



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**“Desarrollo de un método miniaturizado de
extracción por adsorbentes sólidos y análisis
cromatográfico para el monitoreo de parabenos y
filtros UV en cultivos de microalgas”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO INDUSTRIAL

P R E S E N T A:

ALAN MAXIMILIANO RODRÍGUEZ RIVERO

ASESOR:

Dr. José de Jesús Olmos Espejel

Cuautitlán Izcalli Estado de México, 2020



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

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**

Desarrollo de un método miniaturizado de extracción por absorbentes sólidos y análisis cromatográfico para el monitoreo de parabenos y filtros UV en cultivos de microalgas.

Que presenta el pasante: **Alan Maximiliano Rodríguez Rivero**
Con número de cuenta: **309312437** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Química Industrial**

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 30 de Enero de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. María Guadalupe Pérez Caballero	
VOCAL	M. en FQ. Juan Carlos Rueda Jackson	
SECRETARIO	Dr. José de Jesús Olmos Espejel	
1er. SUPLENTE	M. en FQ. Verónica Altamirano Lugo	
2do. SUPLENTE	M.C. Enrique Ramos López	

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

LMCF/cga*

Este trabajo se desarrolló gracias al financiamiento otorgado por la DGAPA-UNAM a los proyectos PAPIME (PE205416) y PAPIIT (IA204717). Además, se contó con el apoyo de la Secretaría de Investigación y Posgrado de la FES Cuautitlán mediante el proyecto PIAPI PIAPI2038

Este trabajo de tesis se desarrolló en el laboratorio L-112 de la Sección de Química Analítica en el Campo 1 de la FES Cuautitlán.

Parte de este trabajo se presentó en los siguientes eventos:

XXXI Congreso Nacional de Química Analítica desarrollado en la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo en junio de 2018.

4o Congreso de Educación Ciencia y Tecnología desarrollado en la FES Cuautitlán en junio de 2018.

Agradecimientos

- A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por permitirme ser parte de esta gran casa de estudios y de este plantel en particular.
- A la DGAPA-UNAM y la Secretaría de Investigación y Posgrado de la FES Cuautitlán por el apoyo a los proyectos relacionados con este trabajo de tesis.
- A la Sección de Química Analítica por el apoyo brindado durante el desarrollo de la tesis.
- A los sinodales, por su contribución con la revisión y corrección del escrito.
- A los integrantes del programa PROCEL, José Arturo Martín Tereso, Luis Alberto Parra Oaxaca, Ángel Raygoza Trejo, Alejandra Sánchez Barrera, Hugo Cautecontzi Flores y Omar Olvera García por su trabajo en el mantenimiento y revisión del equipamiento utilizado.
- Al Dr. José de Jesús Olmos Espejel por compartirme de su conocimiento y guiarme en el fin de mi carrera.

Para los que ya no están, y para los que nunca estuvieron.

Contenido

Abreviaturas	8
Introducción.....	10
Resumen.....	12
Objetivo.....	13
Objetivos particulares	13
1. Antecedentes.....	14
1.1 Contaminantes emergentes.....	14
1.2 Productos de cuidado personal.....	16
1.3 Características de los analitos de interés.	19
1.4 Tratamientos biológicos para la remoción de los PCPs.....	22
1.5 Microorganismo en estudio: <i>Scenedesmus acutus</i>	23
1.6 Extracción en Fase Sólida.....	25
1.7 Dispersión de Matriz en Fase Sólida.....	27
1.8 Cromatografía de líquidos de alta resolución.	30
1.9 Metodologías analíticas recientes destinadas al monitoreo de productos de cuidado personal en cultivos de microorganismos.....	33
2. Metodología	35
2.1 Materiales, reactivos	35
2.2 Instrumentación y condiciones cromatográficas.....	35
2.3 Preparación de los cultivos y mantenimiento.....	36
2.3 Preparación de las disoluciones estándar.....	37
2.4 Desempeño del sistema cromatográfico.....	37
2.4.1 Linealidad.....	37
2.4.2 Repetibilidad.....	38
2.4.3 Límites de cuantificación y detección del sistema.	38
2.5 Análisis del sobrenadante de cultivos de microalgas mediante EFS-CL-UV.	38
2.6 Validación del método por EFS-CL-UV.	39
2.6.1 Linealidad.....	39
2.6.2 Exactitud.....	39
2.6.3 Repetibilidad.....	39
2.6.4 Límites de detección y cuantificación del método.	39
2.7 Análisis de la biomasa recuperada de cultivos de microalgas mediante DMFS.	39

2.8	Validación del método por DMFS-CL-UV.....	40
2.8.1	Linealidad.....	40
2.8.2	Exactitud.....	40
2.8.3	Repetibilidad.....	40
2.8.4	Límites de detección y cuantificación del método.....	40
2.9	Aplicación de los métodos desarrollados en un experimento de exposición de cultivos de <i>Scenedesmus acutus</i> a una mezcla de los contaminantes estudiados.....	41
3.	Resultados y análisis.....	43
3.1	Separación cromatográfica.....	43
3.2	Desempeño del sistema cromatográfico.....	43
3.3	Optimización del método de EFS-CL-UV para la extracción de los contaminantes en muestras de sobrenadante de cultivo.....	45
3.4	Validación del método de EFS-CL-UV para la determinación de los contaminantes en sobrenadante de cultivo de microalgas.....	46
3.5	Optimización del método por DMFS para la extracción de los contaminantes en biomasa de microalgas.....	48
3.6	Validación del método por DMFS-CL-UV para el análisis de los contaminantes en biomasa de microalgas.....	48
3.7	Aplicación de los métodos desarrollados en un ensayo de exposición a los contaminantes emergentes.....	50
	Conclusiones.....	54
	Perspectivas.....	54
4.	Bibliografía.....	55

Índice de figuras.

Figura 1.	Clasificación de los contaminantes emergentes.....	15
Figura 2.	Micrografía de <i>Scenedesmus acutus</i> (Protist Information Server, 2019).....	24
Figura 3.	Diagrama general de la EFS. Adaptado de [32].	27
Figura 4.	Esquema general de la DMFS. Adaptado de [35].....	30
Figura 5.	Cultivos de la microalga <i>Scenedesmus acutus</i>	37
Figura 6.	Metodología del análisis de las muestras de cultivo de microalgas mediante EFS y DMFS.....	41
Figura 7.	Metodología del experimento de exposición.....	42
Figura 8.	Cromatograma obtenido para una disolución estándar a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$	43
Figura 9.	Optimización del volumen de acetonitrilo necesario para recuperar los analitos del cartucho de EFS.....	45

Figura 10. Comparación de los extractos obtenidos por DMFS	48
Figura 11. Cromatogramas obtenidos en el análisis de muestras de sobrenadante de cultivos de microalgas expuestos a una concentración de contaminantes de 0.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$	50
Figura 12. Cromatogramas obtenidos en el análisis de muestras de biomasa de microalgas expuestas a una concentración de contaminantes de 0.75 $\mu\text{g mL}^{-1}$	51
Figura 13. Cantidades recuperadas de los contaminantes en la biomasa y sobrenadante de cultivos de microalgas expuestos.....	52
Figura 14. Porcentajes de remoción de los contaminantes emergentes por acción de las microalgas.	53

Índice de tablas

Tabla 1. Listado de productos que conforman las categorías de productos de cuidado personal.	17
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos de interés.....	21
Tabla 3. Principales tratamientos biológicos.....	22
Tabla 4. Fuerza de elución, índice de polaridad.	32
Tabla 5. Métodos recientes de remoción de parabenos y filtros UV.....	34
Tabla 6. Gradiente para la separación de parabenos y oxibenzona.	36
Tabla 7. Cantidades de reactivos para preparar medio de cultivo	36
Tabla 8. Desempeño del sistema cromatográfico..	44
Tabla 9. Validación del método por EFS-CL-UV.....	47
Tabla 10. Validación del método por DMFS-CL-UV.	49
Tabla 11. Resultados del analito oxibenona, a los diferentes tiempos de exposición,	53

Abreviaturas

HPLC-UV: La cromatografía líquida de alto rendimiento asociada a un detector UV visible.
 CE: Contaminantes emergentes.
 PCPs: Productos de cuidado personal.
 EFS: Extracción en fase sólida.
 DMFS: Dispersión de matriz en fase sólida
 EFS-CL-UV: extracción en fase sólida y cromatografía de líquidos con detección UV.
 DMFS-CL-UV: dispersión de matriz en fase sólida y cromatografía de líquidos con detección UV.
 GC-MS / MS: Cromatografía de gases-espectrometría de masas.
 LCMS / MS: Cromatografía líquida-espectrometría de masas.
 EDAR: Plantas de tratamiento de aguas residuales.
 PAHs: hidrocarburos aromáticos policíclicos.
 Rpm: revoluciones por minuto.
 MP: metilparabeno
 EP: etilparabeno.
 PP: propilparabeno.
 BP: butilparabeno

Oxi: Oxibenzona

Introducción

Los parabenos y filtros UV son productos usados en la producción de productos de cuidado personal. Debido a su pseudo persistencia, se ha encontrado un aumento en la concentración de estos en aguas residuales, lo que lleva a un interés en las posibles consecuencias en su impacto ambiental. Se ha detectado en estudios, que la presencia de estos productos puede alterar hormonal y fisiológicamente a organismos durante su desarrollo.

Los contaminantes llegan principalmente en efluentes de descargas domésticas para terminar a plantas de tratamiento de agua residual, y al no estar regulados, las plantas de tratamiento de aguas no tienen métodos para separarlos lo que hace que este sea ciclo continuo de contaminación y contacto con estos productos.

Por lo anterior, es de suma importancia estudiar un método para la degradación de estos productos. Algunos de estos métodos tienen como agente de degradación a microalgas, lo que tiene ventajas ambientales al ser un método barato y con una alternativa a la generación de biodiesel.

Al ser estos productos contaminantes emergentes, y encontrarse en concentraciones de trazas, es de gran importancia desarrollar métodos para su identificación y cuantificación en matrices complejas, como lo son los cultivos de microalgas, en este caso de la especie *Scenedesmus acutus*, y así después monitorear su posible remoción.

La extracción en fase sólida es una técnica de preparación de muestra muy utilizado, debido a las ventajas que brinda, como es la reducción en la cantidad de muestra necesaria para el análisis, así como el gasto en reactivos, lo que reduce costos. Además de ser fácil de realizar, selectiva debido a la eliminación de impurezas, de rápida realización y que reduce los límites de cuantificación considerablemente.

Existen pocos estudios respecto a este tema por lo que en esta tesis se presenta la validación de una metodología de extracción de los parabenos, metil, etil, propil, y butilparabeno, así como el filtro UV, oxibenzona mediante las técnicas de preparación de muestras, extracción en fase sólida para el sobrenadante de cultivos de microalgas, como el desarrollo de la metodología y validación de dispersión de matriz en fase sólida para la biomasa de estos mismos cultivos de *Scenedesmus acutus*. Analizando después estas extracciones en un sistema HPLC-UV, lo que después nos permitirá realizar el monitoreo de la degradación de estos productos efectuada por el cultivo de microalgas en tiempos determinados.

En el primer capítulo de esta tesis se hace una investigación de los antecedentes de este trabajo; se trata la descripción de los contaminantes emergentes, así como de los productos de cuidado personal; se exponen las características de los analitos de interés, así como del microorganismo de estudio; la descripción de las técnicas de extracción que serán usadas en este trabajo, y una revisión a metodologías recientemente usadas en el monitoreo de productos de cuidado personal en microorganismos.

En el segundo capítulo se aborda la metodología usada en esta tesis, los materiales y reactivos utilizados, condiciones cromatográficas, la preparación y mantenimiento de los cultivos de microalgas; desempeño cromatográfico bajo las condiciones dadas, así como la descripción del análisis de validación al sobrenadante y biomasa obtenida de los cultivos por las técnicas de extracción utilizadas para posteriormente monitorear un estudio de remoción en tiempos determinados,

Para terminar, se presenta el análisis de los resultados y las conclusiones a las que se llegaron a partir de los resultados obtenidos.

Resumen

Los contaminantes emergentes (CE) son principalmente sustancias orgánicas sintéticas que han sido detectadas desde hace algunas décadas en el ambiente. Estos contaminantes incluyen a un grupo de sustancias llamadas Productos de Cuidado Personal (PCPs) que comúnmente se agregan a los cosméticos, protectores solares, suplementos alimenticios y fragancias. Los PCPs son un amplio grupo de compuestos relativamente nuevos, que en su mayoría no han sido regulados y pueden causar deterioro en el ambiente por lo cual su estudio tiene un interés creciente. Este trabajo se enfoca en los parabenos y la oxibenzona porque son sustancias que pueden afectar la calidad del agua disponible para los diferentes ecosistemas. El tratamiento de aguas contaminadas utilizando organismos como las microalgas tiene la ventaja de proporcionar metodologías eficientes y limpias mediante procesos de bioacumulación o metabolismo de los contaminantes. En esta investigación se desarrolló y validó un método de Extracción en Fase Sólida (EFS) para el monitoreo de las concentraciones remanentes de los analitos en el medio líquido al realizar ensayos de remoción. De igual forma, se desarrolló y validó un método basado en la técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) para monitorear la acumulación de los contaminantes en la biomasa de los microorganismos expuestos. Como organismo en estudio se utilizó la microalga de agua dulce *Scenedesmus acutus* que ha sido utilizada para la remoción de diferentes contaminantes persistentes. En ambos métodos se utilizó sílice C18 como adsorbente y la elución fue realizada con una mezcla de metanol:agua (para DMFS) y con acetonitrilo (para EFS). Las muestras se analizaron mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detección UV. Las metodologías desarrolladas permitieron obtener recobros entre 80 y 93 % en las muestras de biomasa y entre 87 y 97 % para las muestras de sobrenadante de los cultivos. Las metodologías se aplicaron a ensayos de remoción y acumulación a diferentes tiempos de exposición y se observó que las microalgas metabolizan a los parabenos de ambas matrices (sobrenadante y biomasa) siendo capaces de reducirlos, mientras que son capaces de acumular a la oxibenzona después de un tiempo de exposición de 24 h.

