de análisis de parabenos y filtros UV utilizando un sistema en línea.

| AUTOR (AÑO) | MUESTRA | ANALITOS | MÉTODO DE EXTRACCIÓN | MÉTODO DE ANÁLISIS | RECOBROS | L.C. |
|--|------------------------------------|----------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------|---------------------------------------|
| ROSALINA DJATMIKA (2016) [27] | Robalo rayado, tilapia y camarones | MP, EP, PP, BP | DMFS | GC-MS | 75-116.1% | 0.2 - 1.0 ng g ⁻¹ |
| HUI- TINGZHOU (2017) [28] | Orina humana | MP, EP, PP, BP | USAEME | GC-MS | 83-101% | Menores a 0.06 ng mL ⁻¹ |
| REBECCA K.MOOS (2014) [29] | Orina humana | MP, EP, BP-3 | Hidrólisis ácida y centrifugación | LC-MS/MS | N.E. | 0.5 - 2 µg L ⁻¹ |

DMFS: DISPERSIÓN DE MATRIZ EN FASE SÓLIDA

GC-MS: CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS

USAEME: MICROEXTRACCIÓN DE EMULSIFICACIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS

LC-MS/MS: CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA - ESPECTROMETRÍA DE MASA EN TÁNDEM

Los diseños factoriales son más eficientes que el tradicional experimento de mover un factor a la vez. En estos se investigan (en orden aleatorio) todas las combinaciones de los niveles de los factores y permitiendo estudiar el efecto individual y de interacción de los distintos factores. Son diseños que se pueden aumentar para formar diseños compuestos en caso de que se requiera una exploración más completa.

El diseño factorial 3^k con k factores con tres niveles cada uno y tiene 3^k tratamientos. Un diseño factorial 3^2 consiste en 9 tratamientos diferentes, que corresponden a todas las posibles maneras en las que se pueden combinar dos factores en tres niveles cada uno. Los diseños factoriales que involucran menos de cuatro factores por lo regular se corren replicados para tener la potencia necesaria en las pruebas estadísticas sobre los efectos de interés [30].

1.7 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

El término “chroma-graphia” (escritura en color), fue empleado por primera vez en 1906 cuando el biólogo ruso M.S. Tsweet consiguió la separación de los distintos componentes coloreados de un extracto vegetal.

Se puede definir a la cromatografía como la técnica física de separación en la que los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases: estacionaria y móvil. El proceso cromatográfico ocurre como resultado de repetidos equilibrios de distribución de los componentes de la muestra entre las dos fases no miscibles entre sí [31].

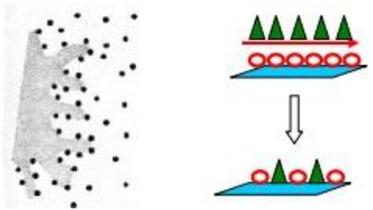
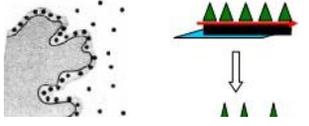
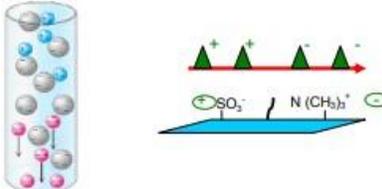
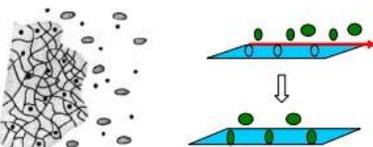
La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), en inglés, es un principio de medida que permite separar los

componentes de una muestra (analitos) en función de su distribución entre dos fases inmiscibles entre sí: una fase estacionaria (un sólido o un líquido adsorbido sobre un soporte sólido) y una fase móvil (un líquido). En este tipo de cromatografía, para que tenga lugar el proceso físico-químico de separación, la muestra es inyectada en el seno de la fase móvil, en la que es soluble y es impulsada a una elevada presión a través de una columna que contiene la fase estacionaria. Una vez separados los diferentes analitos en el sistema cromatográfico (eluatados), y en función de sus propiedades fisicoquímicas, estos pueden ser identificados o cuantificados empleando alguno de los múltiples sistemas de detección existentes [32].

Los componentes básicos de un sistema de HPLC son: 1) reservorios de solventes, 2) bomba, 3) inyector, 4) columna, 5) detector y 6) sistema de control [33].

Hay diferentes tipos de cromatografía y según el mecanismo de separación, la cromatografía se puede clasificar de acuerdo con la tabla 4 [34].

Tabla 4. Tipos de cromatografía

| Tipo | Descripción | Imagen |
|---|--|---|
| Cromatografía de adsorción | Los componentes de la muestra son retenidos mediante adsorción selectiva en la superficie de un sólido de elevada superficie específica que constituye la fase estacionaria. Las moléculas de soluto y disolvente (fase móvil) compiten por las posiciones en el adsorbente. |  |
| Cromatografía de reparto | El soluto se reparte entre la fase estacionaria líquida y la fase móvil de acuerdo con su solubilidad en cada una de ellas. |  |
| Cromatografía de intercambio iónico | La fase estacionaria es un sólido que contiene grupos cargados positiva o negativamente, teniendo la capacidad de separar especies iónicas. Los solutos de carga opuesta a la fase estacionaria son atraídos por ésta mediante fuerzas electrostáticas. |  |
| Cromatografía de exclusión molecular | En este tipo de separación cromatográfica, la fase estacionaria está constituida por un polímero entrecruzado de tamaño de poro definido. Las moléculas grandes, no compatibles con el tamaño de poro, siguen su avance, mientras que las más pequeñas quedan retenidas en los intersticios del gel. |  |
| Cromatografía de afinidad | Permite la separación de mezclas por su interacción específica con un determinado ligando de actividad. |  |

1.7.1 Principales parámetros cromatográficos

En la Figura 7 se presenta un ejemplo típico de un cromatograma, que es la respuesta de la señal del detector en función del tiempo o del volumen de fase móvil que eluye.

El tiempo de retención (**tr**) es el que transcurre desde la introducción del soluto en la columna hasta el máximo del pico.

El volumen de elución (V_r) es el volumen de fase móvil necesario para que salga la sustancia de la columna. El tiempo de retención y el volumen de elución se usan en la cromatografía en columna para los estudios cualitativos.

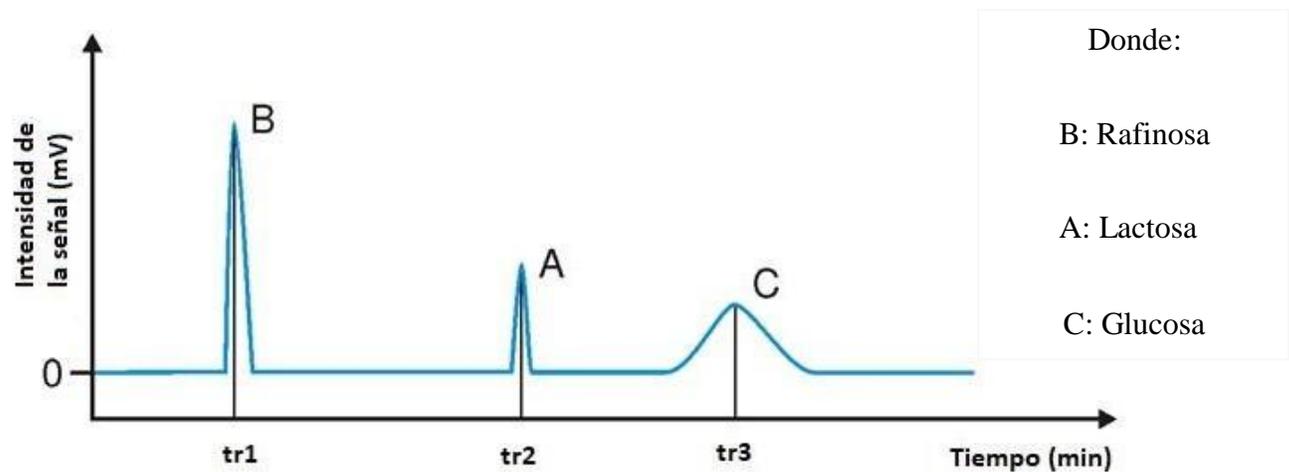


Figura 7. Cromatograma típico

Otro parámetro importante es la anchura del pico en la línea de base (W_b). Como se puede observar en la Figura 8 se determina por la intersección con esta línea de las tangentes trazadas por los puntos de inflexión sobre cada lado del pico cromatográfico.

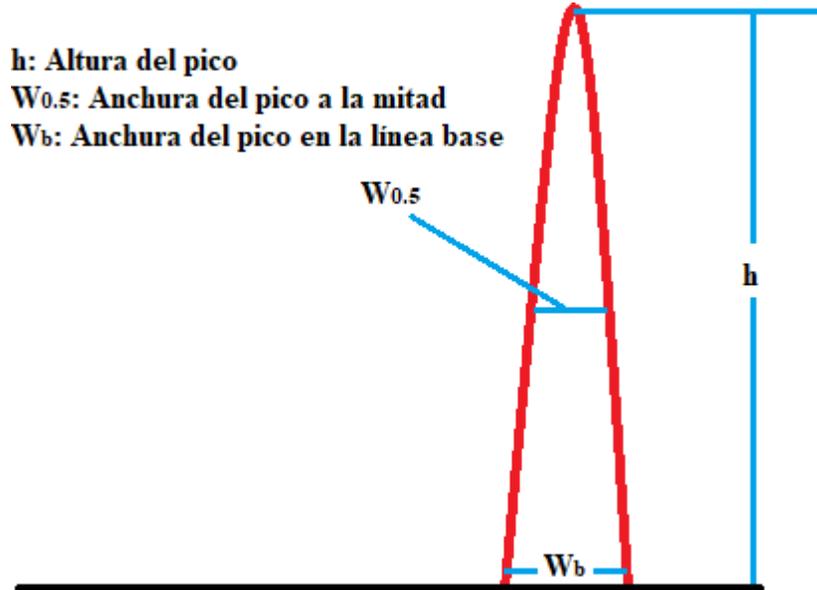


Figura 8. Elementos del pico cromatográfico.

La anchura de los picos dependerá de diversos factores que, de forma general, se llaman *eficacia de la columna*. Esta última utiliza el concepto de *plato teórico*, que es el espacio necesario para que se produzca el equilibrio de una sustancia entre las dos fases. La longitud de columna que contiene un plato teórico se denomina *altura del plato* (H), y se mide habitualmente en mm. Tanto el valor numérico de N (número de platos teóricos) como el de H de una columna se expresan para una sustancia determinada. La altura del plato está relacionada con la amplitud del pico de la sustancia y con la distancia que recorre en la columna, mediante la ecuación:

$$H = \frac{L}{N}$$

donde L es la longitud de la columna y N el Número de Platos teóricos

El número de platos teóricos de la columna viene dado por:

$$N = 16 \left(\frac{tr}{W} \right)^2$$

Para las columnas más eficaces, el valor de N puede llegar hasta 50.000–100.000 por metro. El valor correspondiente de H puede ser de unos pocos μm . Cuanto menor sea la altura del plato, más estrecho será el pico de la sustancia. Sin embargo, la difusión de la sustancia se opone a esta estrechez del pico.

