



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
INGENIERÍA AMBIENTAL – SUELO Y AGUAS SUBTERRÁNEAS

CUANTIFICACIÓN DE 4-NONILFENOL, BISFENOL-A, NAPROXENO,
IBUPROFENO Y DICLOFENACO EN CULTIVOS REGADOS CON AGUA
RESIDUAL

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN INGENIERÍA

PRESENTA:
GUSTAVO ADOLFO GUTIÉRREZ FERNÁNDEZ

TUTOR PRINCIPAL:
M. C. MARÍA INÉS JOSEFINA NAVARRO GONZÁLEZ
INSTITUTO DE INGENIERÍA

COMITÉ TUTOR:
DRA. PETIA MIJAYLOVA NACHEVA
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN INGENIERÍA
DR. EDUARDO VEGA
FACULTAD DE INGENIERÍA

MÉXICO, D. F. MAYO 2015

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. Petia Mijaylova Nacheva

Secretario: M. en C. María Inés Josefina Navarro González

Vocal: Dra. Christina Desireé Siebe Grabach

1^{er.} Suplente: Dr. Pandiyan Thangarasu

2^{do.} Suplente: Dr. Eduardo Vega González

Lugar o lugares donde se realizó la tesis: INSTITUTO DE INGENIERÍA

TUTOR DE TESIS:

M. C. MARÍA INÉS JOSEFINA NAVARRO GONZÁLEZ

FIRMA

Dedicatoria

A mis padres por siempre apoyarme y mi novia Diana por siempre estar a mi lado.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme disponer de sus instalaciones para continuar con mis estudios.

Al Instituto de Ingeniería por brindarme la infraestructura necesaria para la realización de esta tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

A la M. en C. Inés Navarro por aceptarme aceptarme bajo su tutela y brindarme el apoyo para desarrollar mi tesis a través de los recursos de su línea de investigación.

A los integrantes del jurado de examen, Dra. Petia Mijaylova Nacheva, M. en C. María Inés Josefina Navarro González, Dra. Christina Desireé Siebe Grabach, Dr. Pandiyan Thangarasu y Dr. Eduardo Vega González, cuyos comentarios enriquecieron este trabajo.

A la Dra. Christina Desireé Siebe Grabach, la M. en C. Fabiola Rodríguez Evangelista y el Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar por compartir conmigo su experiencia y recomendaciones.

A la Dra. América Rosales Plascencia, el Dr. José Antonio Barrios Pérez, la M. en C. Catalina Maya Rendón y la Q.F.B. Emilia Soledad Lucario por tener siempre la disposición para escucharme y un buen consejo para dar, así como por su apoyo durante mi estancia en el Instituto.

A los estudiantes de intercambio M. en C. Vitor Cano y M. en I. Edecio José de Souza Filho por su apoyo en el laboratorio y su amistad.

A la Dra. Nidya Olivia Aponte Hernández, la M. en I. María Eugenia Haro González y la Ing. Claudia Lorena Sánchez Huerta, compañeras del Instituto de Ingeniería, por los buenos momentos que compartimos.

A las M. en I. Mónica Guadalupe López Ortega y Sandra Yazmín Arzate Salgado, compañeras de la maestría, por hacer más amena la experiencia académica.

Finalmente, extendiendo un agradecimiento especial a los Doctores Juan Carlos Durán Álvarez y Francisco José Torner Morales por su invaluable disposición, disponibilidad y capacidad para brindar asistencia en todos los aspectos de este trabajo, desde la orientación y la aclaración de las más variadas dudas hasta la solución de problemas concretos.

Contenido

1	RESUMEN	1
2	INTRODUCCIÓN	2
2.1	Hipótesis.....	5
2.2	Objetivo general.....	6
2.3	Alcances.....	6
3	ANTECEDENTES	7
3.1	Riego con agua residual	7
3.1.1	Factores de riesgo en el riego agrícola con agua residual	9
3.2	Compuestos xenobióticos en el tejido vegetal	14
3.2.1	Asimilación, translocación y excreción.....	14
3.2.2	Transformación	17
3.3	Compuestos de interés	19
3.3.1	4-Nonilfenol (NP).....	20
3.3.2	Bisfenol-A (BPA)	24
3.3.3	Naproxeno (NPX).....	27
3.3.4	Ibuprofeno (IBU).....	30
3.3.5	Diclofenaco (DIC).....	32
3.4	Técnicas analíticas	35
3.4.1	Muestreo	35
3.4.2	Pretratamiento del tejido vegetal y preparación de muestra	36
3.4.3	Extracción.....	37
3.4.4	Concentración y purificación.....	39
3.4.5	Separación y detección	41
4	METODOLOGÍA.....	55
4.1	Selección de contaminantes y cultivos	56
4.2	Metodología de extracción y cuantificación	57
4.2.1	Propuesta del método.....	57
4.2.2	Ejecución y evaluación del método propuesto	65
4.2.3	Modificaciones I - Substratos, estándares y solventes de extracción.....	65
4.2.4	Validación del método modificado I	66
4.2.5	Modificaciones II - Limpieza mediante SPE en tándem	69
4.2.6	Validación del método modificado II	70
4.2.7	Límites de detección (LOD)	71
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	73
5.1	Ejecución y evaluación del método propuesto	73
5.1.1	Compuestos de carácter ácido	75
5.1.2	Compuestos fenólicos	76
5.1.3	Estándares de recuperación.....	77
5.2	Extracción comparativa con MeOH y hexano	77

5.2.1	Compuestos de carácter ácido	78
5.2.2	Compuestos fenólicos	79
5.2.3	Estándares de recuperación	79
5.3	Validación del método modificado I	80
5.3.1	Linealidad	80
5.3.2	Repetibilidad	81
5.3.3	Especificidad	82
5.3.4	Recuperación	86
5.4	Comparación del efecto de la utilización de distintos sustratos en conjunto con SPE en tándem	94
5.5	Validación del método modificado II	96
5.5.1	Especificidad	98
5.5.2	Recuperaciones	100
6	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	104
7	REFERENCIAS	105

Tablas

Tabla 1 - Comparación de la frecuencia de enfermedades hídricas entre el Valle del Mezquital y una zona regada con agua limpia. Adaptado de Cifuentes y Blumenthal, 1992.	10
Tabla 2 - Patógenos detectados en agua subterránea. Adaptado de Chávez et al., 2011.....	11
Tabla 3 - Concentraciones de metales en suelos regados por 100 años con agua residual, en alfalfa y granos de maíz ahí cultivados y límites a la ingesta propuestos por organismos internacionales. Adaptado de Cayetano Salazar, 2012.	13
Tabla 4 - Propiedades fisicoquímicas, estructura y concentraciones del NP.....	21
Tabla 5 - Propiedades fisicoquímicas, estructura y concentraciones del BPA.....	24
Tabla 6 - Propiedades fisicoquímicas, estructura y concentraciones del NPX.....	28
Tabla 7 - Propiedades fisicoquímicas, estructura y concentraciones del IBU.....	31
Tabla 8 - Propiedades fisicoquímicas, estructura y concentraciones del DIC.....	33
Tabla 9 – Técnicas para la extracción y cuantificación de micro-contaminantes orgánicos.....	45
Tabla 10 - Concentraciones de compuestos de interés en agua y suelo	57
Tabla 11 - Estándares de recuperación y enriquecimiento propuestos	58
Tabla 12 - Parámetros de extracción del equipo ASE 200	59
Tabla 13 - Estándares internos propuestos.....	61
Tabla 14 - Estándares externos propuestos.....	61
Tabla 15 - Agentes derivatizantes	61
Tabla 16 - Condiciones de operación del GC-MS	63
Tabla 17 - Tiempos de retención e iones característicos	63
Tabla 18 - Estándares de recuperación, enriquecimiento e internos del método modificado I	65
Tabla 19 - Soluciones para la prueba de linealidad.....	66
Tabla 20 - Soluciones para prueba de repetibilidad	67
Tabla 21 - Estándares de recuperación, enriquecimiento e internos del método modificado II	70
Tabla 22 - Recuperaciones promedio para compuestos de carácter ácido por nivel de enriquecimiento.....	75
Tabla 23 - Cantidades y concentraciones de los analitos encontradas en blancos	75
Tabla 24 - Recuperaciones promedio para compuestos fenólicos por nivel de enriquecimiento....	76
Tabla 25 - Cantidades y concentraciones de los analitos encontradas en blancos	76
Tabla 26 - Recuperaciones promedio de los estándares de recuperación	77
Tabla 27 - Recuperaciones y desviaciones estándar para la prueba de extracción comparativa con lechuga y cilantro de compuestos de carácter ácido.....	79
Tabla 28 - Recuperaciones y desviaciones estándar para la prueba de extracción comparativa con lechuga y cilantro de compuestos fenólicos.	79
Tabla 29 - Recuperaciones promedio de los estándares de recuperación	80
Tabla 30 - Coeficientes R^2 de la prueba de linealidad considerando altura y área para compuestos de carácter ácido.....	81
Tabla 31 - Coeficientes R^2 de la prueba de linealidad considerando altura y área para compuestos fenólicos.....	81

Tabla 32 - Coeficientes de variación para altura de pico y área bajo la curva para la prueba de repetibilidad para los compuestos de carácter ácido	82
Tabla 33 - Coeficientes de variación (Cv) para altura de pico y área bajo la curva para la prueba de repetibilidad para los compuestos fenólicos	82
Tabla 34 - Recuperaciones de compuestos de carácter ácido para la validación del método modificado I con cilantro.....	88
Tabla 35 - Cantidades y concentraciones de los analitos encontradas en blancos en cilantro	89
Tabla 36 - Recuperaciones de compuestos fenólicos para la validación del método modificado I con cilantro	89
Tabla 37 - Cantidades y concentraciones de los analitos encontradas en blancos en cilantro	90
Tabla 38 - Recuperaciones promedio de los estándares de recuperación en cilantro	90
Tabla 39 - Recuperaciones de compuestos de carácter ácido para la validación del método modificado I con lechuga	91
Tabla 40 - Cantidades y concentraciones de los analitos encontradas en blancos en lechuga	92
Tabla 41 - Recuperaciones de compuestos fenólicos para la validación del método modificado I con lechuga	92
Tabla 42 - Cantidades y concentraciones de los analitos encontradas en blancos en lechuga	93
Tabla 43 - Recuperaciones promedio de los estándares de recuperación en lechuga	93
Tabla 44 - Recuperaciones de compuestos de carácter ácido para la validación del método modificado II.....	100
Tabla 45 - LOD IBU.....	100
Tabla 46 - Cantidades y concentraciones de los analitos encontradas en blancos	101
Tabla 47 - Recuperaciones de compuestos fenólicos para la validación del método modificado II	101
Tabla 48 - Cantidades y concentraciones de los analitos encontradas en blancos	102
Tabla 49 - Recuperaciones promedio de los estándares de recuperación	102