Objetivo

Desarrollar una metodología analítica que permita la extracción y análisis de contaminantes emergentes en cultivos de microalgas verdes para evaluar la capacidad de remoción que tienen estos microorganismos utilizando métodos de preparación de muestra con adsorbentes sólidos y análisis por cromatografía de líquidos.

Objetivos particulares

Desarrollar un método por extracción en fase sólida y cromatografía de líquidos con detección UV (EFS-CL-UV) para la determinación de parabenos y oxibenzona a partir de muestras de sobrenadante de cultivo de microalgas utilizando métodos de preparación de muestra con adsorbentes sólidos y análisis por cromatografía de líquidos.

Validar el método de EFS-CL-UV evaluando los parámetros de linealidad, exactitud, repetibilidad, límites de detección y límites de cuantificación para posteriormente evaluar la capacidad de remoción de los analitos de estudio en cultivos de microalgas.

Desarrollar un método por dispersión de matriz en fase sólida y cromatografía de líquidos con detección UV (DMFS-CL-UV) para la determinación de parabenos y oxibenzona en muestras de biomasa utilizando métodos de preparación de muestra con adsorbentes sólidos y análisis por cromatografía de líquidos.

Validar el método de DMFS-CL-UV evaluando los parámetros de linealidad, exactitud, repetibilidad, límites de detección y límites de cuantificación para posteriormente aplicarlos en un estudio de remoción.

Evaluar la utilidad del método en un ensayo de exposición de cultivos de microalgas a los contaminantes metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno y oxibenzona, exponiendo los analitos de estudio al contacto con microalgas en tres diferentes tiempos para observar si existe absorción por parte de las microalgas o una posible degradación.

1. Antecedentes

1.1 Contaminantes emergentes.

Las principales investigaciones sobre la calidad de agua se han centrado en contaminantes con un efecto en la salud conocida. Sin embargo, en las últimas décadas, investigaciones han descubierto contaminantes que pertenecen a diversas clases químicas y son típicamente detectados en niveles de trazas. Estos compuestos son llamados contaminantes emergentes (CE) debido a que son productos químicos relativamente nuevos o que no se detectaban previamente y por lo tanto no están regulados.

Estos nuevos contaminantes se pueden determinar debido a que: se han desarrollado métodos para detectarlos a concentraciones bajas, que antes eran imperceptibles, ahora se conoce que ciertas sustancias deben controlarse. Cada vez se cuenta con una mayor cantidad de productos químicos nuevos, y puede haber nuevos usos de las sustancias existentes [1, 2].

Aunque los CE han sido detectados en el medio ambiente, no existe suficiente información para determinar su potencial riesgo ambiental o de salud humana. Se han llevado a cabo una serie de estudios para determinar la toxicidad de un número muy limitado de CE en diferentes ecosistemas y los resultados indican que estos pueden causar diversas afecciones como: daño hormonal; problemas en el desarrollo de diferentes organismos; cambios en la bioquímica de especies marinas [3, 4].

Las fuentes de CE son las mismas que los contaminantes conocidos, ya que estos entran en el medio ambiente a través de procesos y emisiones industriales, aguas residuales y vertidos de efluentes. Las fuentes de contaminación se pueden clasificar de manera general en dos tipos: fuentes puntuales y fuentes no puntuales. La fuente puntual se refiere a contaminantes que se lanzan desde una ubicación específica y las entradas en el sistema ambiental se pueden demarcar espacialmente; a menudo las cargas de estas fuentes se concentran. Ejemplos típicos incluyen descargas de actividades industriales, plantas de tratamiento de aguas residuales y extracción de minerales. La fuente no puntual o conocida se refiere a contaminación de diferentes fuentes que normalmente ocurren en grandes áreas. Las instancias típicas incluyen la escorrentía producida por la aplicación de bio-sólidos o estiércol a los suelos y el desbordamiento de la lluvia en zonas urbanas o áreas industriales [3].

La diversidad de estos contaminantes abarca desde sustancias como productos farmacéuticos, plastificantes, productos de cuidado personal (PCPs), entre otros. En estos últimos, el principal uso es como conservadores en productos como fragancias, jabones, protectores solares, etc. Estos compuestos se liberan continuamente en el ambiente, a un ritmo ligeramente creciente causada por la pseudo-persistencia que puede generar efectos adversos en diferentes organismos [1, 5].

De forma general, los CE se pueden clasificar como se indica en la figura 1.



Figura 1. Clasificación de los contaminantes emergentes.

Los filtros UV orgánicos no solo se usan en productos de protección solar, sino también en otros productos de cuidado personal (PCPs) como cosméticos, cremas, lociones, aerosoles para el cabello, tintes, champú, etc. Después de ser utilizados, los filtros UV pueden ingresar al medio acuático a través de rutas directas, como son actividades recreativas en el agua, o indirectas como lo son los efluentes las plantas de tratamiento de aguas residuales. Los filtros UV en el ambiente acuático han sido considerados como tóxicos para los organismos acuáticos. Se ha encontrado que el compuesto oxibenzona, podría alterar el sistema endócrino de algunos organismos. Las concentraciones detectadas de estos filtros en los efluentes de las plantas de tratamiento son más bajas que las descargas corrientes. Sin embargo, la descarga continua y crónica hace que la exposición a estos filtros UV pueda suponer un riesgo para los organismos acuáticos [4].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define disruptores endocrinos (DE) como “sustancia exógena o mezcla, que altera la (s) función (es) del sistema endocrino y en consecuencia causa efectos adversos para la salud en un organismo, su progeñie o

subpoblación”. Los CE incluyen un vasto grupo de sustancias químicas, de origen natural (por ejemplo, micotoxinas y fitoestrógenos) y sintético (por ejemplo, dietilstilbestrol (DES) y bisfenol A) en variedades de productos de consumo (por ejemplo, PCPs, productos de limpieza, antimicrobianos, conservantes de alimentos y ftalatos). Además, la toxicidad derivada de complejas mezclas de PCPs en bajas concentraciones podría conducir a interacciones. Esto significa que mientras pueden estar presentes PCPs de manera individual a bajas concentraciones que no provoquen efectos tóxicos significativos, mientras que, las mezclas de PCPs pueden ejercer una considerable ecotoxicidad [6].

En muchas ocasiones el efluente de las plantas de tratamiento de aguas residuales son una de las principales fuentes de liberación de CE en aguas superficiales y sedimentos. La razón por la que se encuentran CE residuales en el efluente de estas plantas de tratamiento es que la mayoría de las están diseñadas para la purificación parcial de aguas residuales (reducción de la demanda biológica de oxígeno, patógenos, etc.) y por lo tanto no son capaces de tratar CE en concentraciones muy bajas. Estos efluentes deben tratarse con otras estrategias complementarias, que incluyen la reducción de las liberaciones mediante una mejor gestión, mejor uso de productos químicos, minimización de desechos y su eliminación apropiada, así como, utilizar sistemas mejorados de tratamiento de agua. La descarga continua y la exposición crónica a estos productos químicos puede suponer un riesgo para la salud humana, incluso a niveles traza [3-5].

1.2 Productos de cuidado personal.

Los productos de cuidado personal (PCPs) se usan principalmente para mejorar la calidad de la vida cotidiana. En los últimos años, se ha incrementado el conocimiento de la presencia involuntaria de PCPs en diversos lugares del entorno acuático, debido a diversas actividades antropogénicas que pueden generar concentraciones que son capaces de causar efectos perjudiciales a los organismos. Esto se ha convertido en una gran preocupación porque los PCPs son cada vez más utilizado en las actividades humanas provocando una liberación continua al ambiente. Los avances de la Química Analítica han permitido detectar estos contaminantes en niveles de trazas lo cual ha incrementado la atención del mundo a estos contaminantes [6-8].

En la tabla 1 se presenta una lista de productos y actividades humanas que generan descargas de PCPs en el ambiente.

Tabla 1. Listado de productos que conforman las categorías de productos de cuidado personal. [9]

Nombre de la categoría	Ejemplos de productos
Antitranspirantes y desodorantes	Stick o barra, roll on, crema, gel y spray.
Coloración	Decolorante, matizador o tonalizante, retocador de raíces, tinte, colorante, coloración y desvanecedor de canas.
Cuidado del cabello	Acondicionador, shampoo, mascara o mascarilla, serum, tratamiento o protector.
Cuidado de la piel y uñas	Crema, depilatorio, loción facial o corporal, serum o suero, solución, tónico, aclarador o despigmentador de la piel, autobronceador, brillo/glitter, decolorante de vello superfluo, desmaquillante, preparaciones para el afeitado, talco, repelente de insectos, splash, adhesivo para uñas postizas, barniz o esmalte, disolvente de esmalte o barniz, endurecedor, removedor de cutícula, secador de esmalte, exfoliante facial o corporal, sales para baño, mascarilla y dermolimpiador.
Cuidado bucal/oral	Dentífricos, enjuagues bucales y refrescantes del aliento.
Estilizado del cabello	Crema para peinar, fijador, gel, ondulador, permanente, alaciador, estilizador, modelador, y brillo.
Higiene corporal	Jabón de tocador, dermolimpiador, baños de burbujas o baños perfumados.
Higiene íntima	Preparaciones para baño, ducha (sal, espuma, aceite, gel, spray, crema, etc.) y toalles.
Lociones y fragancias	Agua de colonia, agua de tocador, colonia, perfume y loción.
Maquillaje	Ojos y cejas: adhesivo para pestañas postizas, brillo, gloss o glitter, delineador, máscara, sombras y desmaquillante (considerando que hay desmaquillantes exclusivos para esta zona). Labios: brillo, gloss o glitter, delineador y labial. Facial o corporal: maquillaje (líquido, polvo compacto o suelto), rubor, iluminador y corrector.
Productos para bebés y niños.	Crema, talco, aceite, shampoo, acondicionador, gel, y jabón.
Protección solar y bronceadores	Protector solar y bronceador.

Debido a las propiedades fisicoquímicas de los PCPs, no se eliminan fácilmente con los procesos de tratamiento de agua convencionales llegando a aparecer en el agua potable. La incapacidad para llevar a cabo una eliminación completa de los PCPs plantea un riesgo potencial para los organismos acuáticos y la salud pública. Aunque no todos los PCPs son persistentes, por su uso continuo y su liberación al medio ambiente, muchos los consideran "pseudo-persistentes". Las mejoras en los métodos de extracción que combina con técnicas analíticas avanzadas, tales como cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS / MS) y cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS/MS), aumenta significativamente la capacidad de detectar la distribución de PCP en el medio ambiente [6, 8].

Diversos estudios demuestran que la toxicidad de los PCPs varía dependiendo del organismo expuesto, la duración de la exposición, la concentración de contaminantes y la ventana de desarrollo en la cual ocurre la exposición. Además, los efectos crónicos de la exposición a estas trazas, especialmente en ciertas etapas del desarrollo pueden causar anomalías [6, 10].

Las principales fuentes de PCP hacia el medio ambiente son a través de plantas de tratamiento de aguas residuales (EDAR) y lixiviación de vertederos. Los PCPs a menudo no son completamente eliminados durante los procesos convencionales de tratamiento de aguas residuales, y por lo tanto son frecuentemente detectables en aguas superficiales en concentraciones que van desde ng/L a mg/L [6, 8, 10].

Debido a un conocimiento insuficiente acerca de la toxicidad, impactos y comportamiento de los PCPs, solo un número pequeño de estas sustancias son monitoreadas de manera rutinaria en el medio ambiente y muchos no están regulados. Sin embargo, cada vez es más reconocido el potencial de riesgo que los PCPs pueden adquirir en el medio ambiente, y se pueden esperar las regulaciones relevantes en las próximas décadas [7].

Se conoce que algunos compuestos son significativamente degradados más rápido y más fácil en condiciones aeróbicas que anaeróbicas y esto puede relacionarse con las diferentes actividades microbianas de organismos aerobios y anaerobios. En aguas subterráneas, los microorganismos no son tan numerosos y diversos en comparación con aguas superficiales. Como tal, los PCPs en aguas subterráneas pueden sufrir una degradación incompleta,

potencialmente cambiando a metabolitos peligrosos o incluso, permanecer sin cambios en aguas subterráneas durante largos períodos [7].

1.3 Características de los analitos de interés.

La conserva de productos en buen estado ha sido un tema de interés y en la búsqueda del conservante ideal, se han hecho muchos avances, aunque no se ha tenido éxito para obtener uno que sea estable, eficaz en un amplio margen de pH, no tóxico, ni irritante.

Los parabenos son una familia de alquil-ésteres del ácido parahidroxibenzoico que se utiliza con estos fines. El grupo éster se localiza en la posición C-4 del ácido. Desde que su efecto antimicrobiano fue descrito en 1924, los parabenos, son de los conservantes más utilizados en productos de cuidado personal, farmacológicos y alimentos debido a que cumplen con la mayoría de las propiedades requeridas además de ser moléculas inodoras, incoloras, no volátiles, eficaces en un amplio margen de pH y baratas [11, 12].

Sus diferentes estructuras químicas hacen que cada parabeno tenga propiedades distintas. Son eficaces frente a hongos y levaduras, pero también frente a bacterias. Se suele utilizar en combinaciones entre ellos y junto con otros antimicrobianos. Cuanto más larga es la cadena hidrocarbonada del éster, mayor es su liposolubilidad. Estudios recientes apuntan que una fracción de los parabenos podría ser absorbidas y retenerse sin ser metabolizados, con los consiguientes posibles efectos. Cuando se aplican sobre la piel mediante productos tópicos, la absorción percutánea de los parabenos aumenta al prolongarse la cadena de carbonos y con el incremento de la temperatura. Al atravesar la epidermis, los parabenos son metabolizados por esterasas localizadas en la dermis y en el tejido graso, lo que permite tiempos de residencia largos [11, 12].

Recientemente, se sugirió que los parabenos pueden estar involucrados en el sistema endocrino y esta es una posible causa de cáncer de mama debido a que estos alteran las concentraciones de estrógeno y esto resulta en problemas reproductivos. Los disruptores endócrinos (DE) también pueden interactuar con diferentes tejidos sensibles a los esteroides para causar un mal funcionamiento del sistema nervioso central, el sistema inmune, homeostasis de lípidos, cambios en los niveles de glucosa y en el funcionamiento de la tiroides. El cuadro clínico más frecuentemente asociado a los parabenos es la dermatitis de contacto alérgica por el uso de productos que contienen estos conservantes [11, 12].