La capacidad de separación de dos picos en un proceso cromatográfico en columna se mide por medio de la resolución (R_s), que se calcula dividiendo la diferencia de los tiempos de retención (tr_1 y tr_2) por la media de la anchura de los picos (W_1 y W_2):

$$R_s = \frac{tr_1 - tr_2}{(W_1 + W_2)/2} = \frac{2\Delta tr}{W_1 + W_2}$$

Cuanto mayor sea R_s , mejor será el grado de separación entre dos picos cromatográficos. La resolución se puede mejorar aumentando la diferencia de los tiempos de retención (Δtr) o disminuyendo W_1 o W_2 . Δtr puede aumentarse potenciando la interacción de los solutos con la columna o aumentando la selectividad de la columna para alguno de ellos [34].

1.8 Parámetros de Validación de un método

El objetivo de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que sea adecuado para el propósito para el que está destinado. El objetivo del proceso analítico guiará las características de validación que necesitan ser evaluadas. Las características de validación típicas para las metodologías donde se miden analitos a muy baja concentración en una muestra determinada son:

Exactitud: Expresa la cercanía entre el valor que es aceptado como verdadero o convencional y el valor obtenido.

Precisión: Expresa la cercanía entre una serie de medidas obtenidas de múltiples muestras analizadas bajo las mismas condiciones. La precisión puede ser considerada en: repetibilidad y reproducibilidad.

- **Repetibilidad:** expresa la precisión bajo las mismas condiciones del operador en un intervalo corto de tiempo.
- **Reproducibilidad:** expresa la precisión entre laboratorios.

Especificidad: es la habilidad de evaluar inequívocamente al analito en la presencia de los componentes que puedan estar presentes. Típicamente estos pueden incluir impurezas, degradantes, matriz, etc.

Límites de Detección: Es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede ser detectado pero no necesariamente cuantificado como un valor exacto.

Límites de Cuantificación: Es la cantidad más baja de un analito en una muestra que puede ser determinado cuantitativamente con adecuada precisión y exactitud.

Linealidad: Es la habilidad de obtener resultados dentro de un intervalo dado que son directamente proporcionales a la concentración o cantidad de un analito en la muestra.

Rango: Es el intervalo entre las concentraciones más altas y bajas del analito en la muestra para las cuales se ha demostrado que el procedimiento analítico es adecuado en términos de precisión, exactitud y linealidad [35].

Capítulo 2. Desarrollo Experimental

2.1 Materiales y reactivos

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

- ✚ Estufa de secado BLUE M modelo SW-17TA
- ✚ Vasos de precipitado de 10 y 50 mL
- ✚ Matraz aforado de 1 mL, 5 mL y 10 mL
- ✚ Espátula
- ✚ Tubos para centrifuga de plástico de 15 mL
- ✚ Centrifuga Vela Quin modelo 80-1

2.2 Instrumentación

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

- ✚ Bomba binaria modelo 1525.
- ✚ Detector UV-Vis óptico de longitud de onda dual modelo 2487.
- ✚ Automuestreador modelo 717 plus.

Para la separación de los analitos se utilizó una columna analítica Eclipse XDB-C18 de 5 μm de diámetro de partícula y dimensiones de 4.6 x 250 mm de la marca Agilent.

Para la preconcentración de los extractos se utilizó un sistema de EFS en línea que consta de:

- ✚ Válvula Rheodyne de 2 posiciones y 6 vías modelo 7000.
- ✚ Precolumna marca Agilent modelo 820999-901.
- ✚ Cartucho para precolumna Zorbax Eclipse Plus – C18 de 4.6 mm diámetro interno x 12.5 mm de largo y diámetro de partícula de 5 μm modelo 820950-936 marca Agilent.
- ✚ Bomba de dosificación de líquidos de alta presión modelo 2SM marca Eldex

Laboratories.

2.3 Preparación de los estándares

Se prepararon disoluciones “stock” individuales de cada uno de los analitos (metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno y oxibenzona) con concentración de 1000 ppm disueltos en metanol, a partir de las cuales se preparó una mezcla de estos analitos a una concentración de 100 ppm en una proporción de metanol:agua 55:45 v/v. Las disoluciones se mantuvieron en refrigeración (4°C).

2.4 Obtención de las muestras y tratamiento previo.

La muestra utilizada para la validación del método fue músculo de Tilapia mojarra (*Oreochromis urolepis homorum*) obtenido de tiendas comerciales.

Para la aplicación del método se utilizaron diferentes muestras de músculo de Tilapia mojarra obtenidas de tiendas de autoservicio como Mega Comercial Mexicana y Wal-Mart, mercados ambulantes como el 20 de Noviembre y La Palma ubicados en Atlacomulco, Estado de México y de una laguna del municipio de Ixmiquilpan en el Estado de Hidalgo.

Antes de realizar las extracciones, las muestras se mantuvieron en congelación hasta conseguir una consistencia firme (20 minutos) y después se realizó la homogeneización en el procesador de alimentos hasta obtener fracciones pequeñas.

Las muestras homogeneizadas se guardaron posteriormente en bolsas de plástico con cierre hermético y se almacenaron en congelación (-20 °C) hasta su uso.

2.5 Separación cromatográfica de los analitos

Para todos los análisis realizados en este trabajo se estableció un volumen de inyección de 20 μL con un flujo de la fase móvil de 1 mL min^{-1} . La detección se realizó a 254 nm para los parabenos y 310 nm para la oxibenzona.

Para la separación cromatográfica de los analitos se utilizaron las condiciones reportadas por León [4] con el gradiente que se presenta en la tabla 1.

Tabla 5. Gradiente utilizado para la separación de los analitos evaluados.

| | <i>Tiempo (minutos)</i> | <i>%Metanol</i> | <i>%Agua</i> |
|-------------------|-----------------------------|-----------------|--------------|
| <i>Gradiente</i> | 0 | 55 | 45 |
| | 8 | 100 | 0 |
| | 15 | 100 | 0 |
| <i>Equilibrio</i> | 17 | 55 | 45 |
| | 20 | 55 | 45 |

2.6 Optimización de la preconcentración de los analitos en el sistema EFS-HPLC-UV en línea utilizando un diseño factorial tipo 3^k .

Para la optimización de la preconcentración de los analitos se utilizó un diseño factorial de tipo 3^2 , es decir un diseño experimental con 2 factores y 3 niveles cada uno. Para evaluar el efecto de los factores, el diseño se realizó con 3 repeticiones para cada experimento, dando un total de 18 experimentos.

Los factores que se evaluaron fueron: 1) porcentaje de metanol:agua en el extracto y 2) volumen total del extracto. Cada nivel evaluado utiliza los signos +, +/- y – para identificar los niveles alto, medio y bajo de cada factor. Se utilizó el programa Excel para diseñar aleatoriamente el orden de los experimentos como se muestra en la tabla 6.

Para la preconcentración de los analitos se utilizó una precolumna C18 en el sistema en línea acoplado al HPLC con detección UV con el fin de determinar las condiciones que proporcionaran los mejores resultados de recobro de los analitos.

Tabla 6. Orden y condiciones de los experimentos realizados del diseño factorial 3^k.

| Orden del experimento | %MeOH | Vol. Total (µL) |
|------------------------------|--------------|------------------------|
| 6 | 0 | 1000 |
| 9 | 0 | 2000 |
| 7 | 0 | 4000 |
| 12 | 10 | 2000 |
| 18 | 10 | 4000 |
| 13 | 15 | 1000 |
| 17 | 0 | 2000 |
| 1 | 10 | 1000 |
| 4 | 10 | 2000 |
| 14 | 10 | 4000 |
| 16 | 15 | 2000 |
| 2 | 15 | 4000 |
| 15 | 0 | 1000 |
| 3 | 0 | 4000 |
| 5 | 10 | 1000 |
| 10 | 15 | 1000 |
| 8 | 15 | 2000 |
| 11 | 15 | 4000 |

2.7 Extracción en Fase Sólida en línea con Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (EFS-HPLC)

Para realizar la preconcentración en línea se siguieron los pasos descritos en la tabla 7.

Tabla 7. Procedimiento de la preconcentración en línea.

| <i>Paso</i> | <i>Posición válvula</i> | <i>Bomba activa</i> | <i>Proceso</i> | <i>Disolvente/ Extracto</i> | <i>Vol. (mL)</i> | <i>Flujo mL/min</i> |
|-------------|-----------------------------|-------------------------|------------------------|---------------------------------|----------------------|-------------------------|
| 1 | Carga | BA | Limpieza | MeOH 100% | 5 | 1.7 |
| 2 | Carga | BA | Acondicionamiento | Agua 100% | 2 | 1.7 |
| 4 | Carga | BA | Carga del extracto | MeOH 10% | 4* | 1.7 |
| 5 | Carga | BA | Limpieza de las líneas | Agua 100% | 1 | 1.7 |
| 6 | Inyección | BC | Elución | Gradiente de elución | 20 | 1.0 |
| 7 | Carga | BA | Limpieza | MeOH 100% | 5 | 1.7 |

BA= Bomba Auxiliar; BC: Bomba Cromatográfica

** Volumen obtenido de la optimización de la preconcentración utilizando un diseño factorial tipo 3^k*

2.8 Validación del sistema EFS-HPLC-UV en línea para el análisis de parabenos y filtros UV.

Después de determinar las condiciones óptimas de preconcentración, se utilizaron disoluciones estándar para validar el sistema cromatográfico en línea evaluando los parámetros de linealidad, repetibilidad, exactitud (recobro) y límites de detección y cuantificación.

La linealidad se evaluó preparando una curva de calibración a las concentraciones de 50, 100, 200, 400 y 500 ppb a partir de la mezcla de estándares de concentración 100 ppm.

Cada estándar se inyectó por triplicado utilizando el sistema de preconcentración en línea y se graficó el área del pico cromatográfico contra la concentración de cada analito. Se obtuvo el coeficiente de determinación (r^2) y la ecuación de la curva.

La repetibilidad fue evaluada inyectando por triplicado en 2 días diferentes las disoluciones estándar de 50 y 500 ppb obteniendo de éstas el promedio del área del pico de cada analito, la desviación estándar (D.E.) y el coeficiente de variación porcentual (C.V.%).

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

La exactitud se evaluó calculando el porcentaje de recobro de la preconcentración realizada con 4 mL de volumen total y un porcentaje de 10% de MeOH, el cual se obtuvo graficando la cantidad recuperada en función de la cantidad agregada en cada uno de los extractos. La pendiente de esta curva multiplicada por 100 representa el recobro global de la preconcentración en el intervalo de concentraciones utilizado.