Figuras

Figura 1 - Concentración de metales en suelos del Valle del Mezquital y Tláhuac. Incluye niveles potencialmente dañinos. Adaptado de Mireles et al., 2004.....	12
Figura 2 - Vías de ingreso y movilización de los xenobióticos en las plantas. Adaptado de Collins et al., 2006.....	15
Figura 3 - Vías de transporte al xilema. Adaptado de Orita, 2012.	17
Figura 4 - Transformaciones de los contaminantes orgánicos dentro de la célula vegetal.	18
Figura 5 - Posibles caminos de los fármacos a las plantas. Adaptado de Jjemba, 2002.	20
Figura 6 - Presencia de líquido ligero en fase no-acuosa en el suelo.....	23
Figura 7 - Técnicas básicas de SPE. Adaptado de Sigma-Aldrich Co., 1998.....	40
Figura 8 - Amplificación de señal, adaptado de Hajšlová & Zrostlíková, 2003	44
Figura 9 - Metodología	56
Figura 10 - Equipo ASE 200.....	59
Figura 11 - Equipo CentriVap	59
Figura 12 - Percolación de extractos diluidos en cartuchos de SPE.....	60
Figura 13 - Evaporación de fases orgánicas con N ₂ de ultra alta pureza y calor.....	62
Figura 14 - Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas.....	63
Figura 15 - Método modificado I.....	68
Figura 16 - Relación altura de pico/altura de ruido	71
Figura 17 - Método modificado II.....	72
Figura 18 - Interferencias para DIC en extracciones con hexano y con MeOH.....	78
Figura 19 - Cromatogramas comparativos del ión característico para los tres niveles de enriquecimiento de los compuestos de carácter ácido. Especificidad de la respuesta.....	84
Figura 20 - Cromatogramas comparativos del ión característico para los tres niveles de enriquecimiento de los compuestos fenólicos. Especificidad de la respuesta.	86
Figura 21 - Extractos de cilantro y lechuga	87
Figura 22 - Muestras de cilantro y lechuga listas para inyección en cromatógrafo.....	88
Figura 23 - Extractos con diferentes configuraciones de substratos tras centrifugado	95
Figura 24 - Cartuchos tras la percolación de los extractos diluidos.....	95
Figura 25 - Eluatos ácidos.....	96
Figura 26 - Eluatos fenólicos	96
Figura 27 - Diferencia en turbiedad en muestras procesadas de ácidos	96
Figura 28 - Viales de polipropileno con extractos diluidos antes y después de centrifugar.....	97
Figura 29 - Facciones ácida y fenólica listas para inyectar tras SPE en tándem y extracción con MgSiO ₃	97
Figura 30 - Cromatogramas comparativos del ión característico para los tres niveles de enriquecimiento de los compuestos de carácter ácido. Especificidad de la respuesta.....	99

Ecuaciones

Ecuación 1 - Cálculo del D_{ow}	16
Ecuación 2 - Cálculo de concentración absoluta con estándar externo	64
Ecuación 3 - Factor de corrección por estándar interno.....	64
Ecuación 4 - Concentración corregida por estándar interno	64
Ecuación 5 - Cálculo del LOD	71

1 RESUMEN

El riego con agua residual, cruda o tratada, es una práctica cada vez más común a nivel mundial dada la creciente escasez de agua y la necesidad tanto de liberar agua de primer uso para consumo humano como de evitar la contaminación de cuerpos de agua. Esta práctica brinda diversos beneficios como un incremento en el rendimiento de los cultivos así regados dadas las cantidades de nutrientes presentes en el agua, particularmente el agua residual cruda, y la remoción de material en suspensión, materia orgánica, patógenos y contaminantes por filtración a través del suelo. Dentro de los contaminantes presentes en el agua residual podemos destacar algunos como los metales pesados, sales, patógenos y micro-contaminantes orgánicos como retardantes de flama, fármacos, plastificantes, surfactantes, hormonas y otros disruptores endócrinos y muchos otros químicos. Se ha observado que, en muchos casos, los contaminantes quedan retenidos en el suelo tras el riego, limitando su desplazamiento hacia cuerpos de agua subterránea y su biodisponibilidad. A pesar de esto, existe evidencia que confirma la capacidad de las plantas de absorber y translocar distintos contaminantes, presentes en el agua de riego y el suelo, mediante diversos mecanismos. Si bien en general las plantas son capaces de metabolizar los contaminantes absorbidos en cierta medida, se ha observado que en muchos casos pueden ser detectados en su forma inalterada tras la cosecha, pudiendo así continuar en la cadena alimenticia con el riesgo de afectar a otros organismos más sensibles y de bioacumularse a niveles peligrosos. Igualmente, existe el riesgo de que el consumo frecuente de cultivos regados con agua residual represente una fuente crónica de contacto con diversos fármacos y disruptores endócrinos, generando alteraciones en el desarrollo de los organismos expuestos o complicaciones médicas tras años de exposición. Por último, es probable que la presencia de ciertos contaminantes tenga efectos fitotóxicos para algunas plantas a partir de ciertas concentraciones.

Por dichas razones, el objetivo de este trabajo fue desarrollar una técnica de extracción de micro-contaminantes en matriz vegetal y adaptarla a un protocolo de cuantificación por cromatografía de gases y espectrometría de masas para la detección y cuantificación de 4-nonilfenol, bisfenol-A, naproxeno, ibuprofeno y diclofenaco.

En materia analítica, la determinación de concentraciones a nivel de traza de contaminantes en una matriz tan compleja como la vegetal, presenta múltiples retos dada la gran cantidad de interferencias presentes de manera natural en la muestra y que dificultan la detección y correcta cuantificación de los analitos de interés. Por ello, de la amplia revisión bibliográfica realizada se seleccionaron diversas metodologías de limpieza y preparación de muestra, solventes de extracción y purificación de extractos, las cuales fueron evaluadas con la finalidad de determinar el procedimiento óptimo que brindara resultados satisfactorios con recuperaciones entre 70 y 120% y un coeficiente de variación menor al 32% en las muestras hechas por triplicado. Para el desarrollo de la técnica se utilizaron muestras de cilantro con tres niveles de enriquecimiento (0, 10 y 100ng/gseco).

Los resultados de esta tesis contribuyeron a identificar elementos cruciales a considerar para el desarrollo de una metodología de extracción, identificación y cuantificación de micro-contaminantes orgánicos en la matriz vegetal.

2 INTRODUCCIÓN

El término «contaminantes emergentes» ha rondado la literatura científica durante casi 20 años (USEPA, 2008) haciendo referencia a una amplia gama de compuestos presentes en el ambiente. Desde entonces, el término ha resultado práctico como título divulgativo, no obstante ofrece poca información acerca de la naturaleza misma de los compuestos que comprende y ha sido fuente de incesante confusión entre los sectores de la población menos familiarizados con el quehacer científico. Con frecuencia, se entiende que dicha condición de «emergentes» se debe a su reciente introducción al ambiente, aunque esto no es necesariamente así, ya que el término emergente puede referirse al interés por el estudio de estos compuestos o los efectos que causan. No existe una definición formal y universalmente reconocida del término ni fronteras fijas que delimiten el conjunto de compuestos que engloba. A grandes rasgos, se entienden dos cosas por «contaminantes emergentes»: aquellas sustancias, antropogénicas o de origen natural, presentes en el ambiente que no están reguladas y, por lo tanto, no tienen programas de monitoreo periódico en los que se les dé seguimiento, pero que bien pueden ser incluidos en la legislación, dependiendo de los resultados de toxicidad y ecotoxicidad que arrojen las investigaciones. Otra definición válida puede referirse a aquellas sustancias cuyos probables efectos perjudiciales para la salud humana y/o el ambiente recientemente descubiertos hayan despertado el interés en su estudio (Petrovic et al., 2008). Como se puede apreciar, ambas interpretaciones son complementarias, sin embargo suelen mencionarse por separado. De aquí se desprende que el término "emergente" sea vago y poco definitorio, pues no hace referencia a alguna característica inherente a los compuestos que engloba, y ello facilita que éstos puedan variar de acuerdo al criterio de diferentes autores u organizaciones, o en función de las tendencias de estudio y los temas más populares del momento. En cualquier caso, los contaminantes emergentes son también sustancias que, aunque pueden haber estado presentes en el ambiente desde hace tiempo, en muchos casos han sido detectados recientemente gracias a los avances en las técnicas analíticas (Kümmerer, 2011). En particular, la mayor sensibilidad de los métodos utilizados ha permitido efectuar análisis de sustancias presentes en el rango de las partes por billón ($\mu\text{g/L}$ y $\mu\text{g/kg}$) y aún menores como las partes por trillón (ng/L y ng/kg). Así pues, resulta más apropiado referirse a estos contaminantes como «micro-contaminantes».

Los micro-contaminantes comprenden una amplísima gama de sustancias con toda clase de origen, tales como los desechos municipales e industriales, los pesticidas y los fármacos excretados por el hombre y los animales (Yamamoto et al., 2001; Le et al., 2008; Petrovic et al., 2008) y, con frecuencia, los productos de la degradación biológica de estas y otras sustancias (Harms, 1996). Siendo un tema reciente y sobre el cual se realizan actualmente gran cantidad de investigaciones, no existe una estructura definida para agrupar a los compuestos ya que aquellos con usos similares con frecuencia tienen estructuras químicas muy variadas y viceversa, por lo tanto la manera de agruparlos suele obedecer al enfoque de cada investigación. Dada la gran variedad de estructuras químicas y usos de estos micro-contaminantes, tienen una variedad igualmente amplia de efectos adversos en el ambiente y en el hombre; por ejemplo efectos en el sistema endócrino (Bondesson et al., 2009), el desarrollo de resistencias a antibióticos en diversos microorganismos, carcinogénesis y muy diversos defectos en el desarrollo de los organismos (Ho et al., 2006 y Keri et al., 2007).

El destino final de los micro-contaminantes es el ambiente, de manera que se encuentran presentes en prácticamente todas las matrices posibles: el suelo, los cuerpos de agua, las plantas, los animales e incluso en el aire (Vandenberg et al., 2007; Xie y Ebinghaus, 2008; Durán-Álvarez et al., 2009; Bondesson et al., 2009 y Calderón-Preciado et al., 2011a,b). La principal vía de ingreso de los micro-contaminantes al ambiente es el agua residual; la cual puede ser de origen doméstico, industrial, hospitalaria y, en algunos casos, escorrentía de tierras agrícolas y drenajes de granjas de crianza intensiva de animales para consumo humano (Lindqvist et al., 2005 y Terzić et al., 2008). El agua residual es una mezcla rica y compleja de contaminantes que incluye compuestos farmacéuticamente activos, antibióticos, productos de aseo y cuidado personal, químicos industriales, fertilizantes y pesticidas, entre otros (Behera et al., 2011). Dado el relativamente poco tiempo desde que estos contaminantes despertaron interés en la comunidad científica y el tiempo que tardan los desarrollos científicos en pasar de la teoría al prototipo y al producto final, las tecnologías destinadas a su remoción se encuentran apenas en sus primeras etapas de desarrollo (Dolar et al., 2012 y Carbonaro et al., 2013) y no existe una implementación a gran escala de procesos tan avanzados. Tampoco existe una legislación en donde se exponga cuáles de los micro-contaminantes hay que remover del agua residual y hasta que niveles la presencia de éstos es aceptable en cada tipo de agua. Esto, aunado a las muy variadas características fisicoquímicas de los compuestos contaminantes, implica que aunque algunos puedan ser removidos en cierta medida en las plantas de tratamiento convencionales, muchos otros siguen presentes en los efluentes entrando así al ambiente. De igual manera, puesto que la fertilización con biosólidos es una práctica frecuente, aquellos contaminantes cuya remoción haya sido por sorción en los lodos, pueden ingresar al ambiente cuando éstos se esparcen en las tierras de cultivo (La Guardia et al., 2000; Mortensen y Kure, 2003; Sabourin et al., 2012). Así pues, resulta evidente que los micro-contaminantes ingresan de manera constante al ambiente; muy comúnmente de manera no planificada, de modo que, en el mejor de los casos, una baja persistencia se ve compensada por una alta y constante tasa de adición y, en el peor de los casos, se tiene una acumulación importante de contaminantes recalcitrantes (Gibson et al., 2010) que requieren estrategias específicas para su remoción.