La actividad estrogénica de los parabenos ha demostrado ser mayor para aquellos con una cadena de mayor longitud. Respecto a la capacidad de interferir en la fertilidad masculina, se han publicado diversos trabajos donde se demuestra un efecto antiespermatogénico en organismos con el propil, y butilparabeno, mientras que para metil-, y etil-parabeno no se encontró tal efecto. El potencial estrogénico o antiandrogénico de los parabenos es bajo por sí mismos. Sin embargo, cuando entran en contacto con otros productos químicos, se sabe que los efectos estrogénicos generales aumentan sustancialmente [11].

En este trabajo, nos centraremos en el estudio de los conservantes metil-, etil-, propil-, y butilparabeno, debido a que son los ésteres más empleados.

En los últimos años se ha determinado que la radiación ultravioleta (UV) es una amenaza para la salud pública ya que puede ser factor del cáncer de piel, quemaduras solares y envejecimiento prematuro. La radiación UV puede llegar a la superficie en dos diferentes formas a través de los rayos UVA, que abarcan de los 315 a los 400 nm y los rayos UVB, que abarcan desde los 280 a los 315 nm, mientras que los rayos UVC que incluyen radiaciones entre los 200 y los 280 nm son absorbidos por el ozono en la estratosfera. Los filtros UV son compuestos diseñados para proteger la piel contra el daño por radiación UVA y UVB. Dependiendo de su mecanismo de acción pueden absorben esta radiación provocando un estado de excitación de electrones en la molécula, el exceso de energía se disipa por emisión de longitudes de onda más altas o procesos fotoquímicos de relajación. Los bloqueadores solares inorgánicos, como el dióxido de titanio y óxido de zinc, protegen la piel al reflejar y dispersar la radiación UV. Aunque los filtros UV se incorporan principalmente en productos de cuidado personal como lociones de protección solar, cuidado de la piel, maquillaje facial y productos para el cuidado de los labios, también se incluyen en una amplia gama de productos, incluidos los plásticos, adhesivos, pintura y caucho para protegerlos contra la degradación UV [13].

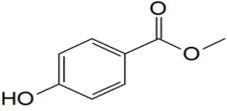
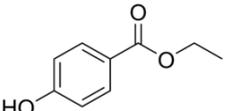
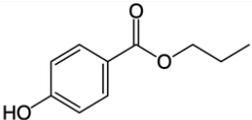
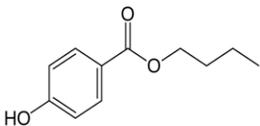
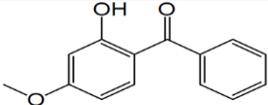
En los últimos años, se han detectado concentraciones de filtros UV en niveles de trazas, en diferentes matrices ambientales, pero principalmente en agua en el orden de los $\mu\text{g/L}$. Sin embargo, los efectos y consecuencias de su presencia son un tema de discusión que requiere la generación de conocimiento sobre su presencia en el ambiente y la ecotoxicidad que puede producir. Se espera que los estudios de evaluación de riesgos puedan llevar a imponer límites máximos permitidos para algunos de estos compuestos en efluentes de aguas residuales en el

futuro. La razón por la cual estos compuestos están bajo la lupa es por su las toxicidad y efectos estrogénicos adversos que ha mostrado en la biota y humanos [13].

Se ha prestado atención a la interacción de los filtros UV en la reproducción sexual de mamíferos y en la evaluación del riesgo potencial para los humanos. Sin embargo, también hay evidencia de los efectos tóxicos y de las deficiencias en el desarrollo o la reproducción de invertebrados en la presencia de filtros UV [6, 13, 14].

En la tabla 2 se muestran las propiedades fisicoquímicas de los compuestos estudiados.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los compuestos de interés.

Compuesto	Estructura	Solubilidad a 25 °C (mg/L)	log Kow oct/H ₂ O	Peso molecular (g/mol)
Metilparabeno		2500	1.96	152.149
Etilparabeno		885	2.47	166.176
Propilparabeno		463	3.04	180.203
Butilparabeno		207	3.57	194.23
Oxibenzona		3.7	3.57	228.247

En la tabla anterior se observa que los analitos tienen un carácter medianamente polar ya que sus valores de solubilidad en la mayoría de los casos son menores 2500 mg/L por lo cual se considera que tienden a acumularse en los compartimentos menos polares del ambiente como podrían ser los sedimentos, lodos e incluso las células de los seres vivos.

La mayoría de los productos de cuidado personal se encuentran en aguas residuales y consecuentemente en ríos, lagos, y mares. De esta forma, no es sorprendente encontrar los analitos de interés en el medio ambiente, debido a su uso masivo y a sus propiedades fisicoquímicas, se pueden considerar como contaminantes persistentes. Los principales problemas ambientales relacionados es su potencial de actuar como disruptor endocrino, y la probable absorción por organismos anfibios, acuáticos y terrestres [13].

1.4 Tratamientos biológicos para la remoción de los PCPs.

En un ambiente acuático continuamente expuesto a contaminantes, se ha llevado a cabo la purificación del agua contaminada utilizando diferentes tecnologías, físicas, químicas y biológicas han sido usadas durante las últimas décadas para la remoción de residuos de contaminantes emergentes[15-17].

Los tratamientos biológicos son la tecnología más usada para la remoción de contaminantes emergentes, esta tecnología incluye:

Tabla 3. Principales tratamientos biológicos.

Lodo activado	Humedal artificial	Biorreactor de membrana
Biorreactor aeróbico	Biorreactor anaeróbico	Biorreactor de microalgas
Biorreactor fúngico	Filtro percolante	Nitrificación
Reactor biológico giratorio.	Tratamiento enzimático.	

Algunos bioprocesos, como estos han informado eficiencias muy diferentes en la eliminación de estos contaminantes, desde la eliminación casi completa hasta la no eliminación de algunos compuestos. La biotransformación, biodegradación, y la adsorción con adsorbentes convencionales como el carbón activado son los métodos más utilizados, sin embargo, las plantas convencionales de tratamiento de aguas residuales son ineficientes en la eliminación de PCPs debido a su baja biodegradabilidad [15, 16].

Las tecnologías de tratamiento químico también son ampliamente utilizadas para la degradación de micro contaminantes orgánicos no biodegradables, estos métodos incluyen

métodos convencionales de oxidación como lo son la ozonación y la fotólisis, o procesos avanzados de oxidación. Los tratamientos físicos han demostrado tener poca eficiencia en la remoción de CE, ya que su remoción es inferior al 10%. Pero es posible acoplar métodos de tratamiento físicos a diferentes metodologías de remoción, haciendo sistemas híbridos. Se ha demostrado que para mayor eficiencia en la eliminación de CE se debe utilizar una secuencia de diferentes tipos de tratamiento (físico, químico y biológico) y así tener una eliminación importante de estos contaminantes [15, 18].

Existen diferentes técnicas de tratamiento biológico por los cuales son tratadas las aguas residuales, la eliminación o capacidad de degradación de los CE depende de la sustancia química, sus propiedades fisicoquímicas, y la tecnología usada para su remoción. Los métodos de biodegradación se han usado tradicionalmente en sistemas de tratamiento de aguas residuales para la eliminación de CE. La biodegradación es el proceso por el cual grandes moléculas de CE de gran peso molecular son degradadas por microorganismos, tales como bacterias, algas, y hongos en moléculas pequeñas [15, 19].

Los estudios a cerca de la degradación por microorganismos se han centrado en los resultados obtenidos con bacterias y hongos, los procesos de tratamiento biológico con microalgas se pueden aplicar para eliminar un amplio rango de CE de aguas residuales, además que tienen ventajas en su uso sobre procesos químicos dado su precio, que son amigables con el medio ambiente y que la biomasa se puede recuperar, ya sea para la obtención de biodiesel o fertilizante. Las más utilizadas son las especies *Scenedesmus* y *Clorella* [15, 20-22].

La aplicación de procesos biológicos en la eliminación de bloqueadores beta se encontraron eficiencias de eliminación variables en diferentes procesos biológicos, dependiendo del compuesto específico, y condición de tratamiento, pero es evidente que al ser sometidos a procesos de eliminación por microalgas ya que es conocido que algunas especies de microalgas utilizan el carbono adicional de los contaminantes orgánicos como sustrato para su crecimiento. Estudios han reportado diferentes eficiencias dependiendo del contaminante y la especie utilizada de microalga [15, 19, 20, 22].

1.5 Microorganismo en estudio: *Scenedesmus acutus*.

Las microalgas son organismos fotosintéticos que no sólo necesitan la luz solar para producir oxígeno, también requieren de sustancias inorgánicas simples como dióxido de carbono,

compuestos nitrogenados y fosforados. Debido a su alto contenido de lípidos (por lo regular de 20 a 50% del peso seco) y a su crecimiento exponencial, han sido utilizadas como organismos útiles para la remoción de diferentes tipos de contaminantes persistentes como metales pesados e hidrocarburos [23-25] . Sin embargo, la información referente a la remoción de contaminantes emergentes es escasa. Las microalgas representan la base de cadena alimenticia acuática, por lo cual, pueden actuar en la transferencia de los contaminantes a través de la cadena trófica [26].

El género *Scenedesmus* comprende especies de microalgas verdes, de agua dulce. Por lo regular, forma grupos entre 2 a 16 células, con morfología aguda y fusiforme, las cuales se unen de lado a lado en un mismo plano, con los ejes longitudinales paralelos y su reproducción es asexual [27]. En la figura 2 se presenta una micrografía del organismo.



Figura 2. Micrografía de *Scenedesmus acutus* (Protist Information Server, 2019)

Disponibile en: http://protist.i.hosei.ac.jp/Protist_menuE.html

Este organismo presenta también las siguientes características:

- 1) alta productividad de lípidos;
- 2) soporta los esfuerzos de corte que se presentan en los fotobioreactores;
- 3) es tolerante a la contaminación;
- 4) soporta altas concentraciones de CO₂ y presenta un alto consumo de éste;
- 5) tiene bajo requerimiento de nutrientes;
- 6) es tolerante a cambios de temperatura;
- 7) proporciona co-productos valiosos;
- 8) tiene un ciclo corto de crecimiento;

- 9) tiene una alta eficiencia fotosintética;
- 10) presenta características de auto-floculación [27].

1.6 Extracción en Fase Sólida.

La preparación de muestras es un paso crucial en todo proceso analítico porque afecta significativamente el tiempo total requerido para completar el análisis, la calidad de los resultados y el costo. Un procedimiento ideal de preparación de la muestra debe concentrar el analito mientras se eliminan los potenciales interferentes, evitando degradación del analito y / o formación de productos; además, el procedimiento debe ser robusto, reproducible e independiente de variaciones en la matriz de la muestra [28, 29].

La extracción en fase sólida (EFS) es el procedimiento más utilizado para pre-concentración de trazas de contaminantes en el medio ambiente, la limpieza, extracción, y fraccionamiento en muestras biológicas. Algunas metodologías como la EPA incluyen la EFS como un procedimiento recomendado para el tratamiento previo de contaminantes orgánicos, así como para la extracción y limpieza de productos de cuidado personal en aguas [30].

El procedimiento básico de la EFS consiste en cargar una solución en una fase sólida (usualmente un cartucho que contiene el adsorbente) capaz de retener los analitos objetivo, lavando/eluyendo los contaminantes no deseados con otros disolventes en un tubo de recogida. El acondicionamiento de la fase sólida consiste en pasar disolventes orgánicos o agua a través de la columna para aumentar la superficie de área efectiva y reducir interferencias. Al eliminar las interferencias, el material de la fase sólida se lava con pequeños volúmenes de disolventes orgánicos que conducen a la desorción de los analitos objetivo de la fase sólida. Es similar a las separaciones de cromatografía de líquidos que consiste en un intercambio de especies moleculares entra la fase móvil y la fase estacionaria en equilibrio [28, 30].

Algunas de las ventajas de utilizar EFS a extracción líquido-líquido es que puede evitar que los analitos se descompongan, y por lo tanto ser almacenados durante un tiempo sin ningún cambio de concentración o identidad, y por otro lado el transporte y manejo de los cartuchos es mucho más conveniente que contenedores de vidrio voluminosos, haciendo la EFS más rápida y menos laboriosa [31].

Otra ventaja importante de EFS es que puede extraer una amplia gama de analitos orgánicos (de no polares a muy polares) de una gran variedad de muestras, como compuestos orgánicos,

biológicos, alimentos, muestras ambientales, productos farmacéuticos, de cuidado personal, subproductos de desinfección del agua potable. La EFS puede extraer una amplia gama de compuestos con alta selectividad, aunque algunos investigadores opinan lo contrario ya que una misma fase sólida como el C18 puede ser utilizada para la extracción de compuestos no polares y polares, por ejemplo: plaguicidas de bajo peso molecular, materia orgánica disuelta, PAHs de muestras de agua. Casi cualquier adsorbente puede retener cualquier tipo de compuesto, este puede ser un aparente inconveniente, dependiendo del contexto. Así, la extracción simultánea de una gran cantidad de compuestos orgánicos puede ahorrar tiempo, dinero y solventes [28, 31].

Según los resultados obtenidos, los protocolos de la EFS no se han sistematizado, ya que cada compuesto tiene sus propios protocolos de acondicionamiento y elución, limpieza y concentración de los grupos. Siendo el proceso de prueba y error el más utilizado para optimizar protocolos de EFS. Es simple, pero requiere tiempo y trabajo, por otra parte, ignora dos facetas que es la teoría y fundamentos para la capacidad de predicción [31].

El objetivo principal de la EFS es eliminar la matriz compleja y recolectar el analito de interés, sin interferentes que dificulten el análisis y con los analitos de interés a una concentración mínima requerida para el instrumento. Para poder optimizar cada uno de estos procesos necesitamos saber más sobre la capacidad de un adsorbente en fase sólida y cómo se relaciona con la muestra. También necesitaremos saber cómo las propiedades de los diferentes tipos de adsorbentes afectan los pasos de retención y elución de nuestro analito objetivo. Esto, a su vez, nos permitirá identificar los disolventes que proporcionan una excelente elución al tiempo que permite una mayor concentración si es necesario [28].