2.9 Dispersión de Matriz en Fase Sólida acoplada al método de EFS-HPLC-UV en línea para el análisis de músculo de pescado.

La dispersión en matriz sólida se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado por León [4] como se puede apreciar en la Figura 9.

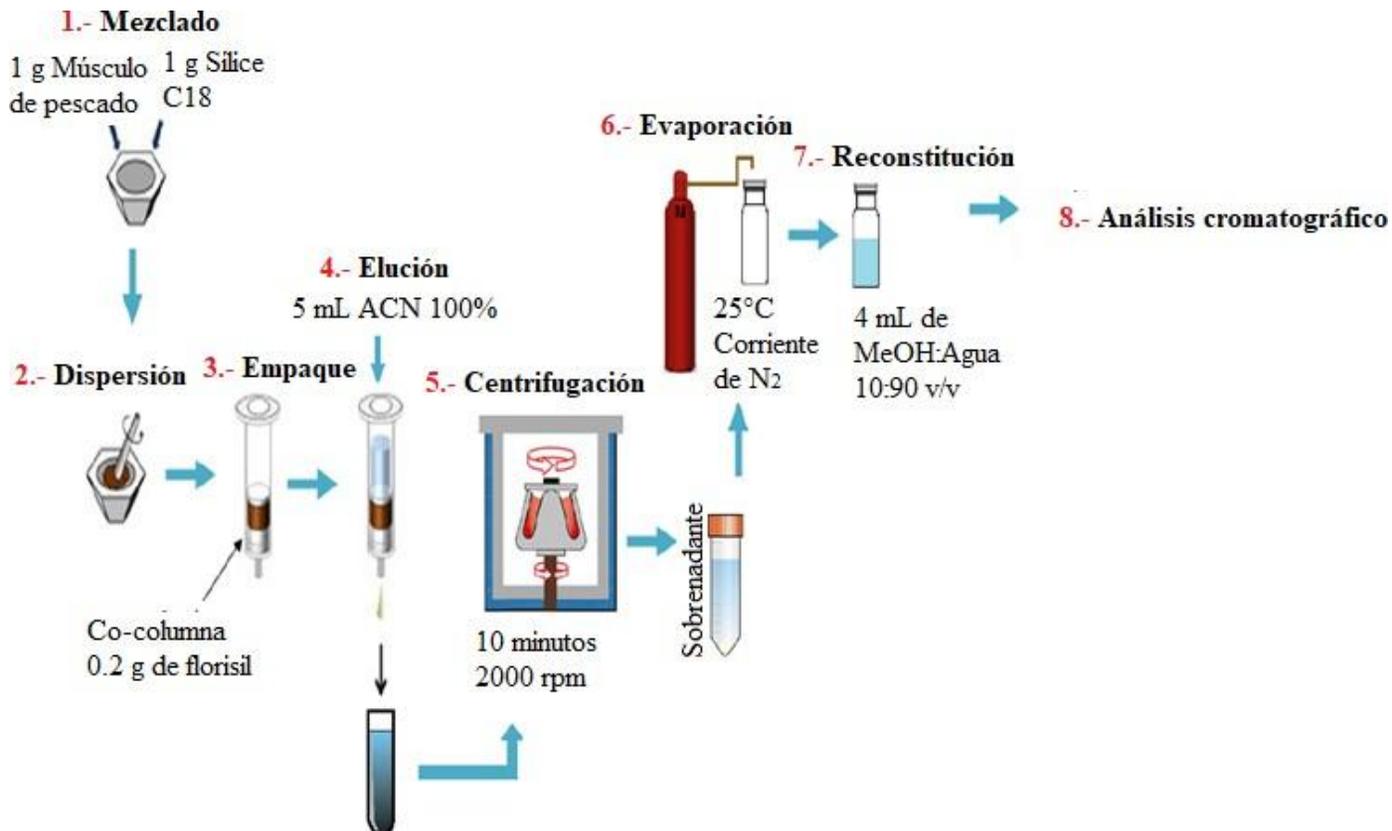


Figura 9. Procedimiento para la extracción de los analitos por DMFS [4].

Para acoplar la DMFS al sistema en línea, una vez evaporado el extracto, se resuspendió en 400 μ L de MeOH y se agitó en el vortex durante 2 minutos para posteriormente agregarle 3600 μ L de agua y así obtener un extracto de 4 mL con un contenido de 10% de metanol. Este extracto se preconcentró y analizó como se indica en las secciones 2.5 y 2.7.

2.10 Validación del método por DMFS/EFS-HPLC-UV

Para la validación del método por DMFS/EFS-HPLC-UV se utilizaron los mismos parámetros que en el apartado 2.8

Diferentes muestras de músculo de tilapia fueron fortificadas a las concentraciones de 20, 50, 100, 200 y 500 ppb. Cada muestra se analizó por triplicado y se calculó la cantidad recuperada de cada analito en función de la cantidad agregada. La linealidad se evaluó con el coeficiente de determinación (r^2) de esta curva. La exactitud se obtuvo a partir del valor de la pendiente de la curva multiplicada por 100 la cual representa el recobro global en el intervalo de concentraciones evaluado.

La repetibilidad se evaluó analizando muestras por triplicado a las concentraciones de 100 y 200 ppb, obteniendo el promedio de la cantidad recuperada de cada analito, la desviación estándar (D.E.) y el coeficiente de variación porcentual (C.V.%).

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

2.11 Aplicación del método al análisis de muestras de músculo de pescado (Tilapia) provenientes de diferentes puntos de venta.

Una vez validada la metodología desarrollada, se aplicó a muestras comerciales provenientes de los supermercados WalMart, Mega Comercial Mexicana, mercados locales y a una muestra obtenida del municipio de Ixmiquilpan ubicado en el Estado de Hidalgo. Cada muestra se analizó por duplicado.

Capítulo 3. Resultados y análisis

3.1 Separación de los analitos

En la Figura 10 se muestra el cromatograma obtenido para los analitos de metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno y la oxibenzona con las condiciones reportadas por León (2018) [4].

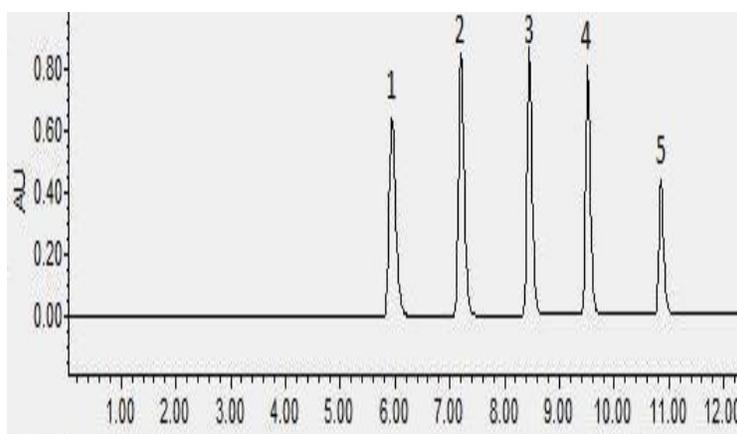


Figura 10. Cromatograma obtenido de una disolución estándar a una concentración de 200 ppb. Compuestos: 1. MP, 2. EP, 3. PP, 4. BP y 5. BP-3.

Como se observa en la imagen anterior, los picos se encuentran bien separados a pesar de que se cambió la columna Agilent SB C18 utilizada por León (2018) por una Agilent XDB C18.

3.2 Optimización de la preconcentración de los analitos en el sistema EFS-HPLC-UV

Para analizar los resultados y obtener la combinación de factores a la cual se alcanzarán los valores óptimos de recobro para cada analito, se utilizó el software de análisis de datos estadístico y gráfico “Statgraphics”, en el cual se ingresaron los recobros obtenidos para cada analito a los diferentes niveles evaluados y de estos se derivaron los resultados que se aprecian en los diagramas de Pareto (Anexo I) y en la Tabla 8.

En los diagramas de Pareto se aprecia que en la mayoría de los analitos evaluados son significativos el volumen del extracto y la interacción de éste con el porcentaje de metanol agregado, a excepción del metilparabeno en el que se aprecia que es más significativo el porcentaje de Metanol adicionado. Respecto a los resultados obtenidos en la tabla 8 se llegó a la conclusión de que los niveles en los que se obtendría un porcentaje de recobro óptimo para todos los analitos es el nivel medio (\pm) para el % de MeOH (10%) y el nivel más alto (+) para el volumen del extracto (4 mL).

Tabla 8. Análisis estadístico para la combinación de factores estudiados.

| Factor | Bajo | Alto | Óptimo |
|----------------------|-------------|-------------|---------------|
| % MeOH | -1.0 | 1.0 | -0.127 |
| Vol. Extracto | -1.0 | 1.0 | 1.0 |

Con esta combinación el porcentaje de recobro predicho por el software Statgraphics para cada analito se presenta en la Tabla 9.

Tabla 9. Porcentaje de recobro predicho con las condiciones óptimas de preconcentración para cada analito.

| Respuesta | % Óptimo |
|------------------|-----------------|
| MP | 55.70 |
| EP | 91.07 |
| PP | 90.18 |
| BP | 88.24 |
| BP-3 | 81.24 |

Un resumen de las condiciones óptimas para la preconcentración y análisis de los analitos en el sistema EFS-HPLC-UV se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Condiciones cromatográficas utilizadas.

| | |
|--|--|
| Columna | Tipo: Eclipse XDB-C18 Diámetro de partícula: 5 µm Dimensiones: 4.6 x 250 mm |
| Detección | Tipo: UV Longitud de onda: 254 nm parabenos 310 nm Oxibenzona |
| Fase móvil | A: MeOH B: Agua |
| Gradiente | 0 min (55% A), 8 min (100% A), 15 min (55 % A). |
| Tiempo de equilibrio | 5 minutos |
| Velocidad del flujo | 1 mL min ⁻¹ |
| Volumen de inyección (off-line) | 20 µL |
| Tiempo total de análisis | 20 minutos |
| Condiciones EFS en línea | |
| Precolumna | Tipo: Zorbax Eclipse Plus – C18 Diámetro de partícula: 5 µm Dimensiones: 4.6 mm x 12.5 mm |
| % Metanol en el extracto | 10% |
| Volumen total del extracto | 4 mL |

En la Figura 11 se presentan ejemplos de cromatogramas obtenidos de una disolución estándar, una muestra blanco de músculo de tilapia y una muestra fortificada.