Al estar presentes en los suelos, los micro-contaminantes son susceptibles de ser asimilados en cierta medida por las plantas y a su vez, las plantas pueden por un lado, no ser capaces de metabolizarlos para disminuir o nulificar su toxicidad, o por el otro lado, reducirlos hasta sustancias elementales (Kvesitadze et al., 2009). De aquí se desprenden dos motivos para desarrollar técnicas de análisis de micro-contaminantes en matrices vegetales: a) evaluar el posible riesgo a la salud humana por ingesta de esta clase de contaminantes a través de vegetales (Calderón-Preciado et al., 2009), o bien, b) evaluar la factibilidad de utilizar diversas plantas con fines de bioremediación (Saiyood et al., 2010). Sin embargo, a la fecha la mayoría de las técnicas analíticas y estudios se han enfocado en el análisis del agua residual, otra parte importante a los suelos y pocos se han enfocado a las matrices orgánicas, como son los vegetales y los fluidos corporales. Esto es particularmente cierto para estudios de campo no controlados, aunque cada vez son más los estudios en los que se aplican las técnicas desarrolladas en laboratorio al análisis de cultivos reales.

Previos estudios han determinado que las plantas son capaces de descomponer o modificar moléculas orgánicas, incluidos los contaminantes, y disponer de ellas mediante diversos mecanismos metabólicos que disminuyen o neutralizan su toxicidad (Kvesitadze et al., 2009). Por ejemplo, Harms (1996) encontró que cultivos celulares y cultivos hidropónicos de diversas especies vegetales eran capaces de asimilar 4-nonilfenol de la solución circundante y metabolizarlo, produciendo distintos metabolitos y CO₂. A pesar de esto, con frecuencia se pueden encontrar trazas de los compuestos inalterados dentro del tejido vegetal como se pudo observar en el experimento de Harms (1996), en el cual al mismo tiempo que se encontraron metabolitos en las distintas plantas y cultivos celulares, también fue posible encontrar el compuesto inalterado. Otras investigaciones han encontrado diversos compuestos en su estado inalterado tras haber sido asimilados por diferentes especies vegetales como col (Herklotz et al., 2010), zanahoria y jitomate (Sabourin et al., 2012) y alfalfa y hojas de manzano (Calderón-Preciado et al., 2011b). Lo anterior implica que la ingesta de vegetales regados con agua residual, tratada o no, puede representar una más de las posibles vías de exposición a los micro-contaminantes (Imai et al., 2007; Loffredo et al., 2010; Calderón-Preciado et al., 2011b; Geens et al., 2011 y Covaci et al., 2012) para los humanos o el ganado que, como hacen notar Geens et al. (2012), no ha sido suficientemente analizada puesto que la investigación se ha enfocado primordialmente en los alimentos empacados.

México se encuentra dentro de los países con mayor superficie regada con agua residual, totalizando alrededor de 350,000 ha (Sánchez González et al., 2012), de las cuales más de 90,000 pertenecen al Valle del Mezquital (CONAGUA, 2006 y 2011). En esta zona, el agua residual ha sido suministrada desde la Ciudad de México por más de cien años (Ortega-Larrocea et al., 2001). En diversas investigaciones se ha encontrado la presencia de gran variedad de micro-contaminantes en el agua que se usa en el riego, así como en el suelo regado e incluso, en muy bajas concentraciones, en el agua subterránea alimentada por la infiltración desde los campos de riego (Gibson et al., 2007; Durán-Álvarez et al., 2009; Gibson et al., 2010 y Chávez et al., 2011). Por tal motivo, resulta probable que existan concentraciones de diversos micro-contaminantes en los cultivos de dicha zona, lo cual plantea la necesidad de desarrollar metodologías analíticas especializadas en la detección de estos micro-contaminantes en tejido vegetal y, a partir de ahí, realizar estudios con el fin de determinar si estas concentraciones representan un posible riesgo para la salud humana. Sin embargo, el análisis de contaminantes en matrices ambientales, particularmente en concentraciones tan pequeñas como las de los micro-contaminantes, representa todo un reto que puede ser abordado mediante una gran variedad de técnicas. Por ello, existen actualmente diversos protocolos analíticos que hacen uso de diferentes métodos de acondicionamiento, extracción, purificación, separación y análisis de contaminantes orgánicos diversos en matrices complejas (Matamoros et al., 2012). Esta amplia oferta de técnicas analíticas presenta dos posibles caminos por elegir: a) la adaptación y utilización de una técnica desarrollada por otros investigadores, posiblemente de otro país, o bien, b) desarrollar una técnica acoplable a las técnicas existentes en un grupo de trabajo dedicado al estudio en México de los micro-contaminantes, con experiencia y conocimientos suficientes acerca de las particularidades del caso mexicano, la naturaleza fisicoquímica de sus tierras y la problemática socioeconómica que afecta a su sistema de producción agrícola y sus agricultores, así como las necesidades específicas de

desarrollo del país. El primer camino implica perpetuar la tradición mexicana de importar tecnología por falta de apoyo al desarrollo y la investigación científica; el segundo, implica poner a México en posición de exportar tecnología, conocimiento y, sobre todo, soluciones integrales de análisis que no requieran la adición de protocolos ajenos al cuerpo de metodologías desarrollado con la finalidad de funcionar como un conjunto de análisis agrícola tri-matrical suelo-planta-agua capaz de brindar resultados que permitan un análisis integral en materia de micro-contaminantes orgánicos y sea aplicable, con sus posibles adecuaciones, a cualquier escenario agrícola del mundo sin la necesidad de una capacitación exhaustiva del personal destinado a desarrollar los análisis.

Así pues, en concordancia con esta última idea, planteo como proyecto de tesis para la obtención del grado de Maestro en Ingeniería Ambiental el desarrollo de una técnica de análisis de micro-contaminantes en tejido vegetal que sea acoplable con las técnicas usadas actualmente en el Grupo de Tratamiento y Reúso de agua residual del Instituto de Ingeniería de la Universidad Nacional Autónoma de México, las cuales se desarrollaron para la determinación y cuantificación de un grupo de micro-contaminantes en agua y suelo. Este estudio tiene la finalidad de explorar distintas alternativas para superar las dificultades inherentes al análisis de compuestos orgánicos de distinta naturaleza en la matriz vegetal, con la finalidad de identificar elementos críticos que permitan desarrollar técnicas robustas capaces de brindar resultados confiables en el análisis de diferentes cultivos.

2.1 Hipótesis

- Dada la presencia de micro-contaminantes orgánicos tanto en las tierras de cultivo como en el agua residual que se emplea para riego, así como la evidente capacidad de asimilación y translocación de xenobióticos orgánicos en ciertas plantas comestibles, es posible encontrar a los micro-contaminantes que están presentes en el agua residual y el suelo también en el tejido vegetal de diversos cultivos.
- Dada la complejidad de la matriz vegetal y la gran cantidad de compuestos sintetizados de manera natural por las plantas, se encontrarán gran cantidad de interferencias co-extraídas en los extractos, las cuales deberán ser retiradas para permitir la detección y cuantificación de los analitos.
- La utilización de diversos substratos en la preparación de muestra permitirá realizar una extracción más selectiva de los analitos.
- Dada la eficacia probada de los cartuchos Oasis® HLB para remover interferencias en los análisis de suelo, agua residual y lodo, será posible purificar los extractos de matriz vegetal utilizando únicamente estos cartuchos.

2.2 Objetivo general

Desarrollar una técnica de extracción de micro-contaminantes en matriz vegetal y adaptarla a un protocolo de cuantificación por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) para la detección y cuantificación de 4-nonilfenol, bisfenol-A, naproxeno, ibuprofeno y diclofenaco.

2.3 Alcances

- Para el desarrollo de la técnica se utilizó un cultivo que se consume crudo y se produce en zonas regadas con agua residual.
- Para el análisis por GC-MS de los cinco micro-contaminantes se empleó un protocolo diseñado para suelos consistente en:
 - Extracción de los micro-contaminantes en tejido sólido con fluidos presurizados (ASE)
 - Purificación de la muestra mediante extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés)
 - Preparación de la muestra por derivatización
 - Análisis por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas (GC-MS)
- Para el desarrollo del protocolo de extracción de los micro-contaminantes se generaron muestras sintéticas.

3 ANTECEDENTES

3.1 Riego con agua residual

El reuso del agua residual, ya sea tratada, cruda o diluida, en la agricultura es una práctica que, según diversos registros, data de cuando menos 4000 años, habiendo evidencia arqueológica de esta práctica en ruinas de la Grecia Antigua del periodo Minoico como el palacio de Phaistos (Angelakis et al., 2005 y De Feo et al., 2011). A lo largo de las últimas décadas, esta práctica ha cobrado cada vez mayor importancia dentro de un contexto global de escasez de agua para consumo humano y para riego y creciente preocupación por la contaminación del agua de ríos, lagos y litorales. De igual manera, se ha visto que el alto contenido de material orgánico y de nutrientes en el agua residual funciona como fertilizante, incrementando los rendimientos de los cultivos irrigados (Jiménez, 1995; Hamilton et al., 2007). Sin embargo, existe también una gran preocupación por los daños a la salud y al ambiente que se puedan derivar de esta práctica, ya que en el agua residual, aun en la tratada, existe gran variedad de compuestos químicos, microorganismos, sales y metales capaces de desatar epidemias o tener diversos efectos perjudiciales en los organismos expuestos (Chen et al., 2013).

A nivel mundial, existe una clara división entre la calidad del agua de reúso en los países desarrollados y aquellos en desarrollo. En los países desarrollados, el agua de reúso está compuesta, en su mayoría, por efluentes de plantas de tratamiento que cuentan por lo menos con tratamientos secundarios, incluso se presentan efluentes de tratamiento terciario como es el caso de Arabia Saudita; por otra parte, en los países subdesarrollados, el agua de reúso generalmente es agua residual cruda o con tratamientos que producen efluentes de baja calidad (Hamilton et al., 2007). El uso de agua residual no tratada se observa también en países desarrollados. En muchas ciudades de los Estados Unidos, por ejemplo, se practica la agricultura peri-urbana, en la cual se emplea agua residual cruda o diluida con agua de la llave para satisfacer la demanda hídrica de cultivos de fácil venta como flores, forrajes, algunos comestibles y plantas de ornato (Jiménez & Asano, 2008).

Al igual que el reúso de agua residual no es un fenómeno exclusivo de países subdesarrollados, tampoco es exclusivo de países áridos. Existen muchos casos en que la distribución temporal y espacial de los recursos hidrológicos es desfavorable y son indispensables inversiones considerables para la construcción de obras de conducción para transportar el agua de una zona a otra, o bien, de grandes obras de almacenamiento para garantizar el suministro en las temporadas de sequía en zonas donde la precipitación se concentra en ciertas épocas del año. Tales son los casos de Brasil y China, que cuentan con grandes cantidades de agua pero cuyos más importantes núcleos de población se encuentran en las zonas con menor disponibilidad de agua (Hamilton et al., 2007).