La sílice que se usa en la mayoría de las aplicaciones cromatográficas y en los procedimientos típicos de EFS es un sólido poroso amorfo con un área superficial de entre 50-500 m²/g y diámetros de poro de 50-500 Å. Las principales ventajas de la sílice son su disponibilidad en una amplia gama de superficies bien definidas, áreas y tamaños de poros, así como su costo relativamente bajo. Si bien una muy específica área de superficie y tamaño de los poros son importantes en la mayoría de las aplicaciones de HPLC, tales especificaciones estrictas no son necesarias en SPE, estos requisitos reducidos hacen que el costo de la sílice sea aún más bajo y explica su popularidad como material adsorbente en EFS. Las propiedades fisicoquímicas del analito y el adsorbente son de suma importancia para la retención del

analito en un material adsorbente particular, hemos visto cómo el modelado y la teoría pueden ayudarnos a anticipar el mejor adsorbente y la elección de condiciones para la extracción de un analito [28].

En la figura 3 se muestra un esquema general del proceso de EFS.

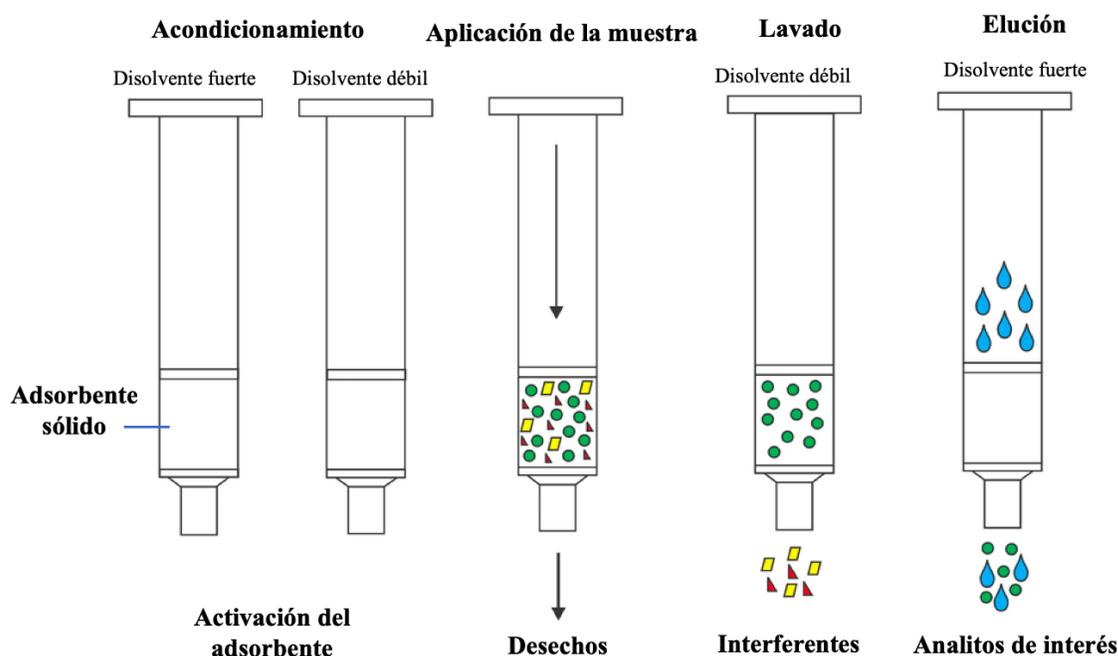


Figura 3. Diagrama general de la EFS. Adaptado de [32].

1.7 Dispersión de Matriz en Fase Sólida.

La dispersión en fase sólida (DMFS) reemplazó principalmente a los métodos clásicos de extracción con solvente, estimulando así el desarrollo de nuevos y mejorados materiales adsorbentes. Se hizo muy popular ya que es un métodos rápido, fácil, barato, efectivo, robusto y seguro. Se usa comúnmente para muestras sólidas y ha demostrado ser una técnica eficiente y versátil para aislar diferentes clases de sustancias, como pesticidas, drogas, contaminantes, y compuestos de origen natural, de una amplia variedad de animales y muestras de plantas. Aunque DMFS fue desarrollado para extraer muestras sólidas, al alterar su estructura, su aplicación pronto se extendió a muestras viscosas y líquidas, como la leche [29].

La DMFS es simple ya que no requiere instrumentación o equipo específico, flexible y robusta en comparación con otros métodos de preparación de muestras. Las condiciones de

extracción suaves (es decir, la temperatura ambiente y la presión atmosférica) preservan los analitos de la degradación. Las opciones de soporte sólido y disolvente de elución determinan la eficiencia y la selectividad del proceso. En general, requiere de un bajo consumo de disolventes orgánicos, especialmente si se miniaturiza. Aunque la extracción basada en esta técnica es bastante rápida, puede no estar completamente automatizado, y esto representa un obstáculo cuando deben ser análisis rutinarios que deben realizarse en grandes conjuntos de muestras. En la mayoría de los casos, las muestras preparadas o extraídas por DMFS y son luego analizadas por cromatografía de gases (CG) o líquidos (CL) [29].

El procedimiento consiste en tres pasos principales, la dispersión de la muestra con el material adsorbente, sirviendo este como abrasivo. Destruye la arquitectura muestral a través fuerzas de corte aplicadas. Estos se proporcionan mediante molienda o mezcla con un mortero de vidrio o ágata (materiales no porosos) son los morteros más utilizados. La fase sólida, por ejemplo, C18, sirve para ayudar en el proceso de ruptura de la muestra mediante la solubilización de lípidos integrales, aparentemente desplegándose y rompiendo las membranas celulares y subestructuras internas. La cantidad de soporte sólido que se utiliza depende del tipo de muestra. Las proporciones de muestra / adsorbente típicamente varían de 1: 1 a 1: 4. La consistencia del material mezclado resultante es la de un polvo semi-seco, esta mezcla es lo suficientemente seca para empaquetar una columna (a menudo construida a partir de una jeringa o algún otro dispositivo apropiado) que contiene un frit que retiene toda la muestra. Un segundo frit se coloca a menudo sobre la mezcla antes de la compresión, se deben evitar los canales en la columna y no comprimir en exceso o compactar el material para realizar la elución. Este enfoque general ha demostrado ser aplicable a una amplia gama de matrices y tipos de analitos. El paso siguiente será eluir con disolventes como si fuera un dispositivo estándar de EFS, como se muestra en la figura 3; un paso adicional es la limpieza que se puede llevar a cabo agregando un co-adsorbente a la parte inferior de la columna de extracción o usando una columna externa [28, 29, 33, 34].

A diferencia de la EFS, donde la muestra se retiene en los primeros milímetros del adsorbente, en la DMFS, la muestra está dispersa homogéneamente a lo largo de toda la columna de extracción, y el mecanismo de retención parece una mezcla de partición, adsorción y cromatografía por electrón [29, 33].

La mayor diferencia entre DMFS y EFS radica en la influencia de la propia matriz en la extracción. A diferencia de la EFS, la muestra completa es dispersa desde la parte superior a la parte inferior de la columna en DMFS. Los componentes de la matriz interaccionan con gran parte del absorbente, creando una nueva fase. Dado que la matriz de la muestra se convierte en parte de la fase cromatográfica en la DMFS constantemente los resultados y la recuperación de un analito dado de una matriz variarían de una a otra significativamente [28, 33].

Los principios químicos generales involucrados en la EFS y otras formas de cromatografía también son aplicables en la DMFS. Así, se espera que la composición química y características del soporte sólido y la fase ligada afecten la retención y elución de los analitos. Estas mismas propiedades también se pueden aplicar a los componentes de la muestra dispersa y la fase única que se crea. Se espera que los componentes de la muestra se distribuyan sobre la superficie y en esta fase en función de sus polaridades relativas. Las componentes no polares se dispersarían en la fase orgánica no polar y se verían afectadas por los cambios dinámicos que se producen a medida que avanza este proceso. Se esperaría que las moléculas más pequeñas y polares (agua) se asocien con los silanoles sobre y en la partícula de sílice, así como con los componentes de la matriz capaces de formar enlaces de hidrógeno. Se prevé que las moléculas más grandes y menos polares se distribuyan a través de la superficie [33].

El proceso DMFS está diseñado para efectuar una simplificación de los procesos de extracción comúnmente utilizados para muestras sólidas, y para ayudar en la evolución de tales procesos hacia un enfoque de disminución de disolventes. En la figura 3 se muestra el proceso general de la DMFS.

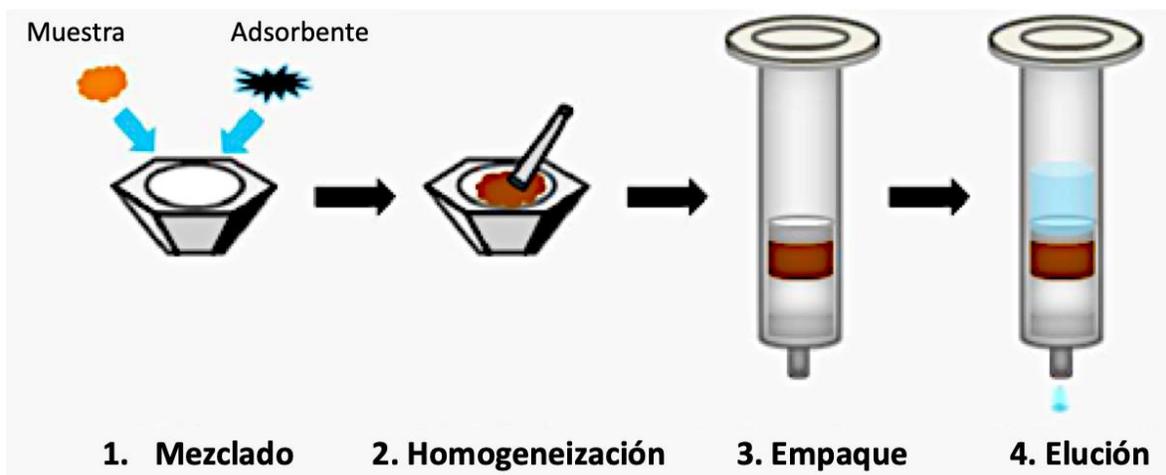


Figura 4. Esquema general de la DMFS. Adaptado de [35].

1.8 Cromatografía de líquidos de alta resolución.

Polo Diez en su libro fundamentos de cromatografía nos dice “el análisis de una muestra involucra la realización de medidas de una propiedad analítica cualitativa, cuantitativa o estructural mediante una determinada técnica instrumental de medida”. Pero las limitaciones de las técnicas instrumentales en sensibilidad y selectividad hacen indispensable, la mayoría del tiempo, el uso de técnicas de separación para el análisis [36].

El término cromatografía tuvo sus orígenes en los trabajos de Tswet, quien utilizó un tubo de vidrio relleno con CaCO_3 o azúcar en forma de polvo fino para realizar la separación de pigmentos presentes en hojas. Eluyendo con éter a través del tubo de vidrio; como resultado se obtuvieron anillos de diferente color, lo que permitió separar los diferentes pigmentos. A mediados de la década de 1960, Horvath, Huber y Kirkland desarrollaron medios para la separación similar de cualquier muestra a través de mejoras en equipos y columnas. Estos y otros esfuerzos llevaron al desarrollo de lo que ahora llamamos HPLC que es el término usado para describir la cromatografía líquida en la que se encuentra la fase móvil líquida bombeado mecánicamente a través de una columna que contiene la fase estacionaria. Un instrumento de HPLC, por lo tanto, consiste en un inyector, una bomba, una columna y un detector. La popularidad actual de HPLC es atribuible a que se lleva a cabo la separación y análisis de casi cualquier muestra que puede ser disuelta. Las diferentes aplicaciones se caracterizan generalmente por su poder excepcional de resolución, velocidad y límites de detección [36-38].

El proceso cromatográfico puede definirse como una técnica de separación por transferencia masiva entre una fase estacionaria y una fase móvil. En estas técnicas cromatográficas, la HPLC es una de las técnicas cromatográficas más utilizadas. En este método la fase estacionaria puede ser un líquido o un sólido y utiliza una fase móvil líquida para separar los componentes de una muestra [38].

La fase estacionaria puede ser de diferente naturaleza, polar, apolar y polaridad intermedia. Clásicamente, se han diferenciado dos modos de trabajo cromatográficos, fase normal e inversa. En fase normal la fase estacionaria es polar y la fase móvil es apolar o menos polar que la estacionaria, siendo lo contrario en fase inversa [36].

El tipo de cromatografía más utilizado es la fase inversa. Generalmente, la fase estacionaria es apolar y la fase móvil es polar. La técnica resulta ser útil para analitos polares neutros y no polares. El mecanismo conlleva una distribución entre una fase móvil polar y una fase estacionaria hidrofóbica, no polar. La retención tiene lugar mediante interacciones de dispersión y va determinada por su hidrofobicidad, ya que al aumentar esta, aumenta la retención debido a que disminuye la solubilidad en agua. Algunos factores que afectan la retención de los compuestos en fase inversa son:

- Cuanto menor sea la solubilidad en agua y mayor el número de átomos de carbono, mayor es la retención.
- Los solutos con cadenas ramificadas se retienen menos que sus isómeros sin ramificar.
- La insaturación disminuye la retención.
- Las moléculas polares neutras presentan menor retención que las apolares [36].

Los soportes sólidos en fase inversa son fundamentalmente de dos tipos: no silíceos y sílice. El soporte más usado es el de sílice porosa, pudiendo ser cualquiera de las siguientes fases químicamente modificadas: C18 (octadecil), C8 (octil), C4 (tetrametil), C2 (dimetil). Mientras que la fase móvil se describe cuantitativamente por su naturaleza polar, en fase inversa el índice de polaridad P' (Tabla 4); nos señala valores desde el 10.2 para el agua, que es fuertemente polar y por tanto, el disolvente más débil en fase inversa, hasta valores de 0.1 para el hexano, un disolvente muy apolar, por tanto el disolvente más fuerte [36].

Tabla 4. Fuerza de elución, índice de polaridad [36].