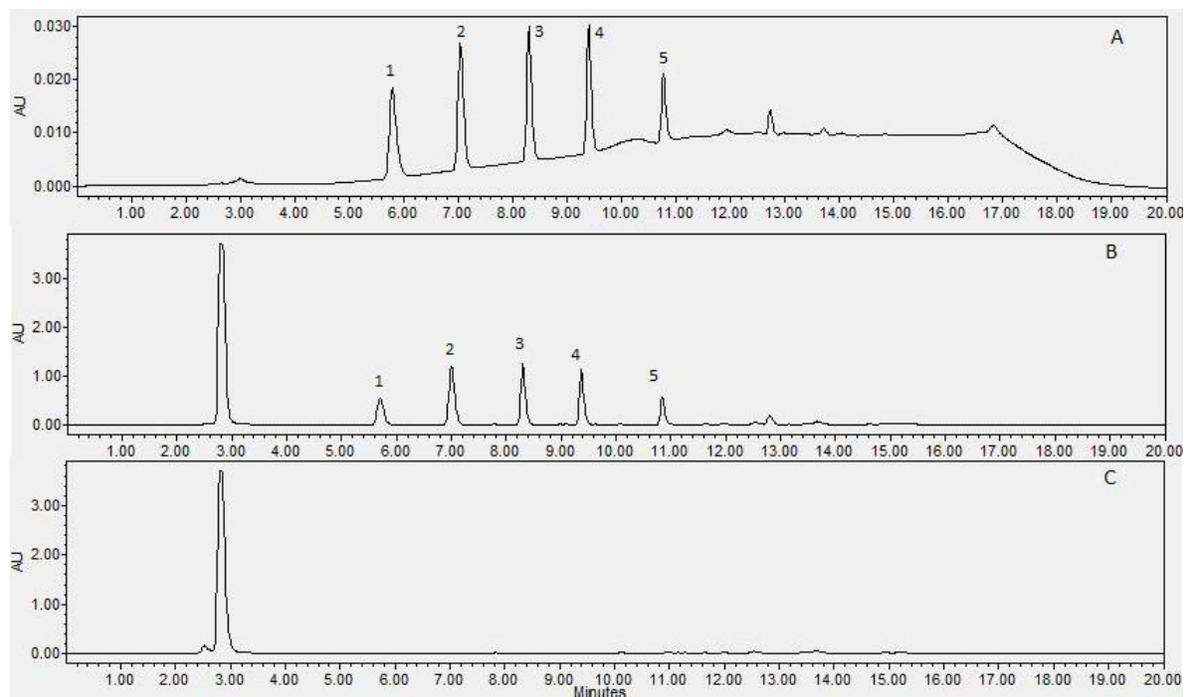


Figura 11. Cromatogramas obtenidos con las condiciones óptimas para el sistema EFS-HPLC-UV a 254 nm. (A) Disolución estándar a 4 ng mL⁻¹ (B) muestra fortificada a 100 ng g⁻¹ y (C) muestra blanco. 1. Metilparabeno, 2. Etilparabeno, 3. Propilparabeno, 4. Butilparabeno y 5. Oxibenzona.

En la figura anterior que corresponde a la muestra blanco (C) se observa que en el minuto 3 se encuentra un interferente, sin embargo no causa dificultad alguna para integrar los picos de los analitos utilizados ya que éstos salen en los minutos 5.7, 7.0, 8.3, 9.3 y 10.8 (A y B), sucediendo lo mismo con los picos más pequeños que se pueden observar en el minuto 7.8 y a partir del minuto 11.0.

3.3 Validación del sistema EFS-HPLC-UV en línea

En la Tabla 11 se muestran los resultados para la validación del sistema de preconcentración y análisis EFS-HPLC en línea.

Tabla 11. Resultados de los parámetros de validación del sistema EFS-HPLC-UV en línea.

| <i>Analito</i> | Recobro (%) | r²* | % C.V. 50 ng mL ⁻¹ | % C.V. 500 ng mL ⁻¹ | L.D. ng mL ⁻¹ | L.C. ng mL ⁻¹ |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---|--|------------------------------------|------------------------------------|
| <i>Metilparabeno</i> | 46.42 | 0.9979 | 1.81 | 7.18 | 12.5 | 37.8 |
| <i>Etilparabeno</i> | 93.25 | 0.9987 | 1.08 | 4.78 | 4.7 | 15.7 |
| <i>Propilparabeno</i> | 92.17 | 0.9992 | 1.57 | 4.66 | 4.7 | 15.7 |
| <i>Butilparabeno</i> | 91.45 | 0.9986 | 2.06 | 4.85 | 4.7 | 15.7 |
| <i>Oxibenzona</i> | 81.84 | 0.9964 | 1.7 | 4.79 | 4.7 | 15.7 |

**En el intervalo de los 50 a 500 ng mL⁻¹.*

Se puede observar que los valores de r² fueron mayores a 0.99 para todos los contaminantes presentando una buena correlación lineal.

La exactitud fue semejante a la prevista por el programa Statgraphics (Tabla 9) teniendo porcentajes de recobro mayores a 81% para los analitos etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno y oxibenzona como se puede observar en la Tabla 11.

En el caso del metilparabeno el porcentaje de recobro fue menor al 55.70% indicado en el programa estadístico, esto debido a que se espera que los analitos polares casi no se

acumulen en el tejido de los peces. Por esto, se decidió darle mayor importancia a los recobros de los demás analitos.

La repetibilidad del sistema fue buena de acuerdo a los valores establecidos por Taverniers [36] al tener % C.V. menores a 7.18 para los niveles de concentración medidos (ppb).

Los límites de detección y cuantificación se ubicaron entre 12.5 y 4.7 ng mL⁻¹, así como de 37.8 y 15.7 ng mL⁻¹ respectivamente.

3.4 Validación del método DMFS/EFS-HPLC-UV en línea

Para evaluar la linealidad del método se graficó la cantidad de nanogramos agregados de cada analito contra la cantidad de nanogramos que se recuperó al aplicar este método. Los datos que se obtuvieron se analizaron por el método de mínimos cuadrados para obtener la ecuación de la recta y el valor de r^2 . Las gráficas obtenidas se pueden observar en el Anexo III.

Respecto a la linealidad como se observa en la Tabla 12, se obtuvieron valores aceptables al tener una r^2 mayor a 0.98 para todas las gráficas de los analitos evaluados.

El recobro se evaluó con la pendiente de la recta obtenida de la relación que hay entre la cantidad recuperada de la cantidad agregada, obteniendo así recobros de entre 40.6 a 73.5%.

Los límites de cuantificación estuvieron entre 40 y 60 ng g⁻¹, mientras que los límites de detección se encuentran entre 13 y 20 ng g⁻¹. El metilparabeno y la oxibenzona fueron los

compuestos con los valores mayores de L.D. y L.C. debido a que presentaron la menor sensibilidad en el sistema de análisis.

Para evaluar la repetibilidad se calcularon los porcentajes de C.V. a 200 y 4000 ng g⁻¹, en donde los valores son menores a 19.34%, los cuales son aceptables de acuerdo a lo descrito por Taverniers [36].

Tabla 12. Resultados obtenidos para la validación del método DMFS/EFS-HPLC-UV en línea.

| Analito | r²* | Recobro global (%) | % C.V. 200 ng g⁻¹ n=3 | % C.V. 4000 ng g⁻¹ n=3 | L.D. ng g⁻¹ | L.C. ng g⁻¹ |
|--|-----------------------|---------------------------|---|--|-------------------------------|-------------------------------|
| MP | 0.9973 | 40.6 | 19.34 | 19.21 | 20 | 60 |
| EP | 0.998 | 73.5 | 9.90 | 2.94 | 13 | 40 |
| PP | 0.9986 | 68.0 | 12.96 | 4.76 | 13 | 40 |
| BP | 0.9988 | 71.0 | 10.65 | 4.24 | 13 | 40 |
| BP-3 | 0.9872 | 57.9 | 8.16 | 16.56 | 20 | 60 |
| * En el intervalo de 80 a 2000 ng | | | | | | |

Tabla 13. Resultados de la validación del método DMFS-HPLC-UV de León, 2018 [4].

| Analito | r² | Recobro global (%) | % C.V. 5 µg g⁻¹ | % C.V. 10 µg g⁻¹ | L.D. (µg g⁻¹) | L.C. (µg g⁻¹) |
|----------------|----------------------|---------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| MPB | 0.9979 | 79.15 | 6.70 | 1.27 | 0.5 | 1.7 |
| EPB | 0.9938 | 74.53 | 5.51 | 5.65 | 0.5 | 1.7 |

| | | | | | | |
|------|--------|-------|------|-------|-----|-----|
| PPB | 0.9549 | 66.03 | 0.61 | 10.28 | 0.6 | 2.0 |
| BP-3 | 0.9826 | 66.19 | 6.59 | 4.34 | 0.5 | 1.7 |

Como se puede observar en las dos tablas anteriores (12 y 13) el recobro final coincide con la combinación del rendimiento de la DMFS y la EFS-HPLC para la mayoría de los analitos.

Tabla 14. Comparación entre los límites de cuantificación alcanzados con el método de DMFS-HPLC reportado previamente y el método de DMFS/EFS-HPLC desarrollado.

| Analito | L. C. (ng g⁻¹) DMFS-HPLC | L. C. (ng g⁻¹) DMFS/EFS-HPLC | Proporción de los L. C. |
|-----------------------|--|--|------------------------------------|
| Metilparabeno | 1700 | 60 | 28.33 |
| Etilparabeno | 1700 | 40 | 42.50 |
| Propilparabeno | 2000 | 40 | 50 |
| Butilparabeno | No reportado | 40 | --- |
| Oxibenzona | 1700 | 60 | 28.33 |

De igual manera se observa en la tabla 14 que se logró reducir hasta 50 veces los límites de cuantificación para los analitos evaluados que incluso son cercanos a los reportados con sistemas como CG-MS para estos mismos analitos.

3.5 Aplicación del método DMFS/EFS-HPLC-UV a muestras comerciales de músculo de Tilapia Mojarra.

Al analizar las muestras obtenidas de los diferentes establecimientos y lugares de donde se obtuvo el músculo de tilapia se obtuvieron los cromatogramas correspondientes a la Figura 12. En ella se puede observar que en todas las muestras se detectaron picos con tiempo de retención cercanos al de la oxibenzona, de igual manera en las líneas C y D se encuentran picos que podrán pertenecer al etilparabeno al coincidir con su tiempo de retención.