Los suelos irrigados con agua residual, cruda o tratada, tienden a modificar sus propiedades fisicoquímicas por la constante adición de materia orgánica, sales y agua a un cierto pH. Dependiendo del pH del suelo y su capacidad amortiguadora, es posible que se presente un

desplazamiento del pH del suelo hacia los valores del agua de riego (Mapanda et al., 2005 y Xu et al., 2010), ello puede presentar distintas ventajas y problemas complejos según la interacción de los diferentes componentes del suelo y del agua residual. Por ejemplo, al disminuir el pH del suelo, la adsorción de diversos iones metálicos, como Cu^{2+} , Cd^{2+} y Pb^{2+} , en la superficie de las arcillas disminuye por la protonación de los grupos funcionales ahí presentes, si bien esto es más evidente a valores de pH por debajo de 5 (Abollino et al., 2003). Con frecuencia se tiene un incremento en el contenido de macronutrientes como carbono, fósforo, potasio y nitrógeno totales así como de materia orgánica (Lucho-Constantino et al., 2005; Xu et al., 2010), si bien ésta suele ser relativamente lábil, es decir, rápidamente mineralizable, por la naturaleza de la materia orgánica presente en el agua residual; este incremento en el contenido de materia orgánica le puede conferir un incremento importante en la capacidad de intercambio catiónico al suelo, mejorando sus propiedades como filtro y amortiguador así como su capacidad de retención de bases intercambiables, incrementando fertilidad y productividad (Xu et al., 2010). El agua residual tiene un contenido importante de micro-nutrientes como Fe, Zn, Cu, Mo, B, Ni y Co necesarios para el desarrollo óptimo de las plantas (Chen et al., 2013). Igualmente, se ha visto que el aporte de otros macro-nutrientes como P, Mg y K, además del N, a través del agua residual puede incluso ser superior a las cantidades que usualmente se necesita agregar con fertilizantes químicos, lo cual puede ocasionar lixiviación de nitratos hacia el acuífero, escorrentía de N y P hacia los cuerpos de agua superficial, lo que favorece la eutroficación de éstos (Siebe, 1998). De la misma manera, la disponibilidad de P en el suelo es directamente proporcional al tiempo bajo irrigación con agua residual (Siebe, 1998). El ingreso de N en formas fácilmente aprovechables como nitrato y amonio por las plantas ayuda a disminuir la necesidad de utilizar fertilizantes químicos (Chen et al., 2013).

Investigaciones previas sugieren que el riego con agua residual favorece el desarrollo de la biomasa microbiana del suelo y su actividad mediante la adición de materia orgánica lábil y nutrientes dentro de un régimen de mayor humedad, fomentando así la fertilidad y disponibilidad de nutrientes en el sustrato (Friedel et al., 2000; Meli et al., 2002). Sin embargo, se han observado cambios en la población microbiana como resultado de los contaminantes presentes en el agua residual, incrementando la capacidad desnitrificadora; igualmente, el riego con agua residual por tiempos prolongados puede llegar a elevar los niveles de metales pesados en el suelo, perjudicando a la biomasa microbiana (Friedel et al., 2000 y Durán-Álvarez & Jiménez-Cisneros, 2014).

Los beneficios del riego con agua residual se pueden apreciar en diversos escenarios. Por ejemplo, en las comunidades donde se adopta ésta práctica, se tiene una reducción de costos por la reducción en el uso de fertilizantes y agua de primer uso para el riego. En sustentabilidad y sanidad, el uso de agua residual permite reintegrar agua al ambiente, darle tratamiento y favorecer la recarga de acuíferos (Durán-Álvarez & Jiménez-Cisneros, 2014).

Sin embargo, a pesar de las múltiples ventajas que ofrece el reúso de agua residual para el riego agrícola, existen factores de riesgo que deben ser considerados para determinar la compatibilidad entre el sitio y el agua de riego y determinar así su vulnerabilidad. Por regla general, dichos factores de riesgo disminuyen a medida que aumenta el nivel de tratamiento que recibe el agua residual antes de su utilización para riego (Muñoz et al., 2010).

3.1.1 Factores de riesgo en el riego agrícola con agua residual

3.1.1.1 Riesgos biológicos

Existen varios factores de riesgo inherentes a la práctica del riego agrícola con agua de reúso, sin embargo, el más comúnmente reconocido es el riesgo de infección por distintos tipos de patógenos presentes en el agua residual (Chen et al., 2013), principalmente en el agua sin tratamiento. La mayor parte de los estudios que han analizado las enfermedades derivadas del riego con agua residual se han enfocado al consumo de los vegetales, lo mismo sucede con los modelos de análisis de riesgo; sin embargo, en los países en vías de desarrollo existe también un impacto muy importante en la población en contacto directo con el agua de riego, por ejemplo las familias dedicadas a la agricultura. Cifuentes y Blumenthal (1992) reportaron que en niños que habitan zonas regadas con agua residual cruda, es hasta 16 veces más frecuente la presencia de parasitosis helmíntica que en aquellos niños que habitan zonas regadas con agua limpia (Tabla 1). Al seguir el trayecto del agua residual que se infiltra hacia los acuíferos, se ha encontrado que la presencia de patógenos puede ser persistente, si bien disminuye drásticamente por un tratamiento de tipo SAT (Soil Aquifer Treatment) que se obtiene como beneficio adicional del riego, esto representa además un riesgo moderado para la población que obtiene el agua potable de los acuíferos y manantiales que brotan alimentados por el agua de riego y para la gente que entra en contacto con ella por motivos recreativos (

Tabla 2).

El riesgo de enfermedades derivadas de la presencia de organismos patógenos en el agua residual utilizada disminuye considerablemente a medida que incrementa el nivel de tratamiento antes de su utilización, sin embargo existen organismos muy resistentes que continúan presentes en el agua en concentraciones mayores que sus dosis infectivas aun después de diferentes tratamientos (Levantesi et al., 2010).

Tabla 1 - Comparación de la frecuencia de enfermedades hídricas entre el Valle del Mezquital y una zona regada con agua limpia. Adaptado de Cifuentes y Blumenthal, 1992.

Especie	Población afectada por edades	Tasas de morbilidad		
		Zona regada con agua residual cruda (A)	Zona regada con agua limpia (B)	Relación (A/B)
<i>Áscaris lumbricoides</i>	0 - 4	15.3	2.7	5.7
	5 - 14	16.1	1	16.1
	> 15	5.3	0.5	10.6
<i>Giardia lamblia</i>	0 - 4	13.6	13.5	1.0
	5 - 14	9.6	9.2	1.0
	> 15	2.3	2.5	0.9
<i>Entamoeba histolytica</i>	0 - 4	7	7.3	1.0
	5 - 14	16.4	12	1.4
	> 15	16	13.8	1.2

Tabla 2 - Patógenos detectados en agua subterránea. Adaptado de Chávez et al., 2011.

Zona de muestreo	Procedencia del agua	Coliformes fecales [UFC/100mL]	Bacteriófagos somáticos [UFP/100mL]	<i>Giardia</i> spp. [quistes/L]	Huevos de helminto [huevo/L]
Zona 1*	Pozo	207 - 800	74 - 106	19 - 600	nd - 0.9
	Pozo profundo	nd - 23	nd - 9	nd	nd
	Manantial	20 - 118	nd - 37	nd - 4	nd
Zona 2**	Pozo profundo	nd - 6	nd - 8	nd	nd
	Manantial	21 - 81	nd - 24	nd	nd - 0.1
Zona 3***	Pozo	42 - 137	71 - 91	nd - 13	nd
	Pozo profundo	nd - 433	nd - 610	nd - 162	nd - 0.1
	Manantial	71 - 373	nd - 39	nd	nd

* Parte sur de la zona de riego con agua residual del Valle del Mezquital regada con agua residual recién ingresada a la región

** Zona ubicada al norte de la Zona 1, regada con agua que ha permanecido un tiempo en una presa de regulación (Presa Endho) y se ha mezclado con agua de lluvia

*** Zona al norte de la Zona 2, regada con agua de la Presa Endho que ha sido mezclada con agua de pozo

Por otra parte, es importante recalcar el riesgo que implica para el consumidor final la presencia de diversos organismos patógenos en el agua residual cuando ésta se utiliza para el riego de cultivos destinados para consumo humano o animal que crecen al nivel del suelo. En investigaciones previas se han analizado diversas hortalizas como son la lechuga, la espinaca, el cilantro, zanahoria y rábano, entre otras, en las cuales se ha detectado la presencia de diversos organismos patógenos como huevos de helminto y quistes de giardia (Amahmid et al., 1999; Petterson et al., 2001 y Gupta et al., 2009).

3.1.1.2 Riesgos fisicoquímicos

Existen también otros factores de riesgo menos conocidos para la población en general por ser mucho más específicos y de no tan inmediata apreciación, por ejemplo: la presencia de diversos compuestos tóxicos, orgánicos e inorgánicos, metales pesados, sales excesivas que ocasionan la salinización y sodificación de los suelos y posiblemente de los acuíferos que captan el agua de infiltración y la sobrefertilización que afecta a los suelos, las plantas y el agua subterránea. Los diversos contaminantes representan un riesgo no sólo para la salud de los consumidores y agricultores sino para la misma agricultura, pues pueden inhibir el desarrollo de las cosechas alterando las características fisicoquímicas de los suelos o afectando directamente a las plantas mediante diversos mecanismos de acción propios de los diferentes contaminantes.

3.1.1.2.1 Metales

Generalmente los metales pesados se encuentran en forma catiónica de manera que se adsorben con facilidad a los sitios activos en la materia orgánica y las arcillas (si están presentes) que son removidas en las plantas de tratamiento de agua residual; así pues, el problema de la adición de metales pesados a suelos es particularmente notorio en aquellos lugares donde el riego emplea agua residual cruda mientras que en las zonas donde se utilizan efluentes con algún nivel de tratamiento, este problema es de menor relevancia (Hamilton et al., 2007). En particular, la utilización de agua residual industrial genera altos niveles de contaminación por su elevado contenido de metales (Qadir et al., 2010).

En algunos suelos regados con agua residual cruda se han encontrado metales en concentraciones que representan un riesgo a la salud (Figura 1). El contenido de metales en el suelo incrementa con el tiempo bajo riego; sin embargo, la cantidad biodisponible es moderada gracias a la capacidad filtro y de amortiguamiento del suelo (Siebe, 1994), donde los metales son retenidos por diversos mecanismos como la adsorción a la materia orgánica y las arcillas (Mireles et al., 2004). Especialmente en suelos neutros a alcalinos, los metales no se encuentran disueltos en el agua que se infiltra a través del suelo (Abollino et al., 2003 y Mapanda et al., 2005). Existe, sin embargo, riesgo de movilización de los metales pesados retenidos en el suelo puesto que generalmente se encuentran en la fracción fácilmente movilizable tras su ingreso (Kashem y Singh, 2004; Lucho-Constantino et al., 2005 y Zheng & Zhang, 2011). En el estudio realizado por Cayetano Salazar en 2012, se encontró que la concentración de algunos metales pesados en alfalfa incrementa de manera lineal en función del tiempo bajo riego con agua residual. Las concentraciones encontradas por Cayetano Salazar en alfalfa y granos de maíz cultivados en tierras que han sido regadas con agua residual por 100 años se encuentran en la Tabla 3.

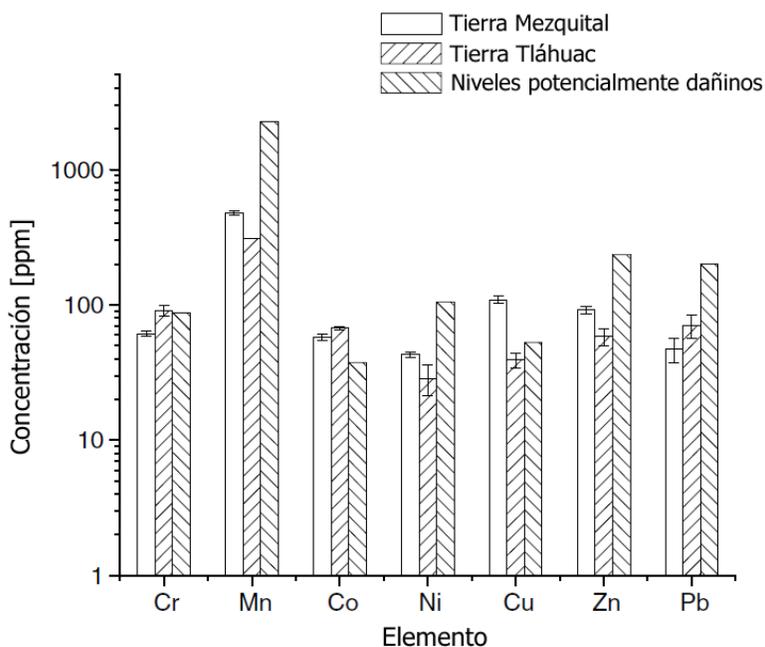


Figura 1 - Concentración de metales en suelos del Valle del Mezquital y Tláhuac. Incluye niveles potencialmente dañinos. Adaptado de Mireles et al., 2004.