Disolvente	P'
n-Hexano	0.1
Tetracloruro de carbono	1.5
Tolueno	2.4
Benceno	2.7
Éter etílico	2.8
i-propanol	3.9
n-propanol	4.0
Cloroformo	4.1
Etanol	4.3
Acetato de etilo	4.4
Acetona	5.1
Metanol	5.1
Acetonitrilo	5.8
Nitrometano	6.0
Agua	10.2

Se dispone de diferentes métodos para arrastrar los analitos a través de la columna mediante la fase móvil con el propósito de desarrollar el cromatograma. La muestra se inyecta en la fase móvil y se arrastra a través de la fase estacionaria, con muy poca afinidad de la fase móvil por la fase estacionaria en comparación con los analitos. Cuando estos analitos poseen diferente afinidad por la fase estacionaria, sus velocidades de desplazamiento a través de la columna serán también diferentes, quedando los analitos separados en forma de picos. Los métodos son: - A poder de elución constante. – A poder creciente. El poder de elución representa la capacidad de la fase móvil para arrastrar los analitos perturbando la interacción con la fase estacionaria [36].

Cuando el poder de elución de la de la fase móvil se mantiene constante a través del tiempo durante la elución, el modo de elución se denomina isocrático. Cuando la polaridad de los analitos de la muestra es muy diferente, y por tanto su afinidad con la fase estacionaria, se aumenta el poder de elución con el tiempo, disminuyendo la interacción de los analitos con mayor afinidad por la fase estacionaria, aumentando su velocidad de elución y disminuyendo su retención, a este proceso se le denomina modo de elución de gradiente [36].

Al terminar la separación de los analitos en columna, se requiere transformar la información medible que nos proporcionan mediante un detector, normalmente es una señal eléctrica

fácilmente visible y amplificable. “Como resultado se obtiene una representación gráfica de la respuesta del detector en función del tiempo, idealmente representado por picos gaussianos, correspondiendo cada pico a un componente de la muestra original” explica Polo Díez [36].

1.9 Metodologías analíticas recientes destinadas al monitoreo de productos de cuidado personal en cultivos de microorganismos.

En la tabla 5 se resumen algunos de los trabajos publicados sobre el análisis de la remoción de PCPs utilizando diferentes métodos de extracción y análisis. En estos trabajos se utiliza principalmente la EFS como método de preparación de muestra.

En general dichos estudios se llevaron a cabo con muestras de aguas residuales, aunque también hay estudios con muestras de agua de mar. La preparación de la muestra para un análisis cromatográfico es un paso de suma importancia ya que en la mayoría de los experimentos es la etapa que consume mayor tiempo y tiene gran impacto en el costo, así como en la calidad de los resultados [39].

En la mayoría de los estudios se utilizó como fase dispersante, fase polimérica, en cantidades de 200 mg. La elución de los analitos se realiza con volúmenes que varían de los 6 a los 10 mL de disolvente. En cuanto a la limpieza del extracto obtenido, fue innecesaria por las ventajas que representa el uso de la EFS. Los métodos de remoción se basan principalmente en microorganismos pues han demostrado ser más útiles en la remoción comparándolas con las técnicas convencionales. Los trabajos se enfocan en la remoción de forma específica de compuestos a veces simultáneamente, con remoción que varían desde 4 a 99%.

Cabe resaltar que en todas las metodologías reportas solo se analizó el sobrenadante de los cuerpos de agua expuestos a la acción de los microorganismos. Sin embargo, al monitorear la biomasa recolectada se podría realizar el balance de las cantidades bioadsorbidas por los organismos. Si el balance entre la cantidad remanente en el sobrenadante y en la biomasa es menor al 100 %, nos indicaría la pérdida del contaminante por otro proceso como fotodegradación, adsorción al contenedor e inclusive a la formación de metabolitos.

Tabla 5. Métodos recientes de remoción de parabenos y filtros UV.

Autor (Año)	Muestra	Analitos	Método de extracción	Método De Análisis	Remoción %	Método de remoción.
Ahmed M.V. et al 2017	Agua residual 25mL	Oxibenzona Metilparabeno	EFS con fase polimérica, elución con hexano/ acetato de etilo, evaporación y reconstitución en acetato de etilo 10mL	CG-320MS	99 75	Microalgas
Campos, Diana, et al. 2017	Agua dulce 10mL	Oxybenzona 3-(4-metilbenciliden) alcanfor (4-MBC)	Extracción por ultrasonido	HPLC-MS	41-78	caddisfly <i>Sericostoma vittatum</i> '
Cheng, Jun, et al 2018	Agua residual 1.5mL	17 α -ethinyloestradiol	EFS	HPLC-MS	54-88	Microalgas
Comeche, Amparo et al. 2006	Agua de mar 6mL	Metilparabeno	EFS con fase polimérica Elución con metanol, evaporación y reconstitución en MeOH/H ₂ O 200mg/ 6mL	UHPLC MS/MS	76	Biodegradación natural/ hidrolisis
Matamoros, Victor et al, 2015	Agua residual 25mL	Oxybenzona Metilparabeno Triclosan Bisfenol A	EFS fase polimérica hexano/acetato de etilo, estándar interno trifenilamina reconstituido con acetato 200mg 10mL	CG-MS	75-99 12-59 49-93 66-85	Microalgas

(CG-MS): Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas de triple cuádruplo. (EFS) Extracción en fase sólida. (HPLC-MS) cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada con espectrometría de masas en tándem. (UHPLC-MS/MS) cromatografía líquida de ultra alto rendimiento acoplada con espectrometría de masas en tándem de triple cuádrupolo. (LC-MS / MS): cromatografía líquida de alta resolución en espectrometría de masas en tándem. (N.E.): no especificado.

2. Metodología

2.1 Materiales, reactivos

- Metanol grado cromatográfico marca J. T. Baker.
- Acetonitrilo grado cromatográfico marca J. T. Baker.
- Agua grado cromatográfico.
- Estándares de metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, benzofenona-3, todos marca Sigma Aldrich.
- Adsorbente Chromabond C18-PAH marca Macherey-Nagel.
- Mortero y pistilo de ágata.
- Cartuchos de polipropileno de 6 mL para EFS y frits de teflón marca Macherey–Nagel.
- Matraz kitasato 250 ml con tapón de caucho #8.
- Aguja de acero.
- Ultrasonido marca Brason modelo 2510E-MT.
- Micropipeta de volumen variable de 100-1000µL marca Transferpette.
- Micropipeta de volumen variable de 20-200µL Transferpette.
- Balanza electrónica de precisión modelo HRB103.
- Soporte universal con pinzas y nuez.
- Parrilla de agitación.
- Vasos de precipitado 30 mL, 50 mL, 100 mL y 2 L.
- Matraz aforado de 50 mL.
- Espátula.
- Centrifuga.

2.2 Instrumentación y condiciones cromatográficas

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

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

Se utilizó una columna analítica de la marca Agilent Zorbax Phenyl, con un tamaño de partícula de 3.5 μm , de dimensiones 4.6 x 150 mm.

La elución se realizó con el gradiente lineal mostrado en la tabla 6.

Tabla 6. Gradiente para la separación de parabenos y oxibenzona.

Tiempo (Minutos)	% Metanol	% Agua
0	55	45
6	65	35
10	100	0
12	100	0

El tiempo de equilibrio fue de 6 min.

Los parabenos se monitorearon a una longitud de onda de 254 nm, mientras que la oxibenzona se midió a 290 nm.

2.3 Preparación de los cultivos y mantenimiento.

Se utilizaron cultivos de la microalga *Scenedesmus acutus* obtenida del cepario de la Universidad de Texas (UTEX) con la clave UTEX B 72[40].

El microorganismo se mantuvo en crecimiento en un medio de cultivo ajustado a pH = 6.5 y preparado con las sales mostradas en la tabla 7.

Tabla 7. Cantidades de reactivos para preparar 1 L de medio de cultivo para las microalgas

Sustrato	Cantidad agregada	Sustrato	Cantidad agregada
NaHCO ₃	250 mg	CaCl ₂	20 mg
MgSO ₄	20 mg	K ₂ HPO ₄ · 3 H ₂ O	346 mg
KCl	20 mg	(NH ₄) ₂ SO ₄	382 mg

Cada cultivo se agitó con ayuda de una bomba de aire, a temperatura ambiente y manteniéndolos con periodos de luz/oscuridad de 16/8 h hasta conseguir una absorbancia con valor de 1.00 medida a 683 nm, lo cual se lograba en un tiempo aproximado de 10 días. En la figura 5 se presenta una fotografía de los cultivos utilizados en el desarrollo de esta tesis.

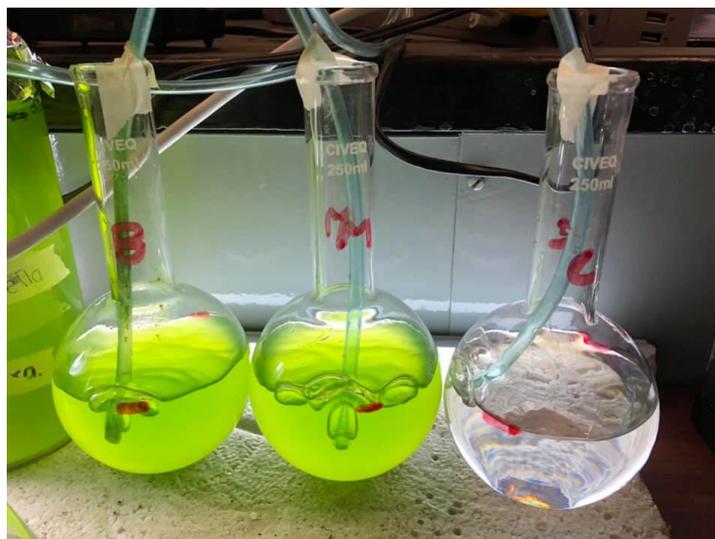


Figura 5. Cultivos de la microalga *Scenedesmus acutus*, Imagen propia.

Una vez que los cultivos alcanzaron la absorbancia requerida, se centrifugaron a una velocidad de 2500 rpm durante 10 minutos. Se separó el sobrenadante para realizar los ensayos por EFS y la biomasa se dejó secar a temperatura ambiente para realizar los ensayos por DMFS.

2.3 Preparación de las disoluciones estándar.

Se prepararon soluciones stock individuales de cada uno de los analitos metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno y oxibenzona cada uno en metanol grado cromatográfico a una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A partir de estas disoluciones se preparó una mezcla de los cinco analitos a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las disoluciones se mantuvieron a 4°C hasta su uso.

2.4 Desempeño del sistema cromatográfico.

2.4.1 Linealidad.

Se evaluó la linealidad del sistema realizando la inyección por triplicado de disoluciones estándar de la mezcla de analitos a las concentraciones de 2, 5, 10, 20 y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se obtuvo la ecuación de la recta de mejor ajuste por el método de mínimos cuadrados.

2.4.2 Repetibilidad.

Se realizaron inyecciones por triplicado a dos diferentes concentraciones de los contaminantes, 5 y 20 $\mu\text{g/mL}$ en un mismo día, así como en tres días distintos, obteniendo el valor promedio del área para cada analito y obteniendo la desviación estándar relativa, por sus siglas en inglés (RDS%)

2.4.3 Límites de cuantificación y detección del sistema.

Se realizaron inyecciones por triplicado de una disolución estándar de concentración 5 $\mu\text{g/mL}$ obteniendo los valores promedio de la señal de cada analito (S) y el ruido (N) a sus respectivas longitudes de onda. Los límites de detección se obtuvieron como la concentración que proporciona un valor de tres veces la relación señal ruido ($3*S/N$) y los límites de cuantificación como la concentración que produce un valor de diez veces la relación señal ruido ($10*S/N$).

2.5 Análisis del sobrenadante de cultivos de microalgas mediante EFS-CL-UV.

Se utilizaron muestras de 50 mL de sobrenadante de cultivo de microalgas previamente centrifugado como se explica en la sección 2.3 de esa tesis y cartuchos de EFS que contenían 250 mg del adsorbente C18. Los cartuchos fueron acondicionados con 3 mL de metanol y 3 mL de agua desionizada, haciéndolos pasar a un flujo aproximado de 1 mL por minuto por medio de la aplicación de vacío. Después, la muestra de sobrenadante se hizo pasar por los cartuchos y posteriormente se dejaron al vacío durante 5 min. Finalmente, los analitos retenidos en el adsorbente fueron eluidos con 2 mL de acetonitrilo. Los extractos fueron analizados con el sistema cromatográfico.

2.6 Validación del método por EFS-CL-UV.

2.6.1 Linealidad.

Se realizaron análisis, por triplicado, de muestras de sobrenadante de cultivo de microalgas fortificados a las concentraciones de 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 10.0 y 20.0 $\mu\text{g/mL}$. Se obtuvo la cantidad recuperada de cada analito y se graficó contra la cantidad agregada para obtener el coeficiente de determinación (r^2) y los intervalos de confianza de la ordenada y la pendiente.

2.6.2 Exactitud.

La exactitud se evaluó mediante el recobro de las muestras fortificadas para la prueba de linealidad. Se utilizó la pendiente de la curva obtenida y se multiplicó por 100 para obtener el valor del recobro promedio para cada analito.

2.6.3 Repetibilidad.

Se realizaron análisis por triplicado a dos diferentes concentraciones de los contaminantes, 1.0 y 5.0 $\mu\text{g/mL}$ en un mismo día y así como en tres días distintos, obteniendo el valor promedio de la cantidad recuperada y la desviación estándar relativa (RDS%).

2.6.4 Límites de detección y cuantificación del método.

Se realizaron inyecciones por triplicado de extractos obtenidos a partir de muestra fortificadas a 0.5 $\mu\text{g/mL}$, obteniendo los valores promedio de la señal de cada analito (S) y el ruido (N) a sus respectivas longitudes de onda. Los límites de detección se obtuvieron como la concentración en el cultivo que proporciona un valor de tres veces la relación señal ruido ($3*S/N$) y los límites de cuantificación como la concentración que produce un valor de diez veces la relación señal ruido ($10*S/N$).

2.7 Análisis de la biomasa recuperada de cultivos de microalgas mediante DMFS.

Se utilizaron muestras de 20 mg de biomasa seca y 100 mg de adsorbente C18 homogeneizadas en un mortero de ágata con ayuda del pistilo. La mezcla se empacó en cartuchos de EFS y los analitos se recuperaron haciendo pasar 1 mL de una mezcla de MeOH:Agua 80:20 v/v. Los extractos fueron analizados con el sistema cromatográfico.