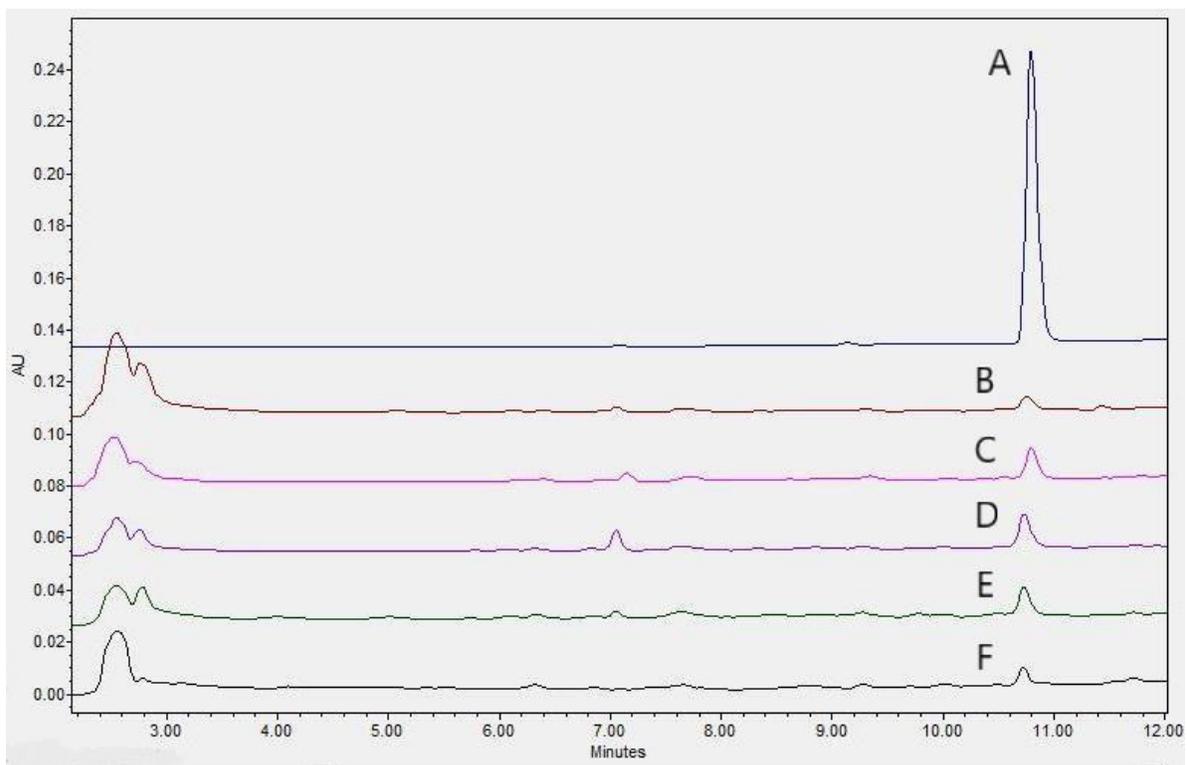


Figura 12. Cromatogramas obtenidos de los análisis realizados a las muestras de músculo de tilapia. 1.-STD de disolución a 10 ppm (A) 2.- Muestra de Wal-Mart (B), 3.- Muestra de Mercado “20 de Noviembre” (C), 4.- Muestra de Mercado “La Palma” (D), 5.- Muestra de Mega Comercial Mexicana (E) y 6.- Muestra de Hidalgo (F).

Para comprobar que se trataba de un pico perteneciente a la oxibenzona se analizaron las muestras en un equipo de HPLC Agilent 1100 con Detector de Arreglo de Diodos y el software Chemstation. Este sistema cromatográfico tiene la capacidad de adquirir el espectro de absorción UV de los analitos que conforman cada pico cromatográfico y permite compararlos contra el espectro de un estándar. Un ejemplo de esta comparación se presenta en la Figura 13.

Además de la comparación visual de los espectros, el software permite calcular el Factor de Coincidencia entre los espectros de la muestra y el estándar, asignando un valor de 1000 si la coincidencia es total en el intervalo de longitudes de onda seleccionado. En este caso, se obtuvieron factores de coincidencia de 847 para la muestra de Hidalgo, 951 para la muestra del Mercado "20 de Noviembre" y 974 para la muestra de Wal-Mart.

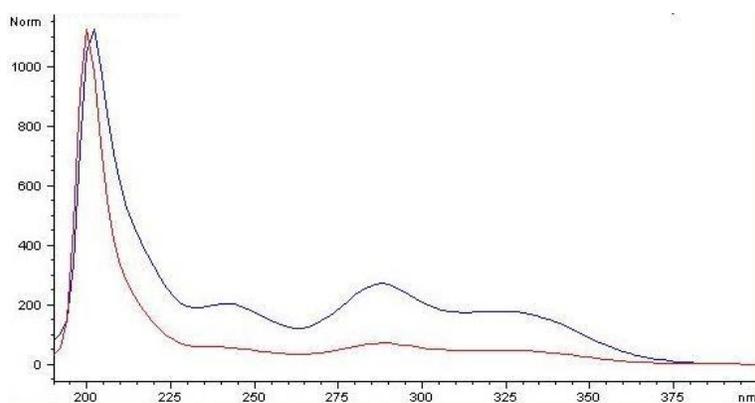


Figura 13. Espectros de las muestras de la laguna de Hidalgo (en rojo) comparados con el espectro de la oxibenzona (en azul).

De esta forma, los resultados indican que hay una alta probabilidad de que la oxibenzona esté presente en estas muestras de músculo de pescado. Sin embargo, no se pudo cuantificar el contenido debido a que las señales se encuentran por debajo de los límites de cuantificación ($< 60 \text{ ng g}^{-1}$).

Capítulo 4. Conclusiones

Se desarrolló una metodología que acopla la extracción en fase sólida en línea con un sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución y detección UV para el análisis de los compuestos metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno y oxibenzona en muestras de músculo de pescado para el monitoreo de estos contaminantes emergentes en muestras adquiridas en diferentes puntos de venta.

Las condiciones óptimas de preconcentración y análisis con el sistema de Extracción en Fase Sólida y Cromatografía de Líquidos en línea (EFS-HPLC-UV) fueron con un volumen de 4 mL y una concentración de 10 % de metanol en el extracto. Los recobros fueron entre 46.4% y 93.25% para todos los analitos.

El sistema EFS-HPLC-UV en línea presentó buena linealidad con valores de r^2 mayores a 0.99, precisión con valores de % C.V. menores a 8% y límites de cuantificación entre 15.7 y 37.8 ng g⁻¹.

El método DMFS-EFS-HPLC-UV mostró una linealidad buena con coeficientes de determinación mayores a 0.98. Los recobros obtenidos estuvieron entre 40.6% y 73.5 %. La precisión fue adecuada con % C.V. menores a 19.4 %. Los límites de detección estuvieron entre 13 y 20 µg g⁻¹, mientras que los límites de cuantificación estuvieron entre 40 y 60 µg g⁻¹.

El método validado fue aplicado a 5 muestras de músculo de Tilapia de diferentes lugares detectándose en todas ellas oxibenzona.

Perspectivas

El método desarrollado será aplicado para el análisis de diferentes muestras de músculo de pescado obtenidas en criaderos ubicados en la Ciudad de México y Zona Metropolitana para evaluar el estado en el que se encuentran distribuidos estos contaminantes, ya que, debido a la escasez y la contaminación, se suelen utilizar aguas que han estado en contacto con residuos domésticos para el cultivo de organismos como la Tilapia Mojarra.