Tabla 3 - Concentraciones de metales en suelos regados por 100 años con agua residual, en alfalfa y granos de maíz ahí cultivados y límites a la ingesta propuestos por organismos internacionales. Adaptado de Cayetano Salazar, 2012.

Tipo de suelo	Metal	Matriz [mg/kg]			Límites
		Suelo*	Alfalfa	Maíz	
Leptosol	Cd	5.228 ± 1.573	0.193 ± 0.021	0.008 ± 0.001	25**
	Cu	124.75 ± 15.777	7.925 ± 0.386	1.6 ± 0.283	1.5-12***
	Zn	79.25 ± 18.804	27.5 ± 1.732	22.5 ± 0.707	13-48***
Vertisol	Cd	4.85 ± 2.087	0.155 ± 0.019	0.003 ± 0	25**
	Cu	82 ± 26.621	6.325 ± 0.435	1.2 ± 0.141	1.5-12***
	Zn	84 ± 22.106	24.75 ± 2.062	24.5 ± 4.509	13-48***

* Extractable con NH_4NO_3 1M (metal disponible para las plantas)

** Ingesta mensual tolerable provisional [$\mu\text{g}/\text{kg}_{\text{masa corporal}}$] según la Organización Mundial de la Salud y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO & WHO, 2010)

*** Ingesta diaria máxima recomendada según la Organización Mundial de la Salud [mg/día] (WHO, 1996), variable en de sexo y edad

3.1.1.2.2 Sales y sodio

El agua residual de riego, aun la tratada, tiene concentraciones considerablemente mayores de sales que el agua limpia. Mediante la adición constante de sales al suelo se presentan fenómenos de salinización y sodificación (Xu et al., 2010) que pueden tener efectos diversos sobre el suelo y sobre las plantas. Se ha observado que a medida que pasa el tiempo en un suelo que ha sido sometido a riego con agua residual, el Na^+ puede ir intercambiando al Ca^{2+} en los sitios de intercambio del suelo, limitando su disponibilidad y favoreciendo la dispersión de arcillas y pérdida de estructura, sin embargo, dada la constante adición de materia orgánica, este fenómeno se puede amortiguar (Siebe, 1998).

Los cultivos son susceptibles de ser afectados por las sales mediante desequilibrios osmóticos en la zona radical, los cuales dificultan la absorción y retención del agua en la raíz y deben ser compensados mediante acumulación de iones por parte de la planta, proceso que requiere de grandes cantidades de energía y que a la larga disminuye de manera importante los rendimientos de las cosechas; por otra parte, se presenta fitotoxicidad cuando entran los iones a la planta e interfieren con los procesos celulares (Hamilton et al., 2007). En los suelos, la dispersión de las arcillas minerales puede derivar la pérdida de la estructura del suelo y la formación de una capa densa y de reducida conductividad hidráulica en la interfase suelo-aire (So, 2005), la cual puede ocasionar anegamientos. Cuando éste fenómeno se presenta en la totalidad del horizonte superficial, se tiene un incremento en la densidad del suelo y una disminución en el tamaño de los poros en todo el horizonte (So, 2005). Como resultado de estos fenómenos, se puede presentar una disminución en el crecimiento de las cosechas. La excesiva salinización del suelo y la aparición de costras en superficie puede ser contrarrestada con la aplicación de láminas de sobre-riego que garanticen el lavado de las sales (Siebe, 1998), sin embargo, esto puede poner en riesgo a los acuíferos por un ingreso excesivo de NO_3^- con el agua de percolación.

3.1.1.2.3 Exceso de nutrientes

A pesar de las bondades propias del agua residual por su alto contenido de nutrientes que funcionan como un fertilizante natural, en algunos casos se puede presentar el fenómeno de sobrefertilización, ocasionando disminuciones en el rendimiento, periodos más prolongados de maduración y taponamiento y disminución de la conductividad hidráulica por crecimiento excesivo

de microfauna (Hamilton et al., 2007). Adicionalmente, un ingreso alto de NO_3^- combinado con una reducida capacidad de intercambio catiónico puede implicar la contaminación de los acuíferos al permanecer en solución en el agua de percolación (Siebe, 1998; Chávez et al., 2011 y Chen et al., 2013).

3.1.1.2.4 Compuestos químicos

El análisis y control del ingreso de compuestos químicos al ambiente a través del agua residual plantea diversas dificultades por la gran cantidad de sustancias y la gran diversidad de mecanismos de acción y estructuras químicas presentes. Además, la predominancia de efectos crónicos sobre los efectos agudos y las extremadamente bajas concentraciones a las que están presentes dificultan su detección (Hamilton et al., 2007). Existe una gran cantidad de grupos de contaminantes presentes en el agua residual, tanto cruda como tratada, entre los cuales se pueden encontrar fármacos de distinta naturaleza (antiinflamatorios, antibióticos, β -bloqueadores, reguladores de lípidos, fármacos psiquiátricos, antiepilépticos, etc.), productos de cuidado personal (antisépticos, fragancias, bloqueadores UV), productos químicos de uso industrial (plastificantes, surfactantes, retardantes de flama), pesticidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, entre otros. Los distintos químicos tienen diferentes mecanismos de acción y estructuras químicas de distinta naturaleza, ello implica que su interacción con el ambiente, su recalcitrancia y su destino son diferentes (Muñoz et al., 2009).

3.2 Compuestos xenobióticos en el tejido vegetal

Los compuestos xenobióticos son aquellos que, siendo ajenos a un organismo y sus funciones, los podemos encontrar en él. De esta definición se entiende que los micro-contaminantes, orgánicos e inorgánicos, son compuestos xenobióticos pues su presencia en los organismos no se deriva de su producción dentro de ellos ni de su asimilación por formar parte de sus procesos metabólicos.

3.2.1 Asimilación, translocación y excreción

El ingreso de xenobióticos a las plantas se lleva a cabo a través de las raíces y de las hojas. La absorción de contaminantes por el tejido radicular se ve influenciada por la solubilidad en agua del contaminante, su masa molecular, su concentración en la solución del suelo, la polaridad del compuesto, su constante de disociación ácida (pK_a), el pH de la solución del suelo, la temperatura y el contenido de humedad en el suelo (Coleman y Martinoia, 2000; Korte et al., 2000; Kvesitadze et al., 2009).

Los contaminantes ingresan al espacio intercelular de la raíz mediante difusión de la solución del suelo, en la cual se encuentran disueltos. Una vez en el interior de la planta, los contaminantes se difunden y concentran en el tejido, para lo cual es necesario penetrar las membranas celulares. Los contaminantes únicamente son capaces de penetrar la membrana de

células carentes de suberina y cutícula, pues éstas son estructuras químicas que funcionan como aislante. Las moléculas más hidrófobas tienen mayores valores del coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}), esto implica que, inicialmente, estarán más fuertemente asociadas a la materia orgánica del suelo y serán menos susceptibles de encontrarse en la solución del suelo, de manera que serán menos propensas a ser asimiladas (Bromilow & Chamberlain, 1995). En el caso de la asimilación a través de las hojas, los xenobióticos ingresan a través de los estomas o la cutícula, siendo esta última la principal vía de ingreso para compuestos orgánicos, debido a la estructura lipofílica de las hojas. La cutícula está formada por cutina, cutano y ceras, todos ellos lipofílicos. Sin embargo, al madurar las hojas las ceras tienden a predominar sobre la cutina reduciendo la capacidad de absorción de compuestos orgánicos de la cutícula (Coleman & Martinoia, 2000; Korte et al., 2000 y Kvesitadze et al., 2009). En la Figura 2 se muestran las vías de ingreso y translocación de los xenobióticos en las plantas.

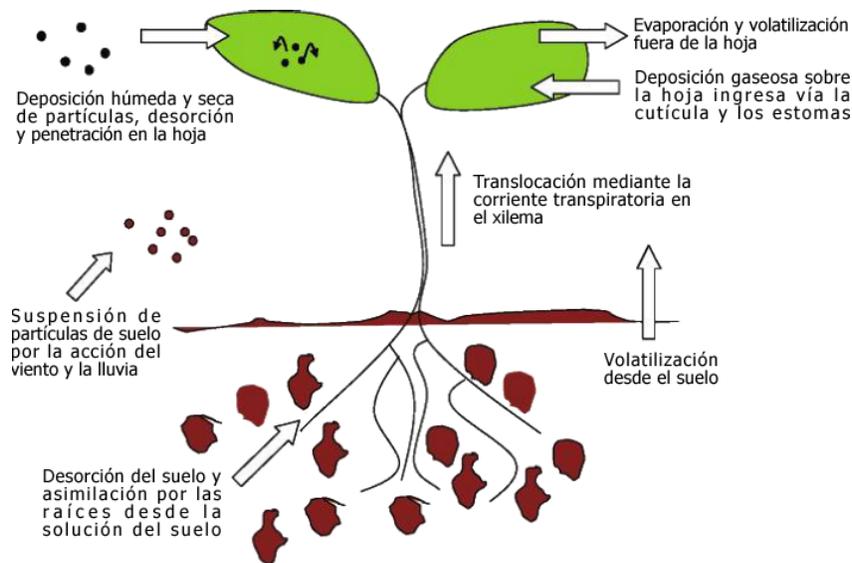


Figura 2 - Vías de ingreso y movilización de los xenobióticos en las plantas. Adaptado de Collins et al., 2006.

La penetrabilidad de un compuesto a través de la membrana celular depende de manera importante del peso molecular del compuesto, guardando con éste una relación inversamente proporcional. La penetración de los compuestos hacia el interior de la célula se lleva a cabo por medio de dos mecanismos, el transporte activo y el pasivo, siendo este último el más común. Para poder ingresar mediante transporte activo, es necesaria la existencia de alguna proteína en la membrana que, además de transportar metabolitos propios de la célula y nutrientes, sea capaz de transportar también al compuesto. Otros factores determinantes en la tasa de transferencia por transporte pasivo a través de la membrana celular son la constante de partición octanol-agua (K_{ow}), como medida de la lipofilicidad del compuesto, así como la carga de la molécula, pues el transporte pasivo es más efectivo cuando la molécula no tiene carga. La mayor dificultad para que moléculas cargadas atraviesen la membrana celular obedece a la repulsión entre la carga negativa

de los aniones y la carga negativa de la membrana celular (Trapp, 2000 y 2009). Por otra parte, el efecto trampa de iones puede generar una importante asimilación de los compuestos ionizables siempre que el pH de la solución que circunda al tejido sea menor que el del interior de tejido. Una vez cruzada la membrana celular, y manteniendo la diferencia en el pH, los compuestos neutros se ionizan, en mayor o menor medida, en el interior de la célula y quedan atrapados ya que no pueden cruzar nuevamente la membrana para salir (Bromilow & Chamberlain, 1995), creando además un gradiente de concentración del compuesto no-ionizado. Dicha ionización de los compuestos modifica su hidrofobicidad, lo cual a su vez facilita o dificulta su paso a través de las membranas celulares, pues se ha visto que moléculas altamente hidrofílicas o altamente hidrofóbicas cruzan con mayor dificultad (Bromilow & Chamberlain, 1995). Una manera de tomar en cuenta esa modificación es mediante el cálculo del coeficiente de partición octanol-agua dependiente del pH (D_{ow} , Ecuación 1, Tanoue et al., 2012). De este modo, variables de incidencia directa sobre la magnitud del ingreso de moléculas ionizables a las células son el pH de la solución, así como el pKa y el K_{ow}/D_{ow} del compuesto (Coleman & Martinoia, 2000; Korte et al., 2000; Kvesitadze et al., 2009 y Tanoue et al., 2012).