2.8 Validación del método por DMFS-CL-UV.

2.8.1 Linealidad.

Se realizaron extracciones de diferentes muestras de biomasa seca fortificadas con los analitos a las concentraciones de 200, 400, 600, 1000, 1500 y 2000 ng/mg. Se obtuvo la cantidad recuperada de cada analito y se graficó contra la cantidad agregada para obtener el coeficiente de determinación (r^2) y los intervalos de confianza de la ordenada y la pendiente.

2.8.2 Exactitud.

La exactitud se evaluó mediante el recobro de las muestras fortificadas para la prueba de linealidad. Se utilizó la pendiente de la curva obtenida y se multiplicó por 100 para obtener el valor del recobro promedio para cada analito.

2.8.3 Repetibilidad.

Se realizaron análisis por triplicado a una concentración de los contaminantes, 800 ng/mg en un mismo día y en tres días distintos, obteniendo el valor promedio de la cantidad recuperada y la desviación estándar relativa (RDS%).

2.8.4 Límites de detección y cuantificación del método.

Se realizaron inyecciones por triplicado de extractos obtenidos a partir de muestra fortificadas a 200 ng/mg, obteniendo los valores promedio de la señal de cada analito (S) y el ruido (N) a sus respectivas longitudes de onda. Los límites de detección se obtuvieron como la concentración en el cultivo que proporciona un valor de tres veces la relación señal ruido ($3*S/N$) y los límites de cuantificación como la concentración que produce un valor de diez veces la relación señal ruido ($10*S/N$).

En la figura 6 se presenta un diagrama con las condiciones de las metodologías validadas.

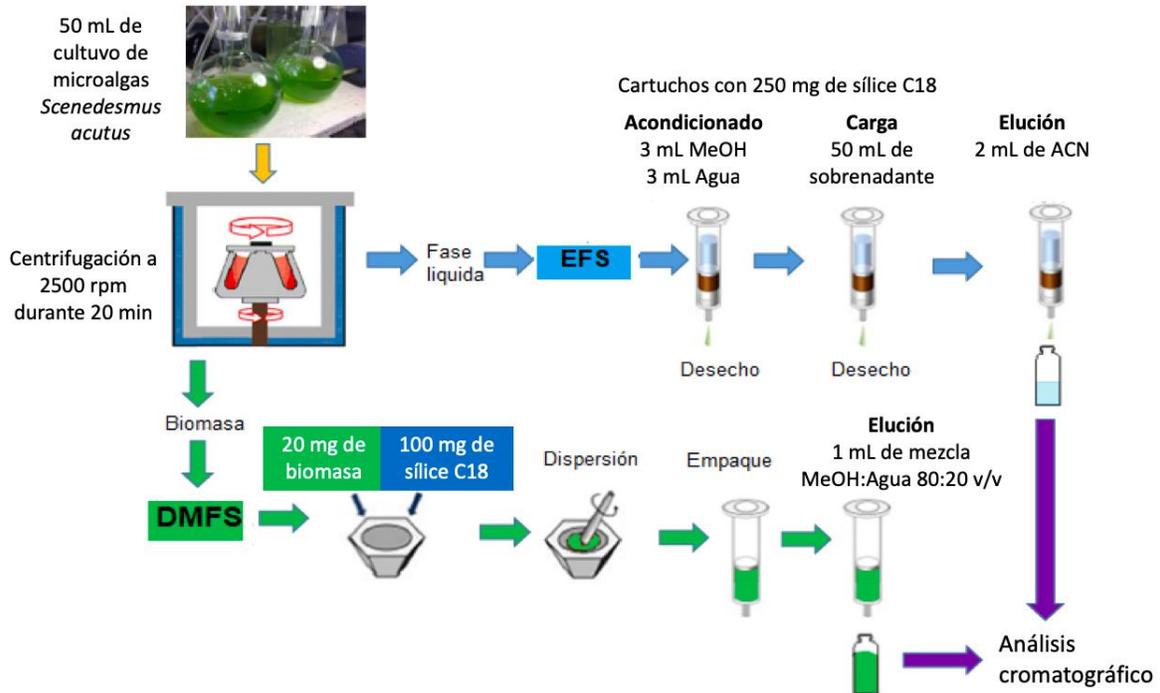


Figura 6. Metodología del análisis de las muestras de cultivo de microalgas mediante EFS y DMFS.

2.9 Aplicación de los métodos desarrollados en un experimento de exposición de cultivos de *Scenedesmus acutus* a una mezcla de los contaminantes estudiados.

Se utilizaron muestras de 150 mL de cultivos expuestos a una concentración de 0.75 $\mu\text{g/mL}$. Se monitoreó la cantidad de analitos remanente en la biomasa y sobrenadante tomando alícuotas de 50 mL de cultivo a los tiempos de exposición de 4, 16 y 24 h. Cada ensayo se realizó por triplicado

Como control se utilizó el medio de cultivo sin microalgas fortificado a la misma concentración de parabenos y oxibenzona, con la finalidad de evaluar la pérdida de los analitos por medios abióticos, por ejemplo, por la fotodegradación, pH y adsorción al recipiente. Como cultivo blanco se utilizaron muestras de cultivo de microalgas que no fueron expuestas a los contaminantes. En la figura 6 se muestra un esquema general de las muestras utilizadas.

Ensayos de exposición de cultivos de microalgas a una concentración de $0.75 \mu\text{g mL}^{-1}$

Tiempos de exposición:
4, 16, y 24 h

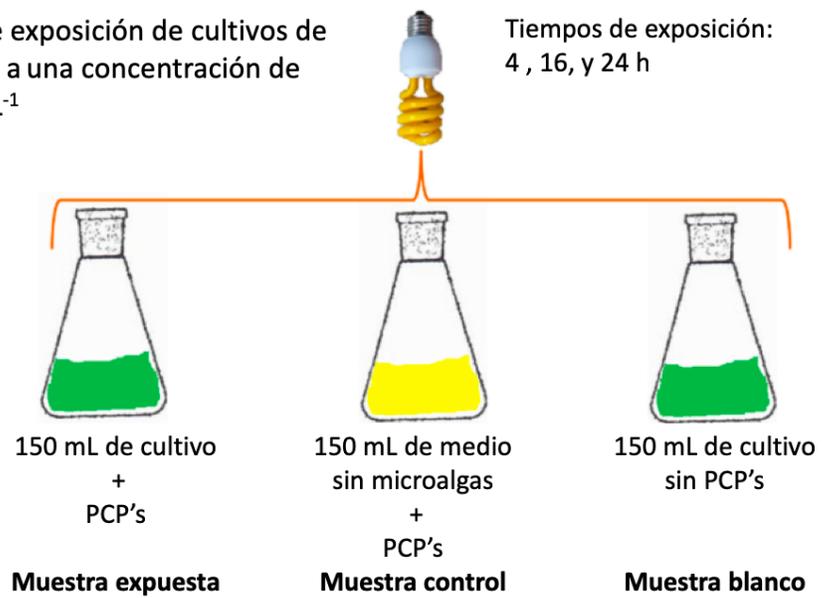


Figura 7. Metodología del experimento de exposición.

3. Resultados y análisis

3.1 Separación cromatográfica.

En la figura 7 se muestra un cromatograma obtenido con las condiciones cromatográficas descritas en la sección 2.2. Se obtuvo una buena resolución para todos los analitos y mediante el uso del gradiente se evitó que la oxibenzona se retuviera excesivamente y su señal perdiera eficiencia. Con las condiciones óptimas de extracción no se obtuvieron interferentes tanto en los extractos de biomasa como de sobrenadante del medio de cultivo.

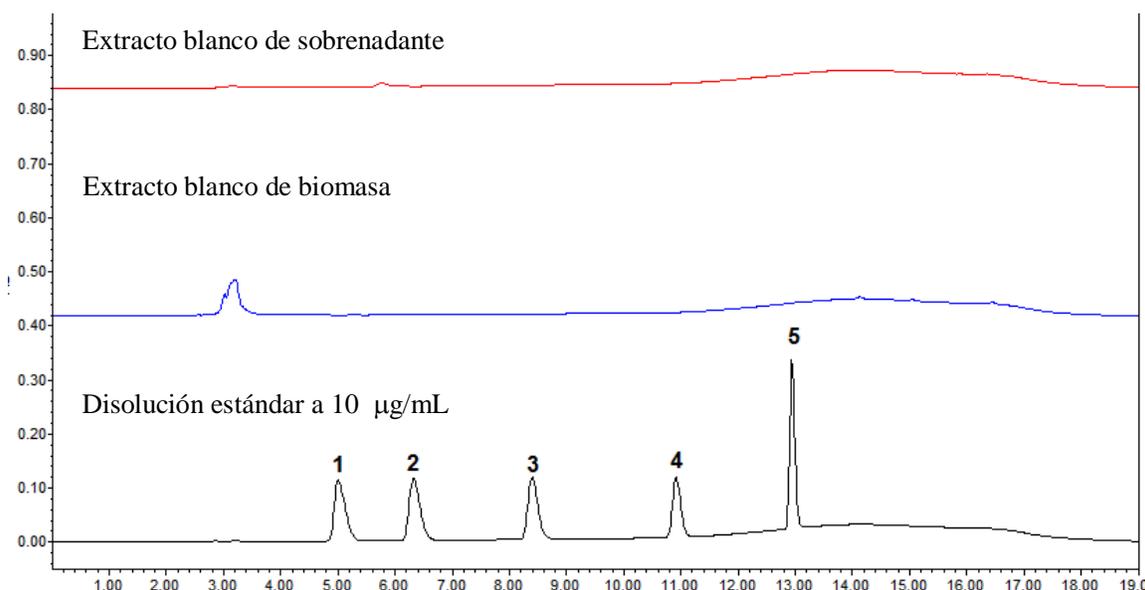


Figura 8. Cromatograma obtenido para una disolución estándar a 10 µg/mL monitoreada a 254 nm. 1= metilparabeno, 2 = etilparabeno, 3= propilparabeno, 4 = butilparabeno, 5= Oxibenzona

3.2 Desempeño del sistema cromatográfico.

En la tabla 8 se presentan los resultados del desempeño del sistema cromatográfico. La linealidad obtenida fue adecuada con coeficientes de determinación r^2 mayor o igual a 0.9908. La repetibilidad fue adecuada una RDS % < 3.0. Trabajando con las longitudes de onda óptimas para los parabenos y oxibenzona, los límites de detección estuvieron entre 1.0 y 1.3 µg/mL.

Tabla 8. Desempeño del sistema cromatográfico. ^{a)} En el intervalo de 2 a 30 µg/mL.

L.D. = Límites de detección.

L.C. = Límites de cuantificación.

	r ² ^{a)}	Ordenada		Pendiente		RDS%	L.D.	L.C.
						n=3	(µg/mL)	(µg/mL)
Metilparabeno	0.9905	49659		35719		1.3	1.2	3.5
		inferior 95%	superior 95%	inferior 95%	superior 95%			
		-41387	140705	31044	40395			
Etilparabeno	0.9973	49561		35745		2.7	1.3	4
		inferior 95%	superior 95%	inferior 95%	superior 95%			
		-44653	143776	30907	40584			
Propilparabeno	0.9908	39427		38856		3.0	1.2	3.5
		inferior 95%	superior 95%	inferior 95%	superior 95%			
		-24344	103198	35581	42131			
Butilparabeno	0.9992	-4573		39656		1.5	1.3	4
		inferior 95%	superior 95%	inferior 95%	superior 95%			
		-94307	85161	35048	44264			
Oxibenzona	0.9948	-39240		48970		2.1	1.0	3
		inferior 95%	superior 95%	inferior 95%	superior 95%			
		-135267	56788	44039	53902			

3.3 Optimización del método de EFS-CL-UV para la extracción de los contaminantes en muestras de sobrenadante de cultivo.

Se optimizó el volumen de acetonitrilo necesario para recuperar a los analitos con un buen rendimiento y evitando una dilución excesiva en el extracto. En la figura 9 se presentan los resultados.

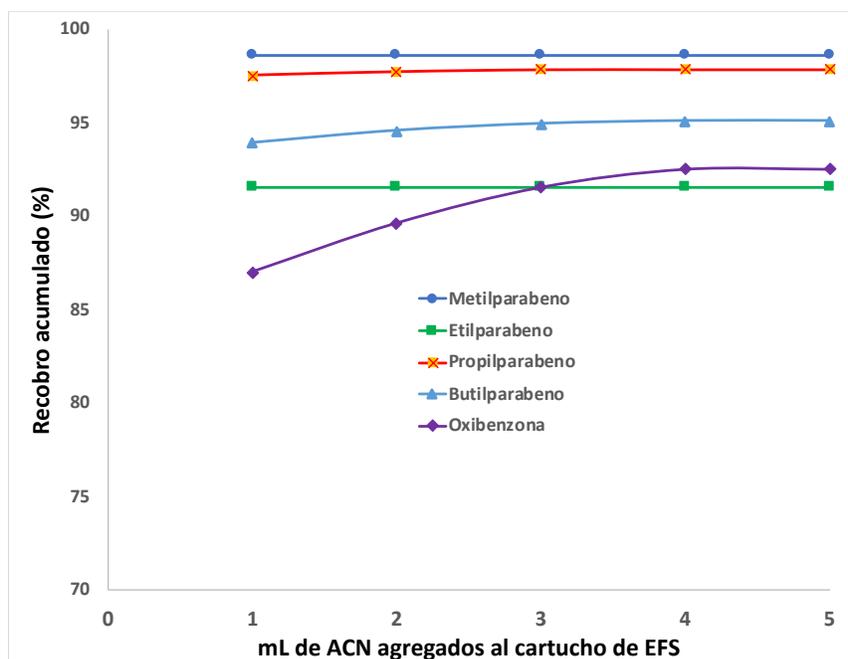


Figura 9. Optimización del volumen de acetonitrilo necesario para recuperar los analitos del cartucho de EFS.