Anexos

Anexo I

Diagramas de Pareto para la Optimización del sistema EFS-HPLC-UV

Diagrama de Pareto Estandarizada para MP

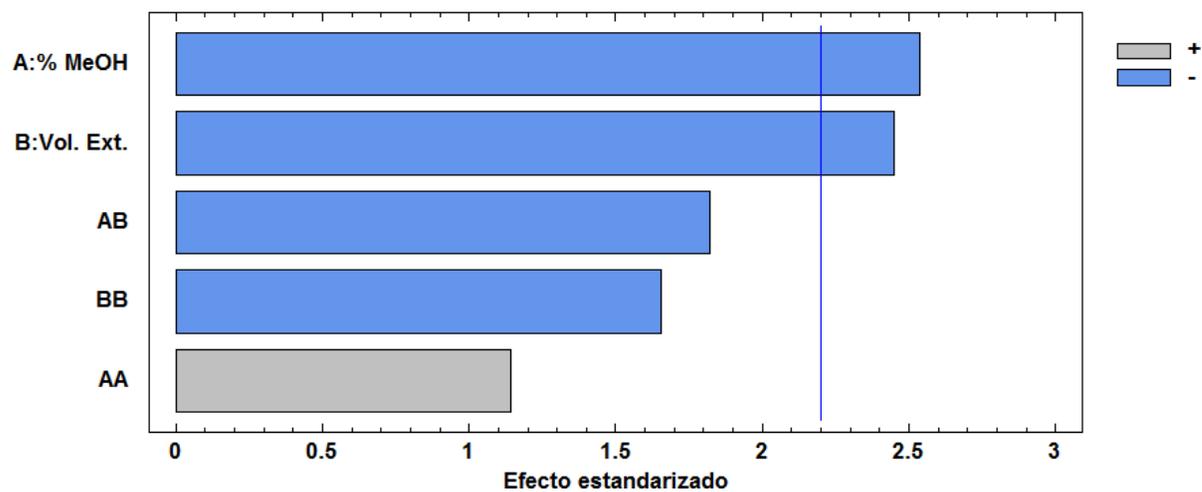


Diagrama de Pareto Estandarizada para EP

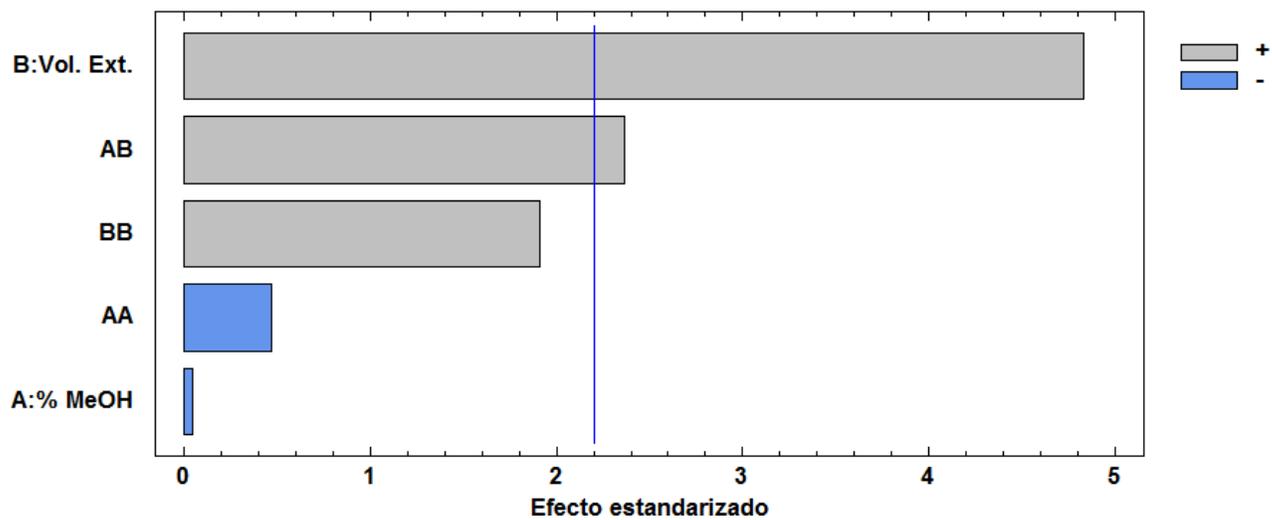


Diagrama de Pareto Estandarizada para PP

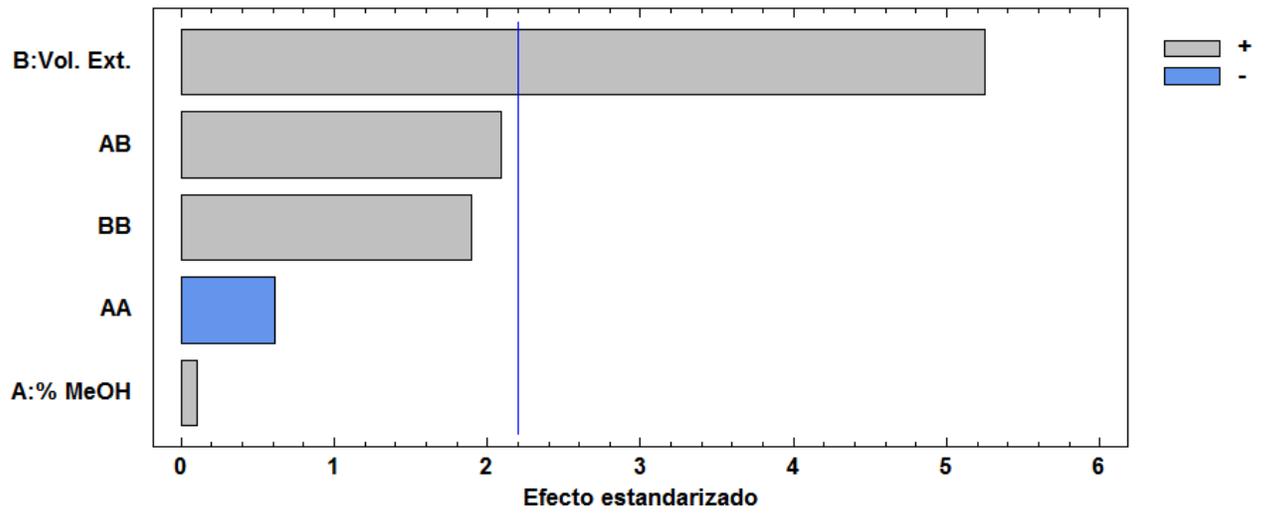


Diagrama de Pareto Estandarizada para BP

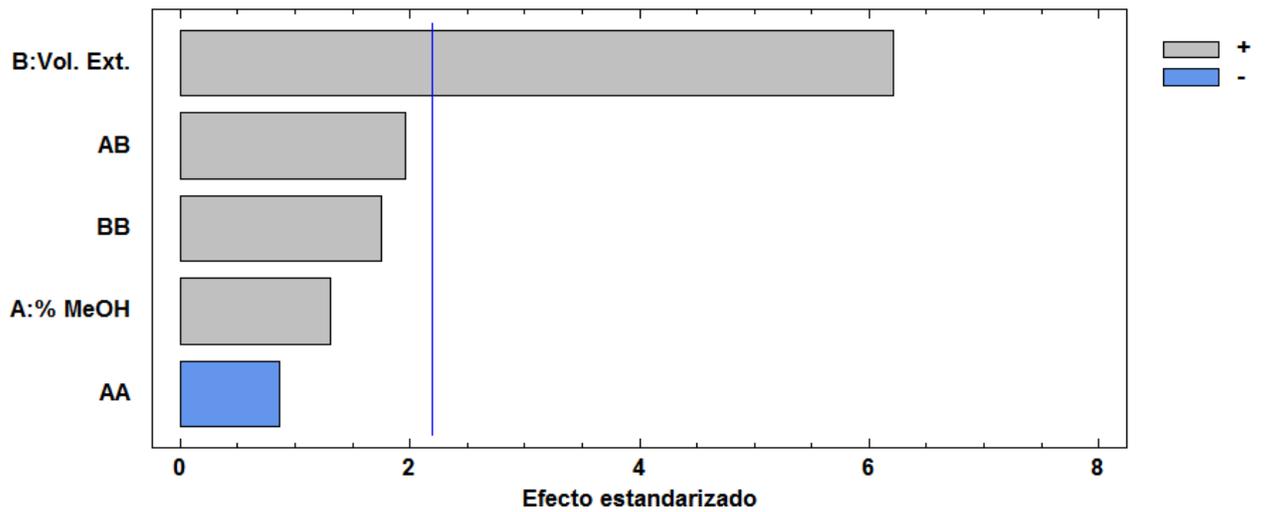
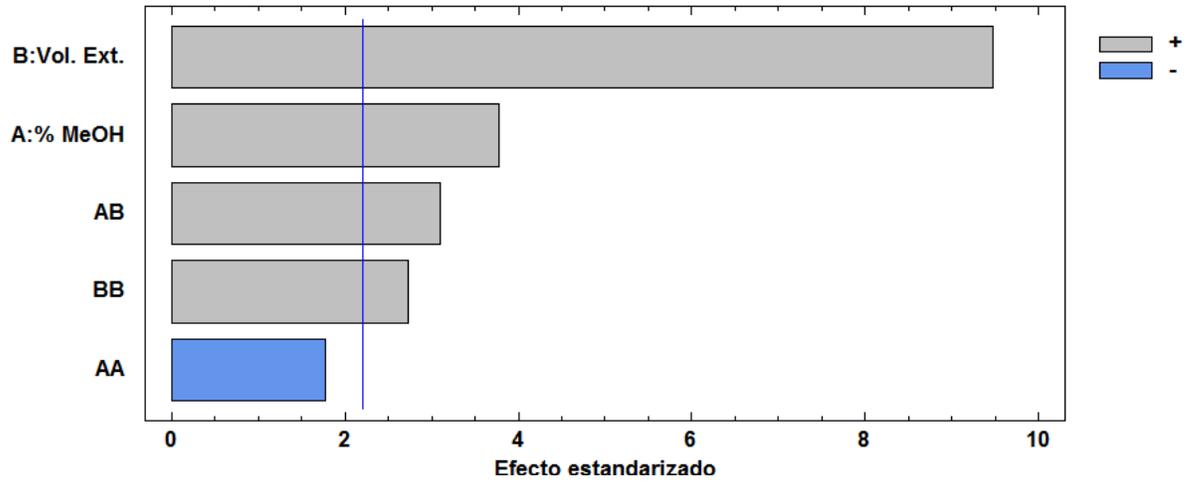
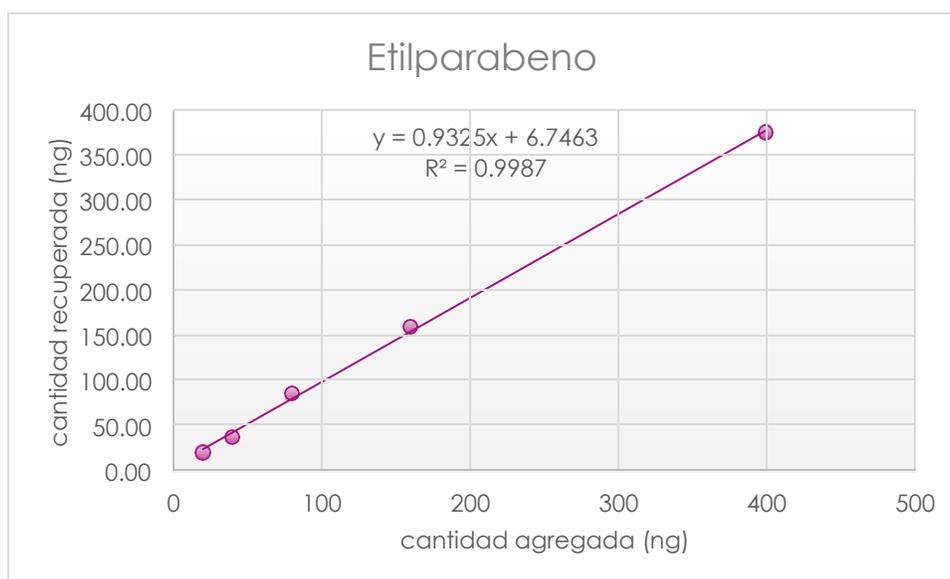
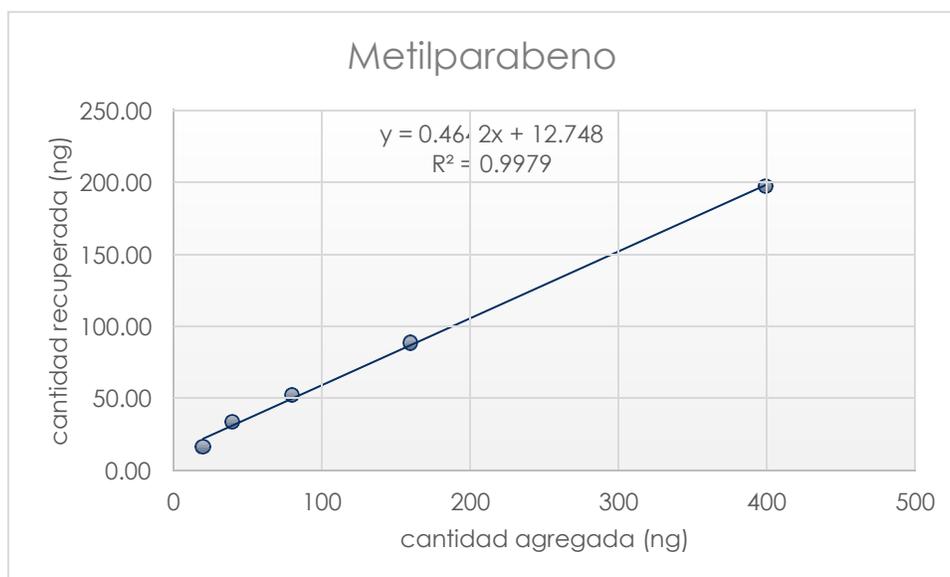