Ecuación 1 - Cálculo del D_{ow}

$$\log D_{ow} = \log K_{ow} + \log \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_a}}$$

Una vez en el interior de las células, los contaminantes pueden ser transportados hacia los tejidos vasculares, el xilema y el floema, para ser distribuidos hacia distintas partes de la planta. Dicho transporte se ve favorecido para compuestos con un K_{ow} en el rango de 1 a 4; con el máximo variando según la especie vegetal (Bromilow & Chamberlain, 1995; Tanoue et al., 2012 y Calderón-Preciado et al., 2013). El transporte hacia los tejidos vasculares se puede dar por la vía simplástica o por la apoplástica. En la vía apoplástica, el agua y los compuestos en solución se desplazan a lo largo del cuerpo continuo formado por las paredes celulares mientras que en la vía simplástica, el agua y los compuestos atraviesan la membrana celular y se desplazan a través del citoplasma, cruzando membranas celulares por difusión o por la acción de alguna proteína, o bien, pasando de célula a célula a través de los plasmodesmas. Sin embargo, al llegar a la endodermis, conjunto de células que rodean los tejidos vasculares, ambas vías convergen y deben cruzar simplásticamente (Figura 3). Los compuestos más lipofílicos tienden a desplazarse por la vía simplástica, quedando retenidos a su paso por las células (Orita, 2012).

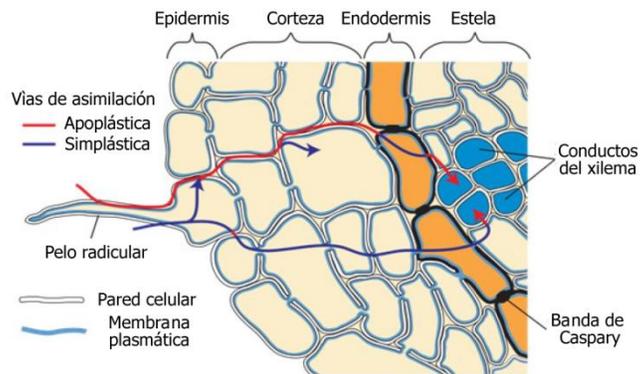


Figura 3 - Vías de transporte al xilema. Adaptado de Orita, 2012.

A través del xilema se presenta un movimiento predominantemente unidireccional acrópeto (de las partes bajas a las altas) a través de tejido muerto lignificado. En el floema, se presenta un movimiento bidireccional acrópeto y basípeto (de arriba hacia abajo) a través de células vivas. El flujo en el xilema se conoce como corriente transpiratoria y tiende a ir hacia las partes aéreas de la planta para reponer el agua perdida por la transpiración mientras que el flujo en el floema se encarga de la translocación de los compuestos sintetizados durante la fotosíntesis hacia sitios de almacenamiento y zonas de crecimiento (Korte et al., 2000 y Kvesitadze et al., 2009). Compuestos lipofílicos tienden a quedar retenidos en las partes bajas de la planta durante su movimiento por el xilema, de igual forma, compuestos ionizables son susceptibles de ser retenidos durante su viaje por los tejidos vasculares por los efectos de la trampa iónica (Bromilow & Chamberlain, 1995).

En algunos casos, los contaminantes que han ingresado a la planta son transportados hacia las hojas y/o las raíces, desde donde son excretados en su forma inalterada, sin embargo esto requiere que los compuestos sean altamente móviles y esto no suele suceder (Korte et al., 2000 y Kvesitadze et al., 2009).

3.2.2 Transformación

Las plantas tienen distintos mecanismos para neutralizar la toxicidad de compuestos contaminantes mediante la acción de enzimas que pueden incrementar la hidrofiliidad y con ello disminuir la toxicidad de los agentes contaminantes (Korte et al., 2000 y Kvesitadze et al., 2009). En la Figura 4 se presenta un diagrama de flujo de los procesos metabólicos que sufren los contaminantes dentro de la célula vegetal.

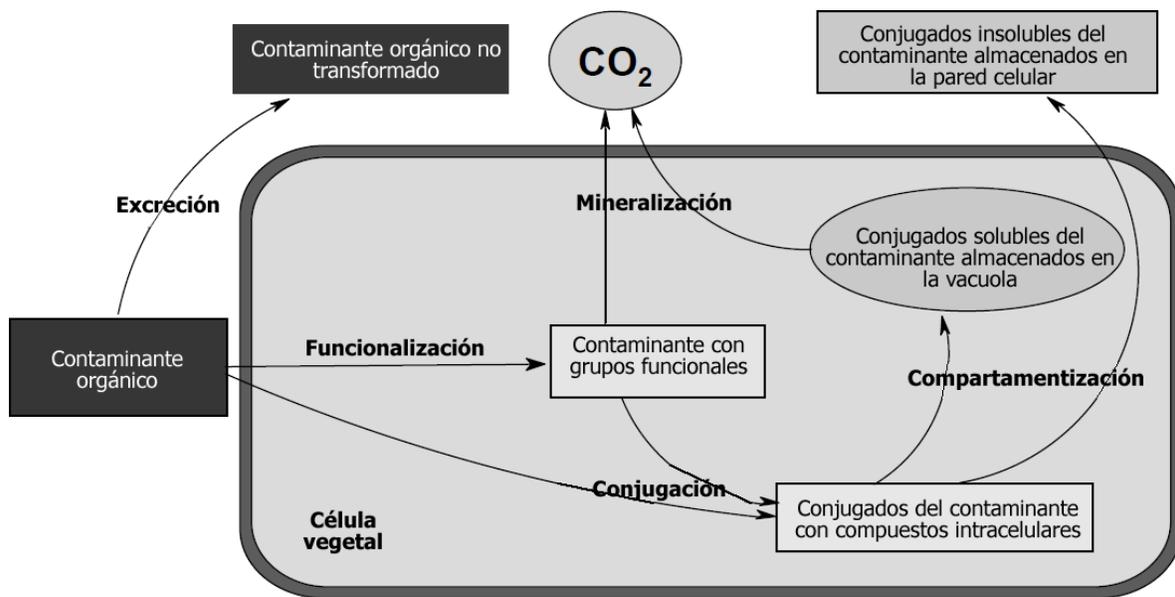


Figura 4 - Transformaciones de los contaminantes orgánicos dentro de la célula vegetal.
Adaptado de Kvesitadze et al., 2009.

3.2.2.1 Funcionalización

Mediante este proceso los compuestos hidrofóbicos adquieren grupos funcionales que incrementan su hidrofiliidad, por ejemplo, la adición grupos OH a través de hidroxilación mediante la acción de enzimas oxidasas del grupo Citocromo P450. Tras la funcionalización, los compuestos contaminantes pueden ser conjugados o mineralizados (Korte et al., 2000 y Kvesitadze et al., 2009).

3.2.2.2 Conjugación

Consiste en la unión del contaminante con compuestos intracelulares como proteínas, amino ácidos, péptidos, lignina y otros sintetizados por las células, formando enlaces covalentes. Generalmente la mayor parte de un contaminante susceptible de ser conjugado es modificado por esta vía al ingresar a la célula para reducir rápidamente su toxicidad cuando la cantidad que ingresa excede la capacidad de mineralización de la célula. La reducción de la toxicidad del compuesto contaminante se debe a que los compuestos con los que es conjugado no son tóxicos para la planta. Tras la conjugación, los contaminantes pueden ser compartimentados o mineralizados (Korte et al., 2000 y Kvesitadze et al., 2009).

3.2.2.3 Compartimentación

Los compuestos conjugados son transportados a compartimentos donde pueden permanecer almacenados a corto o largo plazo. Según el tipo de conjugado, su almacenamiento será dentro de estructuras en la célula (conjugados solubles de péptidos, amino ácidos y azúcares, entre otros),

principalmente vacuolas, donde posteriormente podrán continuar su degradación hasta la mineralización, o bien, en la pared celular (conjugados insolubles de ligninas y celulosa, entre otros) donde formarán parte de los componentes estructurales de la planta (Korte et al., 2000 y Kvesitadze et al., 2009).

3.2.2.4 Mineralización

Estudios realizados con compuestos orgánicos marcados isotópicamente con ^{14}C han permitido determinar que, tras la asimilación, una parte del compuesto asimilado es metabolizada y permanece dentro del tejido vegetal en alguna forma complejada, mientras que otra es totalmente mineralizada por oxidación y se libera en forma de $^{14}\text{CO}_2$. Una fracción más pequeña del contaminante permanece en forma inalterada (Bokern et al., 1998; Korte et al., 2000; Nakajima et al., 2002; Schmidt & Schuphan 2002 y Doucette et al., 2005).

3.3 Compuestos de interés

Los compuestos de interés de este trabajo son dos agentes químicos industriales (4-nonilfenol y bisfenol-A) y tres sustancias farmacéuticamente activas de carácter ácido (naproxeno, ibuprofeno y diclofenaco). En todos los casos se trata de compuestos ionizables (i.e. ácidos débiles) cuya hidrofiliidad depende de su especiación en función del pH, como se discutió en el apartado 3.2.1. En las tablas 4 a 8 se presentan las propiedades fisicoquímicas más relevantes de los compuestos de interés, tales como su estructura y las concentraciones encontradas en el agua residual de riego, cruda o tratada y en los suelos regados con dicha agua. Las concentraciones que pueden encontrarse en tejido vegetal varían en función de la especie, el órgano y el medio en el cual se cultivó, por ello no se presentan en la tabla correspondiente a cada compuesto sino que se encuentran en la tabla que resume las diferentes técnicas analíticas revisadas (Tabla 9).

La principal vía de ingreso a las plantas de los contaminantes en estudio es el agua residual, ya sea directamente en solución o asociados a partículas suspendidas, o bien, a través de los biosólidos. En el caso de los fármacos se tiene una ruta de ingreso ampliamente estudiada la cual se resume en la Figura 5.

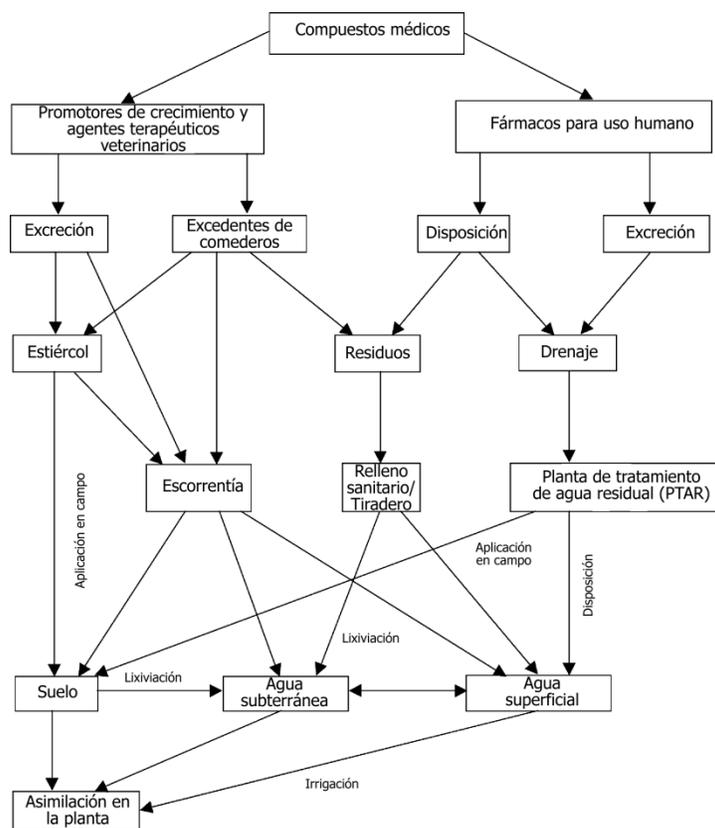


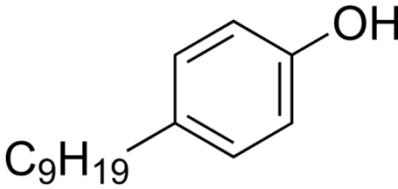
Figura 5 - Posibles caminos de los fármacos a las plantas. Adaptado de Jjemba, 2002.