En la figura 9 se observa que solo es necesario agregar 1 mL de ACN al cartucho para recuperar a los cuatro parabenos. Como la oxibenzona es un compuesto con menor polaridad, es necesario aplicar un volumen mayor de ACN para recuperar la mayor cantidad posible, lo cual se logra hasta los 4 mL. Sin embargo, al aplicar el primer mililitro de ACN se recuperó un 86.7 % de oxibenzona ($RDS\% = 4.3$, $n = 3$) y con el segundo mililitro se recuperaron 2.3 % más ($RDS\% = 2.1$, $n = 3$), lo cual representa un 89 % acumulado ($RDS\% = 1.1$, $n = 3$). Al adicionar el tercer y cuarto mililitros solo se recuperó el 1 % en cada uno. De esta forma, se decidió agregar solo 2 mL de acetonitrilo al cartucho para evitar una excesiva dilución de los analitos en el extracto obtenido y disminuir la variabilidad de los análisis ya que la $RDS\%$ fue mejor en comparación con el ensayo de 1 mL de ACN.

3.4 Validación del método de EFS-CL-UV para la determinación de los contaminantes en sobrenadante de cultivo de microalgas.

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos para la validación del método por EFS. Se graficó la cantidad de analito recuperada en función de la cantidad de analito adicionada. La exactitud del método fue evaluada a través del recobro (R%) obtenido al multiplicar pendiente de la curva por cien. De esta forma, el recobro para los analitos estuvo entre 86.44 y 97.65 %. Estos recobros resultaron reproducibles en el intervalo de concentraciones monitoreado lo cual se refleja en el valor del coeficiente de determinación (r^2) de la curva. Este último reflejó una buena linealidad para todos los analitos con coeficientes mayores o iguales a 0.9848 en el intervalo de las partes por billón (ng/mL) el cual resulta adecuado para monitorear concentraciones a las que los contaminantes emergentes se encuentran en diferentes cuerpos de agua monitoreados [15, 21, 41-43].

La precisión se evaluó en función de la repetibilidad y se obtuvieron desviaciones estándar relativas menores o iguales a 7.3 %. Se observó una tendencia en el aumento de la RDS% con el aumento de la polaridad de los analitos lo cual concuerda con la teoría de la técnica de EFS ya que, al aumentar la polaridad hay mayor probabilidad de que los analitos se fuguen del cartucho empacado y se tenga una mayor variación en la cantidad recuperada.

Finalmente, los límites de cuantificación estuvieron en el orden de las partes por billón (50 a 60 ng/mL) los cuales fueron adecuados para monitorear a los analitos en los ensayos de exposición.

Tabla 9. Validación del método por EFS-CL-UV. ^{a)} En el intervalo de 200 a 2000 ng/mL.

^{b)} Evaluada a una concentración de 400 ng/mL

L.D. = Límites de detección.

L.C. = Límites de cuantificación.

	r ² ^{a)}	Ordenada		Pendiente		RDS%	L.D.	L.C.
						n=3 ^{b)}	(ng/mL)	(ng/mL)
Metilparabeno	0.9848	0.0324		0.9181		7.3	20	60
		inferior 95%	superior 95%	inferior 95%	superior 95%			
		-2.6057	2.6705	0.7083	1.1280			
Etilparabeno	0.9992	-0.5198		0.9765		6.3	18	55
		inferior 95%	superior 95%	inferior 95%	superior 95%			
		-1.1205	0.0810	0.9287	1.0243			
Propilparabeno	0.9898	0.4247		0.8770		5.1	20	60
		inferior 95%	superior 95%	inferior 95%	superior 95%			
		-1.6362	2.4856	0.7131	1.0410			
Butilparabeno	0.9991	0.0802		0.8644		2.7	18	55
		inferior 95%	superior 95%	inferior 95%	superior 95%			
		-0.5255	0.6859	0.8162	0.9125			
Oxibenzona	0.9982	-0.2350		0.9105		2.8	15	50
		inferior 95%	superior 95%	inferior 95%	superior 95%			
		-1.3661	0.8960	0.8401	0.9809			

3.5 Optimización del método por DMFS para la extracción de los contaminantes en biomasa de microalgas.

En la literatura Barker (2017) recomienda una proporción de adsorbente:muestra de 4:1. En este trabajo de tesis se utilizó una proporción 5:1, ya que se ha probado en trabajos dentro de laboratorio es la proporción que mejores resultados ha dado, y se optimizó el disolvente adecuado para la elución de los analitos evitando la co-elución de pigmentos e interferentes que pudieran dificultar la separación cromatográfica. Se probaron por separado dos diferentes disolventes MeOH al 100% y una mezcla de MeOH:Agua 80:20 v/v. Se decidió utilizar la mezcla debido a que el extracto obtenido presentó una coloración menos intensa y los recobros obtenidos eran similares al usar MeOH 100%. En la figura 10 se muestra un ejemplo de los extractos obtenidos con estos disolventes.



Figura 10. Comparación de los extractos obtenidos por DMFS con Metanol 100% (frasco izquierdo) y MeOH:Agua 80:20 v/v (frasco derecho)

3.6 Validación del método por DMFS-CL-UV para el análisis de los contaminantes en biomasa de microalgas.

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos para la validación del método por DMFS. De igual forma que con el método de EFS, se graficó la cantidad recuperada contra la cantidad agregada. El recobro del método fue adecuado para todos los analitos con valores entre 80.65 y 93.19 %, los cuáles demostraron ser constantes en el intervalo de concentraciones monitoreado. La linealidad fue adecuada con valores del coeficiente de determinación r^2 mayores o igual a 0.9889 para todos los analitos.

Tabla 10. Validación del método por DMFS-CL-UV. ^{a)} En el intervalo de 200 a 2000 ng/mg.

^{b)} Evaluada a una concentración de 800 ng/mL

L.D. = Límites de detección. L.C. = Límites de cuantificación.

	r ² ^{a)}	Ordenada		Pendiente		RDS%	L.D.	L.C.
						n=3 ^{b)}	(ng/mg)	(ng/mg)
Metilparabeno	0.9923	-0.0123		0.9304		5.4	70	210
		inferior 95%	superior 95%	inferior 95%	superior 95%			
		-1.9221	1.8975	0.7801	1.0809			
Etilparabeno	0.9900	-0.9065		0.9319		3.5	68	206
		inferior 95%	superior 95%	inferior 95%	superior 95%			
		-3.0948	1.2819	0.7595	1.1042			
Propilparabeno	0.9940	-0.1002		0.9184		3.3	69	208
		inferior 95%	superior 95%	inferior 95%	superior 95%			
		-1.7726	1.5721	0.7867	1.0501			
Butilparabeno	0.9889	-0.3901		0.9295		3.0	70	210
		inferior 95%	superior 95%	inferior 95%	superior 95%			
		-2.6859	1.9056	0.7487	1.1102			
Oxibenzona	0.9977	0.3505		0.8065		1.8	40	120
		inferior 95%	superior 95%	inferior 95%	superior 95%			
		-0.5564	1.2575	0.7351	0.8780			

La repetibilidad del método fue buena con una RDS. % menores o iguales a 5.4 y los límites de cuantificación estuvieron en el orden de ppm (120 a 210 ng/mg) los cuales resultaron adecuados para el monitoreo de los analitos en los cultivos expuestos, ya que se logra detectar y cuantificar concentraciones bajas de estos contaminantes.

3.7 Aplicación de los métodos desarrollados en un ensayo de exposición a los contaminantes emergentes.

Se utilizaron muestras de 150 mL de cultivos expuestos a una concentración de 0.75 $\mu\text{g/mL}$. Se monitoreó la cantidad de analitos remanente en la biomasa y sobrenadante a las 4, 16 y 24 h. En la figura 11 se presenta un ejemplo de los cromatogramas obtenidos al analizar las muestras de sobrenadante de cultivos expuestos.

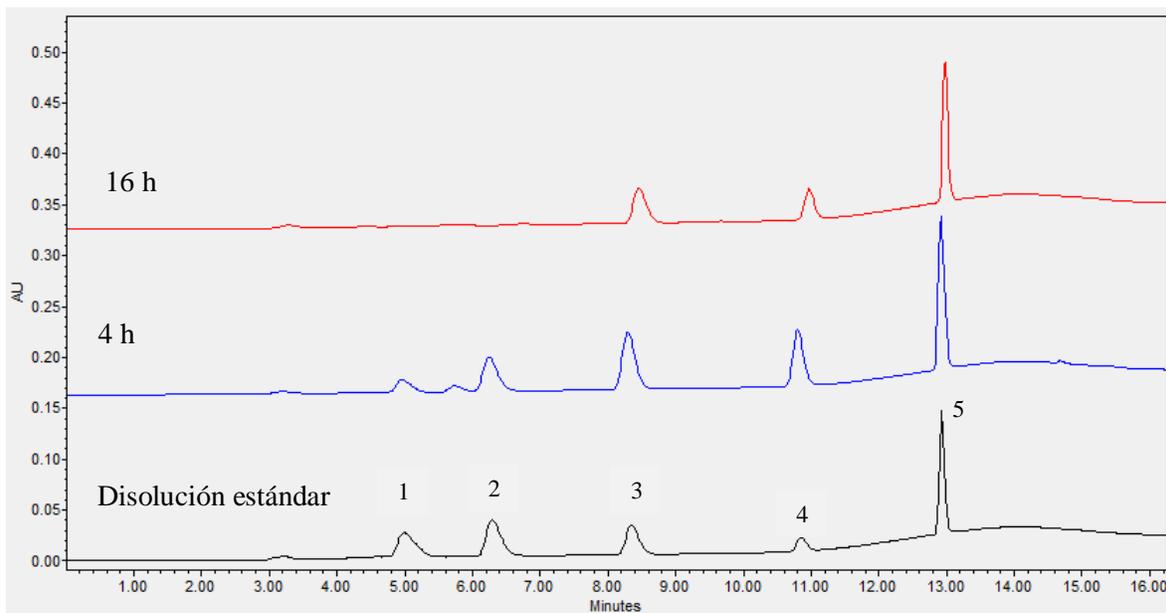


Figura 11. Cromatogramas obtenidos en el análisis de muestras de sobrenadante de cultivos de microalgas expuestas a una concentración de contaminantes de 0.75 $\mu\text{g/mL}$ 1 = metilparabeno, 2 = etilparabeno, 3 = propilparabeno, 4 = butilparabeno y 5 = oxibenzona.

En la figura 12 se presentan ejemplos de los cromatogramas obtenidos al analizar las muestras de biomasa recuperadas a los diferentes tiempos de exposición monitoreados.

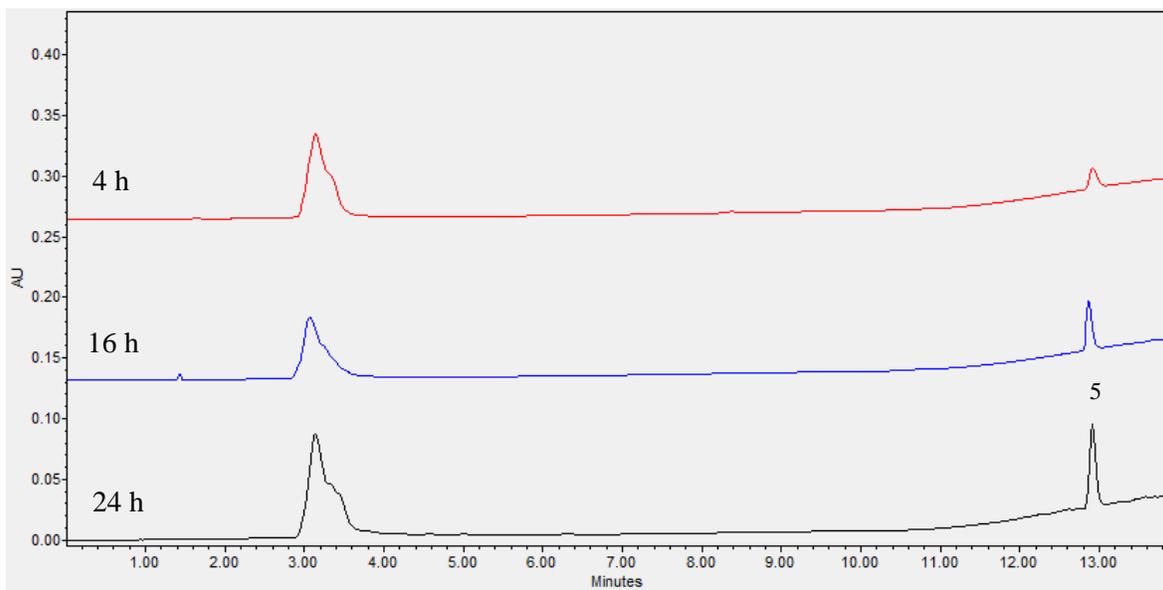


Figura 12. Cromatogramas obtenidos en el análisis de muestras de biomasa de microalgas expuestas a una concentración de contaminantes de $0.75 \mu\text{g/mL}$. 5 = oxibenzona.

En las figuras 13 A – C se muestran las cantidades promedio de los contaminantes recuperados en cada uno de los tiempos de exposición.

En la figura 13 se aprecia que la microalga *Scenedesmus acutus* no acumula a ninguno de los parabenos en su biomasa, pero sí es capaz de acumular a la oxibenzona. Lo anterior puede explicarse por las diferencias de polaridad entre los parabenos y el filtro UV, este último tiene una menor solubilidad en agua y es más afín a los ambientes lipofílicos como las células de las microalgas. Después de 24 h de exposición, el 30 % de oxibenzona se encontró en la biomasa.