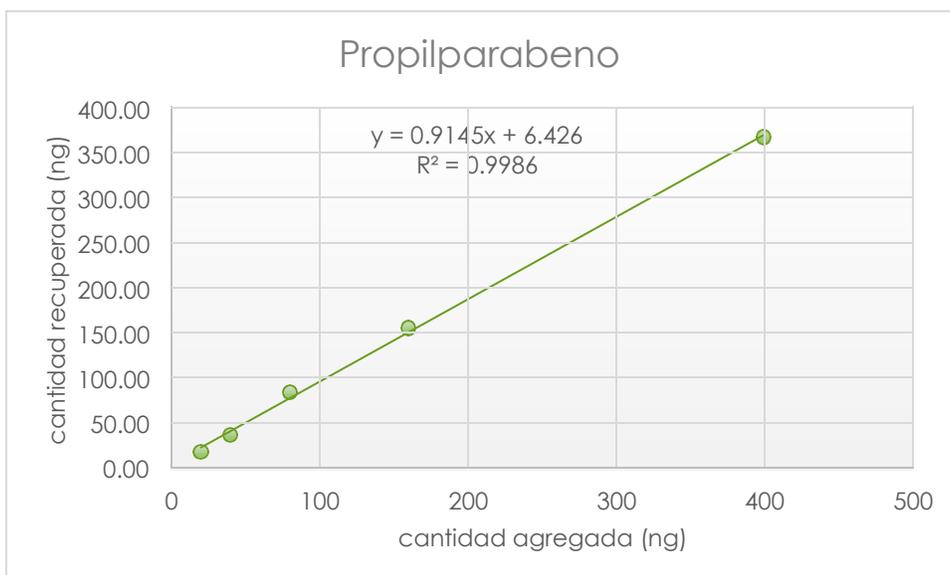
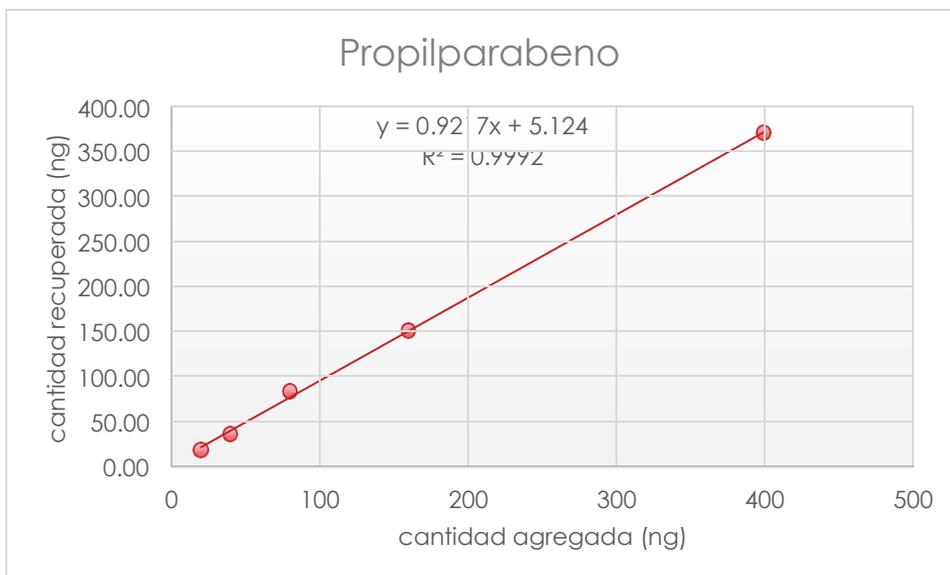
Diagrama de Pareto Estandarizada para Oxib

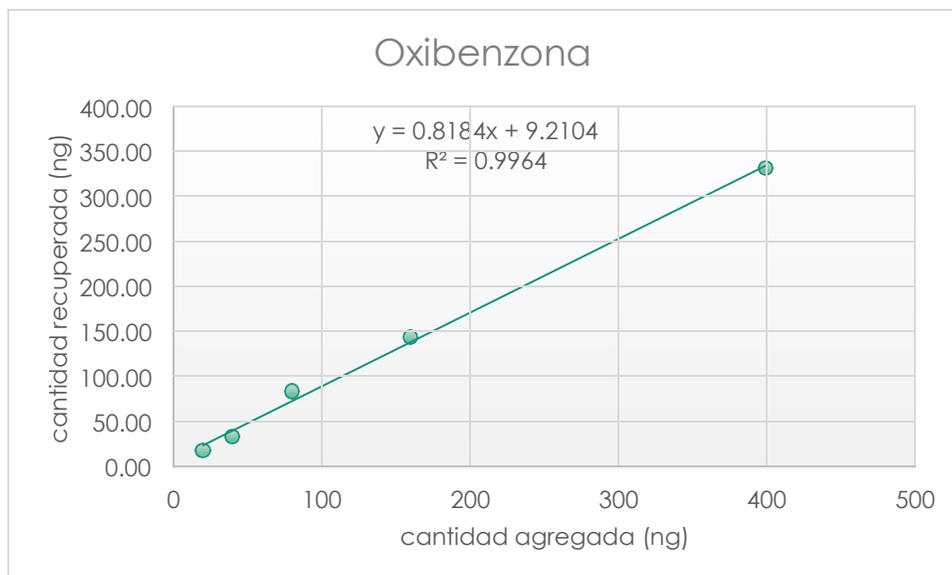


Anexo II

Curvas de calibración para la linealidad del sistema EFS-HPLC-UV.

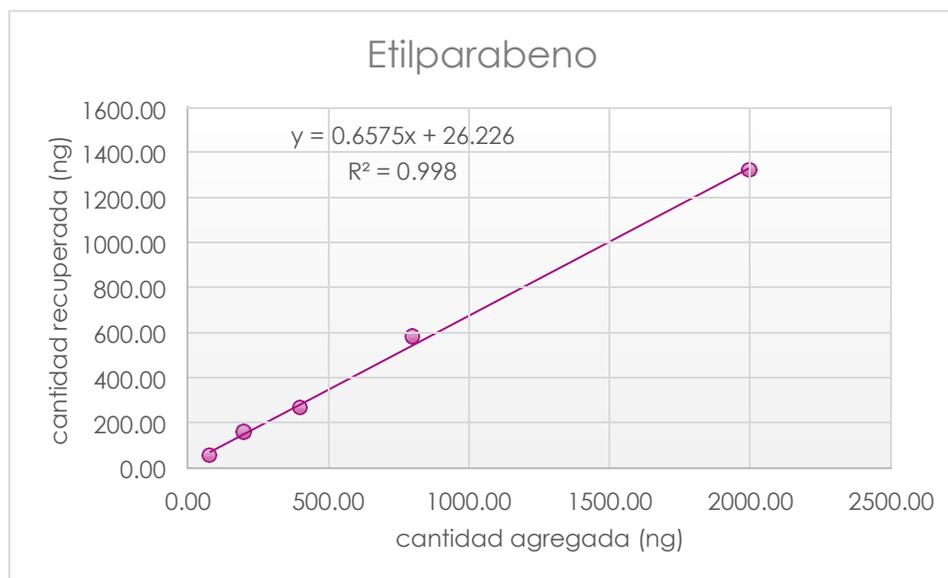
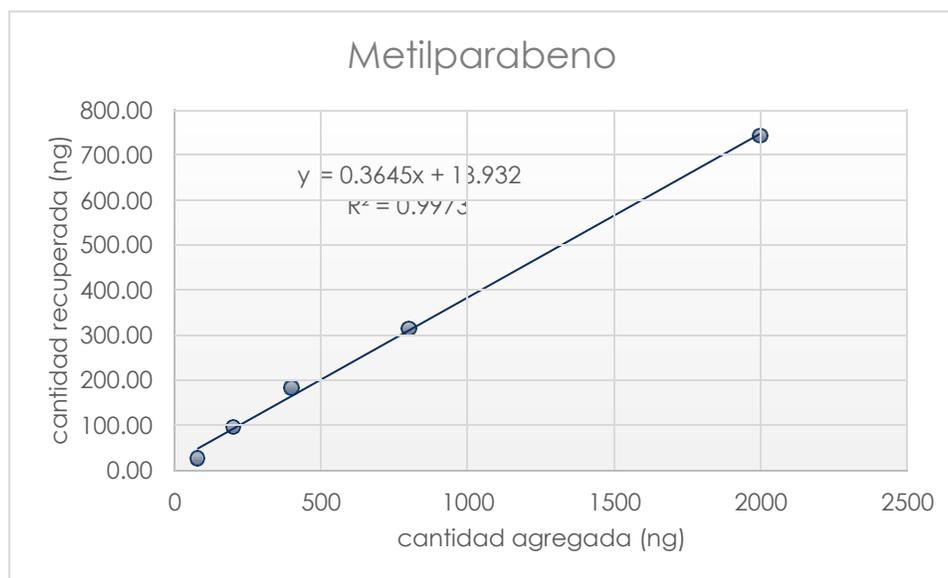


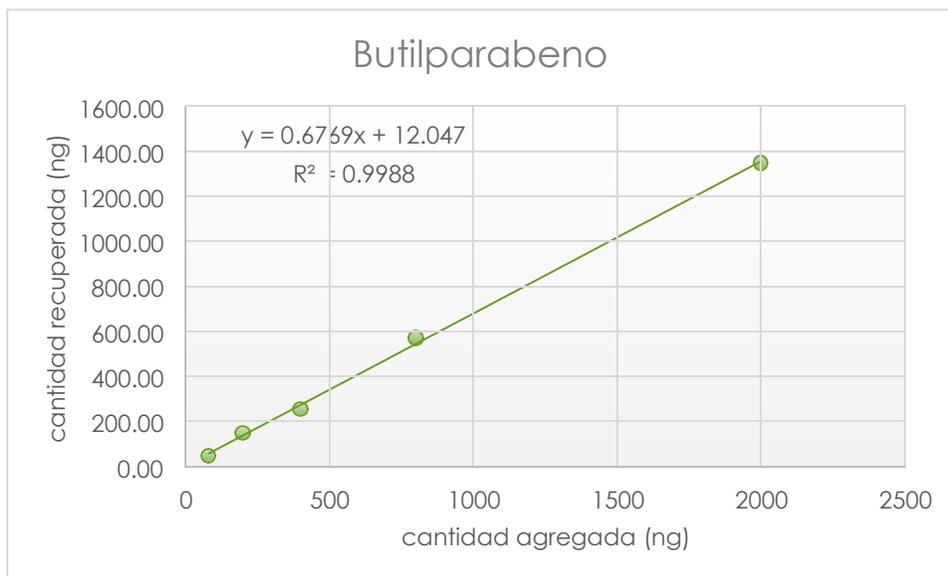
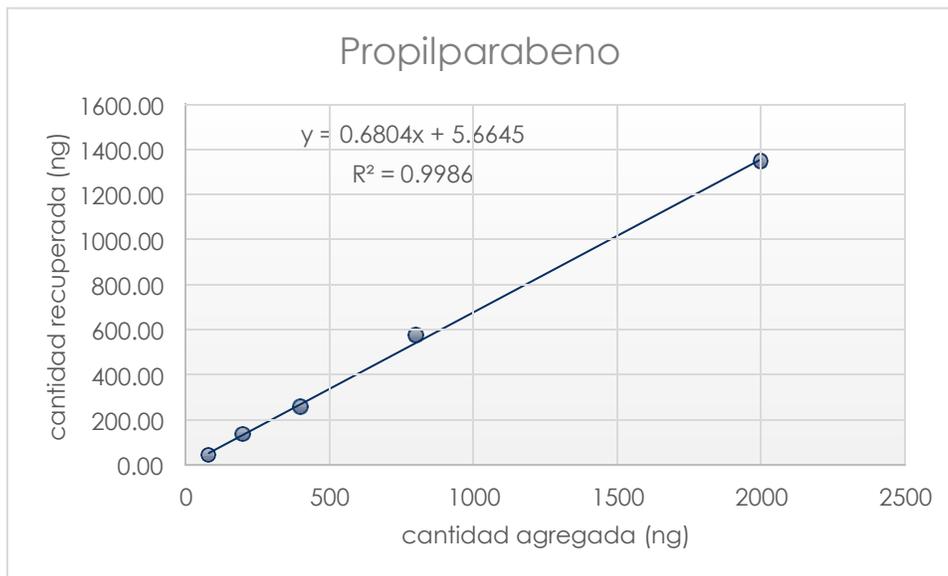