3.3.1 4-Nonilfenol (NP)

El NP es un alquilfenol, es decir, su estructura consiste en un anillo fenólico con un grupo alquilo de nueve carbonos en posición *para*. Estrictamente, el término “nonilfenol” se refiere únicamente a aquel cuyo grupo alquilo no tiene ramificaciones; sin embargo, casi la totalidad del NP producido es 4-NP, es decir, con un grupo alquilo indefinidamente ramificado ubicado en la cuarta posición del anillo fenólico (European Commission, 2002). Dado que en la literatura se hace referencia generalmente solo al NP, sin especificar la posición del grupo alquilo ni su grado de ramificación, se utilizará el mismo término en lo subsecuente. En la Tabla 4 se presentan las propiedades fisicoquímicas correspondientes al NP.

El NP tiene gran variedad de usos y rutas de ingreso al ambiente, dentro de las cuales destaca la degradación de los alquilfenoles etoxilados, que son el principio activo de los surfactantes no-iónicos de amplio uso industrial y doméstico. Al ser degradados bajo condiciones anaeróbicas, sus metabolitos (productos de degradación biológica), los alquilfenoles ingresan al ambiente a través del agua residual, los efluentes de plantas de tratamiento y los lodos desechados los cuales se usan como biosólidos, entre otras posibles vías. En particular, se ha encontrado que el compuesto se adsorbe fuertemente a los sólidos, tales como los componentes del suelo o de los lodos de las plantas de tratamiento de agua residual (Soares et al., 2008).

Tabla 4 - Propiedades fisicoquímicas, estructura y concentraciones del NP.

Propiedades fisicoquímicas		Estructura ^e
Peso [g/mol]	220.36	
Presión de vapor a 25°C [Pa]	0.3 ^a	
Solubilidad en agua a 20°C [mg/L]	6 ^a	
pKa	10 ^a	
logK _{ow}	4.48 ^a	
Concentraciones en suelos de cultivo y el agua residual con que son regados		
χ _{agua de riego Valle del Mezquital} [μg/L]	11 – 22.4 ^b 5.85 – 33.8 ^c	
χ _{agua de riego} [μg/L]	0.46 – 4.88 ^b 0.33 ^e	
χ _{suelo Valle del Mezquital} [ng/g]	41 – 123 ^f	
χ _{suelo} [ng/g]	14.2 – 55.4 ^d	
χ _{planta}	Variable según cultivo, órgano y condiciones, ver Tabla 9	

^a European Commission, 2002

^b Gibson et al., 2007

^c Chávez et al., 2011

^d Chen et al., 2011

^e Xu et al., 2009c

^f Durán-Álvarez et al., 2009

^g Sigma-Aldrich Co., Nonilfenol

Se han encontrado concentraciones importantes de NP en tejido adiposo y leche materna humana de individuos que no tienen exposición laboral al compuesto (Ademollo et al., 2008 y López-Espinoza et al., 2009) y se ha visto que la exposición intrauterina al NP puede ocasionar una disminución del tamaño y peso del feto al momento del nacimiento (Tsai et al., 2013). Se ha encontrado, además, que es capaz de inducir la proliferación de células cancerígenas en tumores de seno. Se piensa que la principal vía de exposición al nonilfenol es la ingesta de agua potable y alimentos (frutas, verduras lácteos y carnes) contaminados por diversas causas, así como la exposición ocupacional (Soares et al., 2008).

El NP es un compuesto hidrofóbico a valores de pH ácidos y neutro, por lo que tiene poca afinidad por el agua y alta afinidad por la materia orgánica y los minerales en el suelo; aunque esto último se debe a los puentes de hidrógeno que puede establecer con las arcillas minerales. Es por lo anterior que la difusión de este compuesto a través de la fase acuosa en suelos y sedimentos tiende a ser limitada, ya que se adsorbe fuertemente en la superficie de los sólidos. Esta fuerte adsorción igualmente implica que su infiltración hacia el acuífero es limitada; no obstante, aun en suelos neutros y ácidos una fracción del compuesto se encuentra ionizada con carga negativa y es susceptible de ser repelida por las cargas negativas en las partículas del suelo, permaneciendo en solución (Murillo-Torres et al., 2012), y una vez alcanzando el acuífero la degradación de NP es mínima bajo condiciones anaerobias, lo que resulta en una alta persistencia (Murillo-Torres et al., 2012). En zonas contaminadas con este compuesto se han encontrado organismos que han desarrollado la capacidad de degradarlo, de igual manera es susceptible de degradarse mediante fotólisis cuando se encuentra expuesto a la luz solar y es volatilizable aunque en cantidades despreciables (Soares et al., 2008).

3.3.1.1 NP en el agua

Los surfactantes no-iónicos, principalmente alquilfenoles etoxilados y los alcoholes polietoxilados, ingresan en cantidades importantes al agua residual dado que generalmente se aplican en soluciones acuosas y tienen una gran cantidad de aplicaciones domésticas e industriales. Mientras que los alcoholes polietoxilados se degradan con facilidad en cuerpos de agua y plantas de tratamiento de agua residual, los alquilfenoles etoxilados forman compuestos recalcitrantes, entre ellos los alquilfenoles, grupo del cual forma parte el NP. Los alquilfenoles son compuestos hidrofóbicos que tiende a unirse a la materia orgánica presente en el agua (Ahel et al., 1994).

La presencia de este contaminante en agua superficial, océanos y sedimentos se debe principalmente a la actividad humana, particularmente descargas de agua residual (cruda o tratada), escorrentías, proximidad de áreas urbanas y/o industriales y descargas de drenajes pluviales. Así mismo, su presencia en suelos se debe principalmente a actividades humanas como la aplicación de biosólidos para fertilización, derrames accidentales y riego con agua residual (Soares et al., 2008). En las plantas de tratamiento, se tiene un ingreso importante de compuestos alquilfenólicos, de los cuales 25% se puede encontrar en el efluente y adsorbido en los lodos como en forma de NP (Ahel et al., 1994).

Del NP que ingresa a un proceso de tratamiento biológico, o que se forma por la degradación de compuestos alquilfenólicos durante dicho proceso, el 90% es removido mediante adsorción a los lodos (Ahel et al., 1994). En ríos, el NP se encuentra principalmente asociado a los sedimentos y partículas en suspensión, lo cual es consistente con su naturaleza hidrofóbica (Ying et al., 2002 y Soares et al, 2008). Una vez en los sedimentos, el NP es poco biodegradable, si bien su vida media es considerablemente variable pudiendo ir desde semanas hasta meses (Yuan et al., 2004). En un estudio realizado con la finalidad de determinar la distribución del NP en un ambiente acuático, se encontró que más de la mitad del NP se encontraba asociado al sedimento (Huang et al., 2007).

Se han encontrado evidencias de que el NP puede afectar de diversas maneras a los organismos con los que entra en contacto; en el caso de la vida acuática se ha encontrado que ocasiona la feminización de algunas especies, una disminución en la fertilidad masculina y un incremento en la mortandad de organismos jóvenes. Se ha encontrado también que este contaminante se bioacumula en algunos de los organismos que habitan en zonas contaminadas (Vazquez-Duhalt et al., 2005; Soares et al., 2008).

3.3.1.2 NP en suelos

En suelos con un contenido alto de materia orgánica, se presenta una rápida adsorción del NP mediante partición y por la formación de puentes de hidrógeno entre el grupo funcional OH de la porción fenólica y los radicales OH presentes en la materia orgánica del suelo (Murillo-Torres et al., 2012). Se ha observado también que, en función del pH del suelo y el contenido de arcillas, es posible que la adsorción se vea limitada en mayor o menor medida, dada la ionización de las moléculas de NP y la repulsión resultante entre las cargas negativas de las arcillas y de la molécula

ionizada (Murillo-Torres et al., 2012). El NP tiende a permanecer fuertemente unido a la materia orgánica con la cual interactúa y, bajo condiciones aerobias, es fácilmente biodegradable (Hesselsøe et al., 2001). Sin embargo, se ha comprobado que es posible que se presente una degradación bifásica con una fracción recalcitrante de NP cuya vida media puede exceder los tres meses e incluso, en algunos casos, se ha observado su aparente no degradación (Sjöström et al., 2008). Dicha persistencia se puede deber a: a) la presencia de zonas anaerobias donde la degradación se lleva a cabo a menor velocidad, exclusivamente por agentes biológicos y generando diversos metabolitos y residuos no extraíbles; b) la mayor dificultad en la degradación de isómeros con distintas ramificaciones en el grupo alquilo de la molécula; y c) una actividad disminuída del bioma del suelo a causa de un pH desfavorable (Hesselsøe et al., 2001; Sjöström et al., 2008; Liu et al., 2008 y Chang et al., 2009). Existe evidencia que sugiere que el NP puede afectar a diversos organismos del suelo a diversas concentraciones. Generalmente, el primer sistema en ser afectado es el reproductivo, reduciendo las tasas de natalidad de los organismos y afectando su desarrollo. La mortalidad se presenta a concentraciones mucho mayores que aquellas que afectan la natalidad (Scott-Fordsmand & Henning, 2004; Widarto et al., 2004 y Hseu, 2006).

3.3.1.3 NP en plantas

Existe evidencia referente a la fitotoxicidad aguda del NP a diferentes concentraciones y en diferentes cultivos con efectos que van desde la disminución del crecimiento en magnitudes variables y a concentraciones tan bajas como 1 ppm (Bokern et al., 1998 y Roberts et al., 2006) hasta la muerte en cultivos celulares de diversas especies a partir de 11 ppm (Bokern & Harms, 1997). La mortalidad de la planta se puede deber a la alteración de las funciones de la comunidad microbiana por la interacción con el NP, o bien, a concentraciones de líquido ligero en fase no acuosa (LNAPL, por sus siglas en inglés, Figura 6) que, al contacto con las raíces, pueden afectar la integridad de las mismas de manera directa (Roberts et al., 2006).