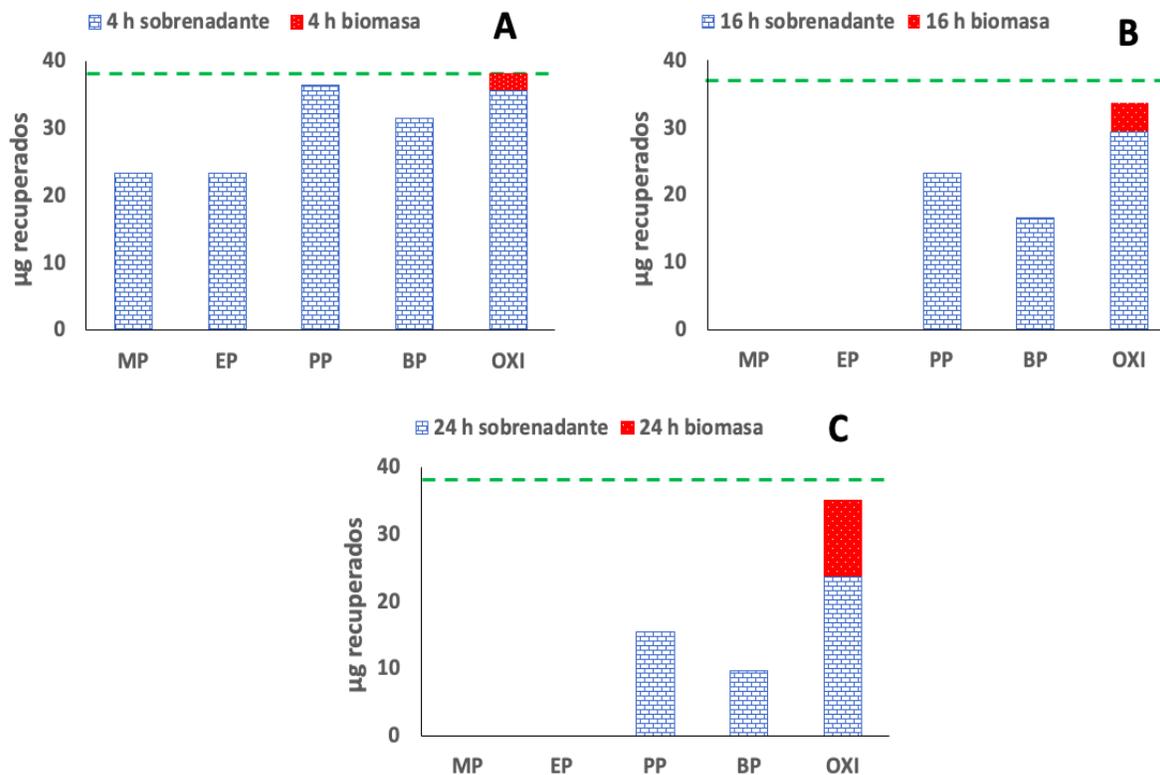


Figura 13. Cantidades recuperadas de los contaminantes en la biomasa y sobrenadante de cultivos de microalgas expuestos. MP = Metilparabeno, EP = Etilparabeno, PP = Propilparabeno, BP = Butilparabeno y OXI = Oxibenzona. La línea punteada representa la cantidad inicial de cada uno de los contaminantes que fue adicionada al medio.

Con el método desarrollado se determinó que la microalga *S. acutus* fue capaz de remover el 40 % de los analitos metilparabeno y etilparabeno en tan solo 4 h de exposición, y para las 16 h, disminuyó los niveles de estos mismos contaminantes por debajo de los límites de detección del método. Después de 24 h de exposición, la microalga removió a los contaminantes propilparabeno y butilparabeno en un 60 y 75 %, respectivamente. En lo que respecta a la oxibenzona, la microalga permitió que el 37 % de oxibenzona fuera removido del sobrenadante después de 24 h de exposición. En la figura 14 se resumen los porcentajes de remoción de los contaminantes.

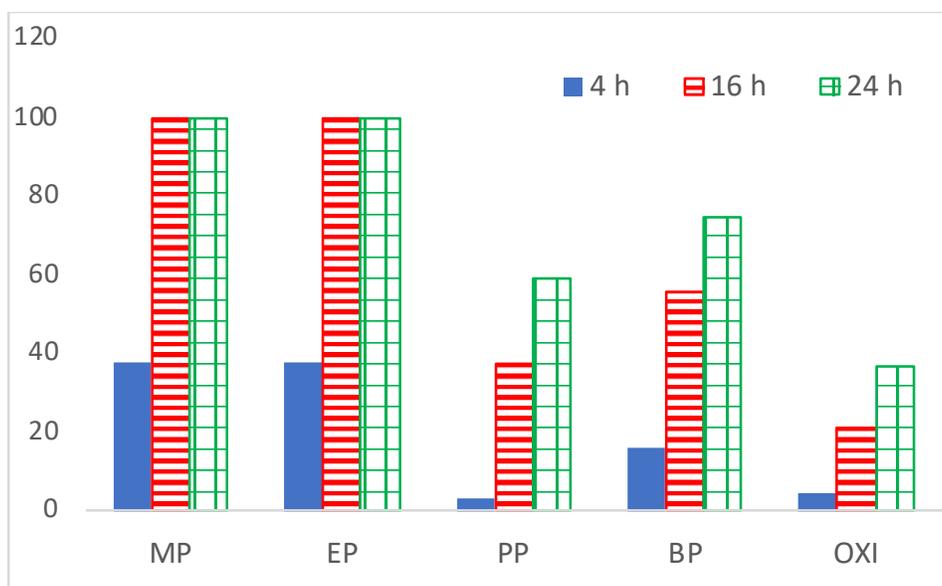


Figura 14. Porcentajes de remoción de los contaminantes emergentes por acción de las microalgas.

Los métodos validados permiten realizar un balance de masa para determinar el destino de los contaminantes en el cultivo expuesto. Estos resultados se presentan en la tabla 11. Para todos los parabenos, al desaparecer del cultivo y no acumularse en la biomasa, se puede concluir que el método de remoción es mediante el metabolismo. Para la oxibenzona, se puede determinar que la remoción ocurre principalmente por la bioadsorción/bioacumulación del contaminante en las células, sin embargo, cantidad total recuperada muestra que un 7 % de la cantidad original fue metabolizado. En los ensayos realizados no se detectó la formación de compuestos relacionados a este proceso, así que se necesitarán realizar estudios más profundos para determinar una posible ruta del proceso de degradación por acción de *S. acutus*.

Tabla 11. Resultados del analito oxibenzona, a los diferentes tiempos de exposición,

Tiempo de exposición/ % de recuperación	Sobrenadante	Biomasa	Total
4	95	7	102
16	79	12	91
24	63	30	93

Conclusiones.

Se desarrolló y validó una metodología analítica que permite la determinación y extracción de parabenos y oxibenzona, en la biomasa por DMFS-CL-UV y en el sobrenadante por EFS-CL-UV, en cultivos de *Scenedesmus acutus* expuestos a los contaminantes.

Los métodos desarrollados presentaron buena linealidad, exactitud, precisión, selectividad, repetibilidad, y límites de detección y cuantificación fueron adecuados para el monitoreo de los analitos en ensayos de exposición.

La microalga *S. acutus* realizó la eliminación total del metilparabeno y etilparabeno en 16 horas, mientras que para los analitos propilparabeno y butilparabeno se obtuvo una remoción entre el 60 y 75 % de la cantidad inicial mediante la biodegradación de los contaminantes.

Después de 24 h de exposición se logró una remoción del 37 % de oxibenzona, principalmente por el proceso de bioacumulación.

Perspectivas.

Debido a que las cantidades remanentes de todos los contaminantes en la biomasa y sobrenadante del cultivo son menores a las cantidades inicialmente agregadas, se infiere que el microorganismo es capaz de metabolizarlos, por lo cual, será necesario realizar ajustes a la metodología desarrollada para hacer evidente la presencia de estos metabolitos y evaluar una posible identificación que permita obtener mayor información sobre la ruta que desarrolla *S. acutus* para la remoción de este tipo de contaminantes.

4. Bibliografía.

1. Bai, X., et al., *Occurrence, distribution, and seasonality of emerging contaminants in urban watersheds*. Chemosphere, 2018. **200**: p. 133-142.
2. Naidu, R., et al., *Emerging contaminant uncertainties and policy: The chicken or the egg conundrum*. Chemosphere, 2016. **154**: p. 385-390.
3. Naidu, R., et al., *Emerging contaminants in the environment: Risk-based analysis for better management*. Chemosphere, 2016. **154**: p. 350-357.
4. Tran, N.H., M. Reinhard, and K.Y.-H. Gin, *Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review*. Water Research, 2018. **133**: p. 182-207.
5. Taheran, M., et al., *Emerging contaminants: Here today, there tomorrow!* Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management, 2018. **10**: p. 122-126.
6. Ebele, A.J., M. Abou-Elwafa Abdallah, and S. Harrad, *Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in the freshwater aquatic environment*. Emerging Contaminants, 2017. **3**(1): p. 1-16.
7. Sui, Q., et al., *Occurrence, sources and fate of pharmaceuticals and personal care products in the groundwater: A review*. Emerging Contaminants, 2015. **1**(1): p. 14-24.
8. Wang, J. and S. Wang, *Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from wastewater: A review*. Journal of Environmental Management, 2016. **182**: p. 620-640.
9. hogar, C.y.a.d.l.i.d.c.p.y.d. Código COSMEP 2.0. 2017 [cited 2018 16/07/2018]; Available from: <http://www.canipec.org.mx/woo/xtras/codigo%20cosmep/codigoCOSMEP2.0.pdf>.
10. Tamura, I., et al., *Contribution of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) to whole toxicity of water samples collected in effluent-dominated urban streams*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017. **144**: p. 338-350.
11. Díaz Ley, B., F. Heras Mendaza, and L. Conde-Salazar Gómez, *Parabenos: ¿mito o realidad?* Piel, 2006. **21**(5): p. 231-240.
12. Haman, C., et al., *Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: A review*. Water Research, 2015. **68**: p. 1-11.
13. Ramos, S., et al., *Advances in analytical methods and occurrence of organic UV-filters in the environment — A review*. Science of The Total Environment, 2015. **526**: p. 278-311.
14. Borgå, K., *Ecotoxicology: Bioaccumulation* ☆, in *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. 2013, Elsevier.
15. Ahmed, M.B., et al., *Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: A critical review*. Journal of Hazardous Materials, 2017. **323**: p. 274-298.
16. An, H.J., et al., *Adsorptive removal of wide range of pharmaceutical and personal care products from water by using metal azolate framework-6-derived porous carbon*. Chemical Engineering Journal, 2018. **343**: p. 447-454.
17. 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.
18. Gomes, J., et al., *Application of ozonation for pharmaceuticals and personal care products removal from water*. Science of The Total Environment, 2017. **586**: p. 265-283.
19. Rodriguez-Narvaez, O.M., et al., *Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review*. Chemical Engineering Journal, 2017. **323**: p. 361-380.

20. Escapa, C., et al., *Paracetamol and salicylic acid removal from contaminated water by microalgae*. Journal of Environmental Management, 2017. **203**: p. 799-806.
21. Matamoros, V., et al., *Capability of microalgae-based wastewater treatment systems to remove emerging organic contaminants: A pilot-scale study*. Journal of Hazardous Materials, 2015. **288**: p. 34-42.
22. Muñoz, R. and B. Guieysse, *Algal–bacterial processes for the treatment of hazardous contaminants: A review*. Water Research, 2006. **40**(15): p. 2799-2815.
23. Sardella, A., et al., *The relationship between sulfur metabolism and tolerance of hexavalent chromium in Scenedesmus acutus (Spheropleales): Role of ATP sulfurylase*. Aquatic Toxicology, 2019. **216**: p. 105320.
24. Morsi Abd-El-Monem, H., M.G. Corradi, and G. Gorbi, *Toxicity of copper and zinc to two strains of Scenedesmus acutus having different sensitivity to chromium*. Environmental and Experimental Botany, 1998. **40**(1): p. 59-66.
25. El-Sheekh, M.M., R.A. Hamouda, and A.A. Nizam, *Biodegradation of crude oil by Scenedesmus obliquus and Chlorella vulgaris growing under heterotrophic conditions*. International Biodeterioration & Biodegradation, 2013. **82**: p. 67-72.
26. Nakajima, N., et al., *Glycosylation of bisphenol A by freshwater microalgae*. Chemosphere, 2007. **69**(6): p. 934-941.
27. Nanduca, H., *Utilización de aguamiel de café y melaza en agua residual sintética en el cultivo de la microalga Scenedesmus sp. para la producción de lípidos.*, in Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. México. 2015: Yucatán
28. Simpson, N., *Solid-Phase Extraction*. 2000, New York: Marcel Editions.
29. Capriotti, A.L., et al., *Recent advances and developments in matrix solid-phase dispersion*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2015. **71**: p. 186-193.
30. Andrade-Eiroa, A., et al., *Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I)*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016. **80**: p. 641-654.
31. 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.
32. Abo, R., N.A. Kummer, and B.J. Merkel, *Optimized photodegradation of Bisphenol A in water using ZnO, TiO2 and SnO2 photocatalysts under UV radiation as a decontamination procedure*. Drink. Water Eng. Sci., 2016. **9**(2): p. 27-35.
33. Barker, S.A., *Matrix solid phase dispersion (MSPD)*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2007. **70**(2): p. 151-162.
34. Maria Kristenson, E., U. Brinkman, and L. Ramos, *Recent Advances in Matrix Solid-Phase Dispersion*. Vol. 25. 2006. 96-111.
35. Leng, A., et al., *Pump- and Valve-Free Flow Injection Capillary Liquid Electrode Discharge Optical Emission Spectrometry Coupled to a Droplet Array Platform*. Analytical Chemistry, 2016. **89**.
36. Polo Diez, L.M., *Fundamentos de Cromatografía* ed. D. Editorial. 2015, Madrid, España. 385.
37. Snyder, L.R., *Peer Reviewed: HPLC: Past and Present*. Analytical Chemistry, 2000. **72**(11): p. 412 A-420 A.
38. Yandamuri, N., *Comparative study of new trends in HPLC: A review*. Vol. 23. 2013.
39. Technologies, A., *SAMPLE PREPARATION FUNDAMENTALS FOR CHROMATOGRAPHY*. 2013: CANADA.
40. UTEX. *Culture collection of algae, University of Texas at Austin*. 2018 [cited 2019 07/05/2019]; Available from: <https://utex.org/products/utex-b-0072>.

41. Campos, D., et al., *Ecotoxicity of two organic UV-filters to the freshwater caddisfly *Sericostoma vittatum**. *Environmental Pollution*, 2017. **228**: p. 370-377.
42. Cheng, J., et al., *Removing ethinylestradiol from wastewater by microalgae mutant *Chlorella* PY-ZU1 with CO₂ fixation*. *Bioresource Technology*, 2018. **249**: p. 284-289.
43. Comeche, A., et al., *Effect of methylparaben in *Artemia franciscana**. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2017. **199**: p. 98-105.