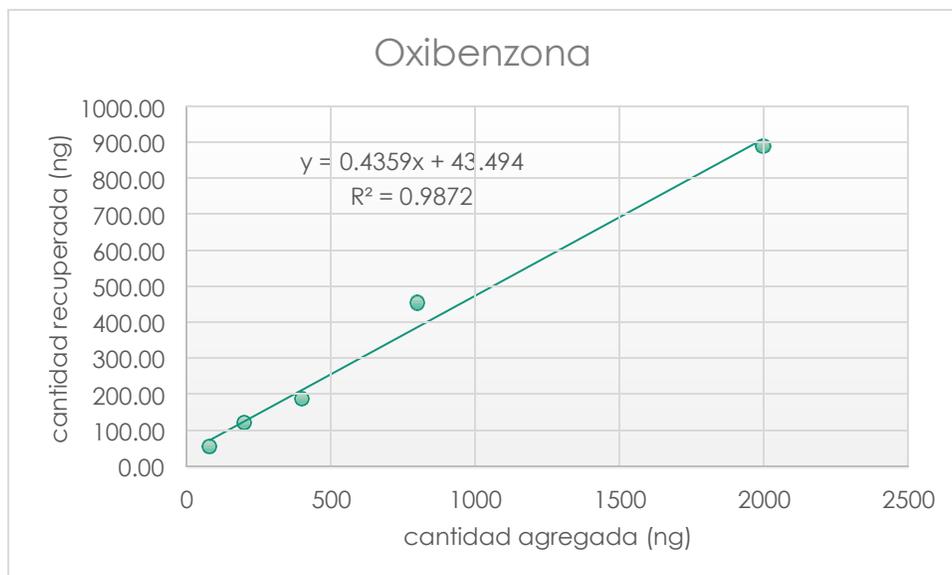


Anexo III

Curvas de calibración para la linealidad del método DMFS/EFS-HPLC-UV.







Referencias

1. Andrade-Eiroa, A., et al., *Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. part ii*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016. **80**: p. 655-667.
2. Campone, L., et al., *Rapid and automated on-line solid phase extraction HPLC–MS/MS with peak focusing for the determination of ochratoxin A in wine samples*. Food Chemistry, 2018. **244**: p. 128-135.
3. Ferreira, V.G., et al., *Online Extraction Coupled to Liquid Chromatography Analysis (OLE-LC): Eliminating Traditional Sample Preparation Steps in the Investigation of Solid Complex Matrices*. Analytical Chemistry, 2016. **88**(17): p. 8421-8427.
4. Romero, G.L., *Determinación de ingredientes de productos de cuidado personal en músculo de pescado mediante cromatografía de líquidos de alta resolución*. 2018, Universidad Nacional Autónoma de México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
5. Rocha-Gutiérrez, B.A., M.d.R. Peralta-Pérez, and F.J. Zavala-Díaz de la Serna, *Revisión global de los contaminantes emergentes PBDE y el caso particular de México*. Revista internacional de contaminación ambiental, 2015. **31**: p. 311-320.
6. Rodriguez-Narvaez, O.M., et al., *Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review*. Chemical Engineering Journal, 2017. **323**: p. 361-380.
7. Ye, X., et al., *Quantification of the urinary concentrations of parabens in humans by on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography–isotope dilution tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2006. **844**(1): p. 53-59.
8. S, R., et al., *Occurrence and toxicity of musks and UV filters in the marine environment*. Food and Chemical Toxicology, 2017. **104**: p. 57-68.
9. Brausch, J.M. and G.M. Rand, *A review of personal care products in the aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity*. Chemosphere, 2011. **82**(11): p. 1518-1532.
10. Yao, L., et al., *Personal care products in wild fish in two main Chinese rivers: Bioaccumulation potential and human health risks*. Science of The Total Environment, 2018. **621**: p. 1093-1102.
11. Agroalimentaria, F.V.p.I.S., *Parabenos en la Industria Alimentaria*. Fundación Vasca para la Seguridad Agroalimentaria, 2012. **38**.
12. Ocaña-González, J.A., et al., *New developments in the extraction and determination of parabens in cosmetics and environmental samples. A review*. Analytica Chimica Acta, 2015. **858**: p. 1-15.
13. Wilkinson, J., et al., *Occurrence, fate and transformation of emerging contaminants in water: An overarching review of the field*. Environmental Pollution, 2017. **231**: p. 954-970.
14. Industries, B. *Hoja de Seguridad. Oxibenzona*. 2016 [cited 2017 17 de Marzo]; Available from:
https://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA~en_US/Catalog/Additives/doc4/BASF/PRD/30471899/.pdf?asset_type=msds/pdf&language=ES&validArea=VE&urn=urn:documentum:ProductBase_EU:09007af8801ae46c.pdf.
15. Simpson, N.J.K., *Solid Phase Extraction*. 2000, Estados Unidos: Marcel Dekker.
16. Zhang, J., et al., *Determination of quinolones in wastewater by porous β -cyclodextrin polymer based solid-phase extraction coupled with HPLC*. Journal of Chromatography B, 2017. **1068-1069**: p. 24-32.
17. Tong, R., et al., *Online extraction–high performance liquid chromatography–diode array detector–quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry for rapid flavonoid profiling of Fructus aurantii immaturus*. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2018. **1077-1078**: p. 1-6.
18. Ebrahimpour, B., Y. Yamini, and A. Esrafil, *Emulsification liquid phase microextraction*

- followed by on-line phase separation coupled to high performance liquid chromatography.* Analytica Chimica Acta, 2012. **751**: p. 79-85.
19. Cabaleiro, N., et al., *An overview of sample preparation for the determination of parabens in cosmetics.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2014. **57**: p. 34-46.
 20. Gañán, J., et al., *Evaluation of a molecularly imprinted polymer for determination of steroids in goat milk by matrix solid phase dispersion.* Talanta, 2014. **126**: p. 157-162.
 21. Duarte, F.A., et al., *Assessment of Modified Matrix Solid-Phase Dispersion as Sample Preparation for the Determination of CH₃Hg⁺ and Hg²⁺ in Fish.* Analytica Chemistry, 2013.
 22. Barker, S.A., *Matrix solid phase dispersion (MSPD).* Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2007. **70**(2): p. 151-162.
 23. Canosa, P., et al., *Determination of Parabens and Triclosan in Indoor Dust Using Matrix Solid-Phase Dispersion and Gas Chromatography with Tandem Mass Spectrometry.* Analytical Chemistry, 2007. **79**(4): p. 1675-1681.
 24. Vela-Soria, F., et al., *Matrix solid phase dispersion for the extraction of selected endocrine disrupting chemicals from human placental tissue prior to UHPLC-MS/MS analysis.* Vol. 118. 2015. 32-39.
 25. Fotouhi, M., et al., *Magnetically assisted matrix solid phase dispersion for extraction of parabens from breast milks.* J Chromatogr A, 2017. **1504**: p. 17-26.
 26. Piao, C., L. Chen, and Y. Wang, *A review of the extraction and chromatographic determination methods for the analysis of parabens.* Journal of Chromatography B, 2014. **969**: p. 139-148.
 27. Djatmika, R., et al., *Determination of paraben preservatives in seafood using matrix solid-phase dispersion and on-line acetylation gas chromatography-mass spectrometry.* Journal of Chromatography B, 2016. **1036-1037**: p. 93-99.
 28. Hui-Ting, Z., E.M.C. Ding, and W.-H. Ding, *Determination of parabens in human urine by optimal ultrasound-assisted emulsification microextraction and on-line acetylation gas chromatography-mass spectrometry.* Journal of Chromatography B, 2017. **1058**: p. 14-18.
 29. Moos, R.K., et al., *Rapid determination of nine parabens and seven other environmental phenols in urine samples of German children and adults.* International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2014. **217**(8): p. 845-853.
 30. Pulido, H.G. and R.d.l.V. Salazar, *Análisis y diseño de experimentos* Tercera ed. 2012, México.
 31. García, M.J.G., *Introducción a la cromatografía líquida de alta resolución* 2009, España: Servicio de Publicaciones de la Universidad Autónoma de Madrid.
 32. Rigo Bonnin, R., et al., *Desarrollo de procedimientos de medida basados en la cromatografía líquida de alta resolución.* Revista del Laboratorio Clínico, 2017.
 33. Díez, L.M.P., *Fundamentos de Cromatografía.* 2015, España: Dextra.
 34. González de Buitrago, J.M., *14 - Cromatografía,* in *Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico (Terza edizione).* 2010, Elsevier España. p. 197-210.
 35. I.C.o.H.o.T.R.f.R.o.P.f.H., *Validation of analytical procedures: Text and methodology* ICH Harmonised Tripartite Guideline, 2005.
 36. Taverniers, I., M. De Loose, and E. Van Bockstaele, *Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance.* TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2004. **23**(8): p. 535-552.
 37. CromLab S.L. (2014). *"Extracción en Fase Sólida EFS-SPE"*. [cited 2017 17 de Marzo]; Available from: http://www.cromlab.es/EFS_Principal.htm



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 la presente

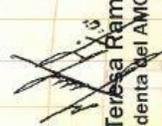
CONSTANCIA

A: Samara Guadalupe Carduño Durán, Alma Luisa Revilla Vázquez y José de Jesús Olmos Espejel

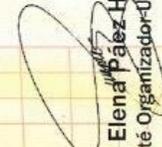
Por la presentación ORAL del trabajo: «EXTRACCIÓN DE PARABENOS Y FILTROS UV EN MÚSCULO DE TILAPIA MOJARRA MEDIANTE DMFS Y ANÁLISIS POR EFS-CLAR EN LÍNEA». Lo anterior en el marco de las actividades del XXXI Congreso Nacional de Química Analítica celebrado del 13 al 15 de junio de 2018 en el Centro de Negocios Universidad - UAEH.

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


Dr. Oscar Suárez Castillo
Director del ICBI-UAEH


Dra. María Teresa Ramírez Silva
Presidenta del AMQA


Dra. Qjivia 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: Guadalupe Samara Garduño Durán, Alma Luisa Revilla
Vázquez, José de Jesús Olmos Espejel

Por su valiosa participación y exposición del cartel titulado:

**"EXTRACCIÓN DE PARABENOS Y FILTROS UV EN
MÚSCULO DE TILAPIA MOJARRA MEDIANTE DMFS Y
ANÁLISIS POR EFS-CLAR EN LÍNEA"**

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, 18 de junio de 2018

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

4º CONGRESO



4º CONGRESO
CIENCIA, EDUCACIÓN
Y TECNOLOGÍA