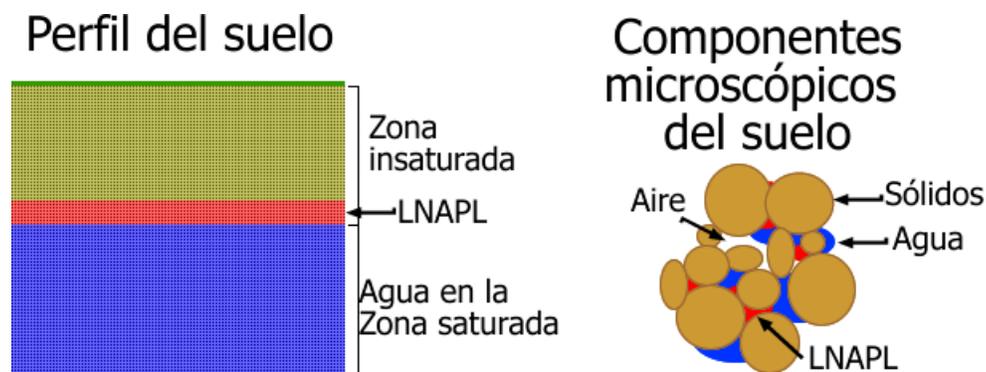


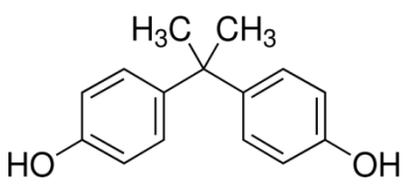
Figura 6 - Presencia de líquido ligero en fase no-acuosa en el suelo

Los estudios sobre asimilación de NP en tejido vegetal han reportado la asimilación y retención del NP dentro del tejido vegetal en su forma inalterada y en diversas partes de la planta (Harms, 1996; Sjöström et al., 2008 y Gatullo et al., 2012). Sin embargo, existe también amplia evidencia de cultivos que se han desarrollado en un ambiente contaminado en los que no se ha detectado contaminación alguna en el follaje (Petersen et al., 2003; Doucette et al., 2005 y Brown et al., 2009). Cabe aclarar que el hecho de no encontrar presencia de NP en el follaje o la raíz de una planta no implica forzosamente que no se haya presentado asimilación del compuesto ya que en algunos estudios realizados con ^{14}C -NP se ha encontrado ^{14}C no asociado al compuesto padre en diferentes partes de la planta, lo cual puede obedecer a: la asimilación y posterior metabolización del ^{14}C -NP por la planta, o bien, a la metabolización del ^{14}C -NP por parte de la microfauna y la posterior asimilación del ^{14}C en la planta (Harms, 1996 y Doucette et al., 2005).

3.3.2 Bisfenol-A (BPA)

El BPA tiene una amplia gama de usos, siendo uno de los químicos de mayor producción a nivel mundial. En la industria, este compuesto tiene una gran cantidad de aplicaciones, por ejemplo: es materia prima para la producción de plásticos de policarbonato, se utiliza como aditivo para otros tipos de plástico, es componente de resinas epóxicas y de los recubrimientos interiores de latas de comida y se utiliza en la producción de diferentes partes para equipos eléctricos y electrónicos, automóviles, etc. (Rubin, 2011). En la Tabla 5 se presentan las propiedades fisicoquímicas correspondientes al BPA.

Tabla 5 - Propiedades fisicoquímicas, estructura y concentraciones del BPA.

Propiedades fisicoquímicas		Estructura ¹
Peso [g/mol]	228.29	
Presión de vapor a 25°C [Pa]	5.3E-6 ^a	
Solubilidad en agua a 25°C [mg/L]	120 ^a	
pKa	9.6 ^b	
logK _{ow}	3.4 ^a	
Concentraciones en suelos de cultivo y el agua residual con que son regados		
χ _{agua de riego Valle del Mezquital} [μg/L]	0.77 – 2.5 ^c 0.43 – 3.18 ^d	
χ _{agua de riego} [μg/L]	0.092 – 0.265 ^e 0.457 ^f 0.037 – 0.171 ^g	
χ _{suelo Valle del Mezquital} [ng/g]	<2 – 14.8 ^h	
χ _{suelo} [ng/g]	-	
χ _{planta}	Variable según cultivo, órgano y condiciones, ver Tabla 9	

^a European Commission, 2003

^b Zeng et al., 2006

^c Gibson et al., 2007

^d Chávez et al., 2011

^e Chen et al., 2011

^f Xu et al., 2009c

^g Calderón-Preciado et al., 2011a

^h Durán-Álvarez et al., 2009

¹ Sigma-Aldrich Co., Bisfenol-A

El ingreso del BPA al ambiente es principalmente a través de tres vías distintas que, sin embargo, comparten el mismo origen: la liberación de BPA de diferentes materiales, principalmente plásticos de policarbonato y resinas epóxicas, mediante hidrólisis.

- Agua residual (cruda o tratada): El BPA se encuentra presente en botellas y contenedores de plástico de policarbonato, así como en los recubrimientos interiores plásticos y epóxicos de latas de comida y bebidas. Mediante hidrólisis se desorbe e ingresa al alimento o bebida contenido en la lata, botella o recipiente para posteriormente ser ingerido por el humano que finalmente lo excreta en la orina y, en mayor medida, en las heces fecales, ingresando así al agua residual (Fürhacker et al., 2000 y Crain et al., 2007).
- Lixiviados de rellenos sanitarios y tiraderos: Siendo uno de los componentes más importantes de los plásticos de policarbonato y resinas epóxicas, el BPA se encuentra presente en gran parte de la basura inorgánica que se dispone en tiraderos y rellenos sanitarios. Al hidrolizarse, principalmente de botellas y otros productos de plástico, éste es arrastrado en los lixiviados que posteriormente pueden contaminar fuentes de agua subterránea o superficial (Yamamoto et al., 2001 y Crain et al., 2007).
- Plásticos de policarbonato y resinas epóxicas en el ambiente: La mayor parte de los desechos sólidos presentes en cuerpos de agua dulce y salada son polímeros sintéticos que representan un enorme reservorio de contaminantes que se desorben, algunas veces asistidos por el clima, e ingresan al agua donde posteriormente entran en contacto con otros organismos (Crain et al., 2007).

Independientemente de la vía por la cual ingresa al ambiente, el BPA se concentra, principalmente, en ríos, lagos y estuarios. Al encontrarse en un ambiente oxigenado, el BPA se degrada con facilidad siempre que los organismos degradadores se encuentren adaptados a este contaminante. Por el contrario, bajo condiciones anóxicas y anaerobias, como las que se presentan en sedimentos, la degradación es limitada y se puede presentar una importante acumulación (Crain et al., 2007).

Se ha encontrado evidencia de que el BPA, aun en niveles de trazas, tiene efectos feminizantes en diferentes organismos. Igualmente se ha observado que en individuos del sexo masculino es capaz de alterar el funcionamiento de las gónadas, disminuyendo la fertilidad e incluso impidiendo el correcto desarrollo de los órganos sexuales en las etapas de gestación (Crain et al., 2007). En humanos, la exposición a niveles elevados de BPA puede ocasionar diabetes, enfermedades cardiovasculares y alteraciones en las enzimas hepáticas, así como propensión a abortos espontáneos o tener partos prematuros, así como la disminución en la fertilidad del hombre, entre otros efectos desfavorables (Rubin, 2011).

3.3.2.1 BPA en agua

El BPA ingresa al agua principalmente a través de fuentes puntuales como los efluentes de plantas de tratamiento de agua residual, o bien, drenajes de diferentes tipos de industria (Fürhacker et al., 2000) que, en algunos casos, son vertidos directamente en cuerpos de agua. Adicionalmente, el

BPA se puede liberar mediante hidrólisis de los recipientes de policarbonato, resinas de recubrimiento y recubrimientos plásticos de latas, particularmente en presencia de ácidos, bases y calor, ocasionando un ingreso directo al agua superficial a través de fuentes no puntuales como la basura plástica flotante, o bien, su ingreso a los lixiviados de rellenos sanitarios y tiraderos (Yamamoto et al., 2001; Crain et al., 2007 y Vom Saal & Hughes, 2005). En general, la remoción de BPA en las plantas de tratamiento son altas y la cantidad retenida al final en los lodos es muy baja (Zhao et al., 2008), representando la adsorción a los sólidos entre el 15% y el 18% de la remoción total. Igualmente, se ha reportado que el BPA es fácilmente biodegradable, con remociones frecuentemente superiores al 90% en cuatro días, en agua superficial con y sin aclimatación previa de la población bacteriana (Staples et al., 1998; European Commission, 2003), si bien las vidas medias son muy variables y el proceso de biodegradación se puede ver ralentizado por bajas temperaturas (Kang & Kondo, 2002). En muestras de agua estériles, el BPA presenta degradación nula o a una tasa muy baja, lo cual confirma que el mecanismo principal de remoción es la biodegradación (European Commission, 2003 y 2010). Se ha encontrado que la presencia del BPA en solución es directamente proporcional a la salinidad del agua e inversamente proporcional al pH y a la cantidad de ácidos húmicos disueltos (Hu et al., 2006).

3.3.2.2 BPA en suelos

El BPA ingresa a los suelos principalmente por prácticas agrícolas como el riego con agua residual cruda o tratada y la aplicación de biosólidos (Fent et al., 2003). Se ha visto que, una vez en contacto con el suelo, se presenta una adsorción importante, limitando su movilidad (Fent et al., 2003 y Xu et al., 2009a); sin embargo, existe evidencia de que su desorción del suelo es rápida y prácticamente total (Loffredo & Senesi, 2006). Una fracción del BPA es rápidamente metabolizada al entrar en contacto con el suelo, de manera que parte de los residuos no extraíbles son metabolitos, adicionalmente, la evidencia sugiere que estos metabolitos no son recalcitrantes (Fent et al., 2003). Aunque la degradación es rápida y prácticamente completa en los suelos durante los primeros diez días con una población microbiana activa, se tiene evidencia de que en condiciones anaerobias, aun con una población activa, la degradación no se lleva a cabo o es extremadamente lenta (Ying & Kookana, 2005).

3.3.2.3 BPA en plantas

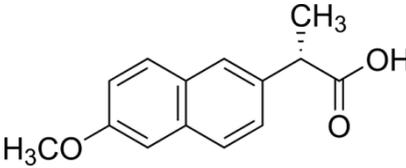
Se ha visto que el BPA no tiene mayores efectos sobre el desarrollo de algunas plantas durante la etapa de germinación, aun a muy altas concentraciones, mientras que en otras, como el jitomate, puede tener efectos como disminución en la longitud del tallo y las raíces y la cantidad y tamaño de las hojas así como la presencia de coloraciones anormales en las raíces y clorosis (Ferrara et al., 2006 y Loffredo et al., 2010). Sin embargo, en etapas posteriores se ha encontrado una severa afectación del tejido vegetal, principalmente en las raíces, en donde causa la reducción en la producción de biomasa, alteraciones morfológicas, da origen a una marcada actividad clastogénica, e incluso lleva a la muerte de la planta. La magnitud del impacto está determinada

por la concentración del contaminante y la capacidad particular de la planta de asimilar y metabolizar el compuesto para reducir su toxicidad (Ferrara et al., 2006 y Loffredo et al., 2010). La formación de complejos de carbohidratos y BPA, la formación de residuos no extraíbles y la formación de compuestos altamente polares son las principales vías mediante las cuales se metaboliza el BPA en las plantas (Schmidt & Schuphan, 2002). Si bien, los residuos no extraíbles y los compuestos altamente polares son considerablemente estables, los compuestos glucosídicos son susceptibles de ser degradados bajo condiciones ácidas o en presencia de ciertas enzimas, condiciones que se presentan en los sistemas digestivos de animales. Es por ello que, tras la ingesta de tejido vegetal contaminado, el BPA inalterado puede ser liberado para ser posteriormente asimilado por el organismo consumidor (Schmidt & Schuphan, 2002). De igual manera, es posible que exista presencia de metabolitos, cuyos posibles efectos sean desconocidos, derivados de la porción del contaminante que haya sido metabolizada mediante otras vías posiblemente no identificadas (Nakajima et al., 2002). Existen diversas plantas con una muy alta capacidad de asimilación, metabolización y translocación de BPA, ya sea por sí solas o en conjunto con una población bacteriana asociada como algunas variedades de *Enterobacter* sp. y de *Bacillus cereus* (Ferrara et al., 2006; Imai et al., 2007; Loffredo et al., 2010; Okuhata et al., 2010 y Saiyood et al., 2010). Es posible que una vez metabolizado, el compuesto sea indetectable en distintas partes del follaje de la planta aun cuando se haya encontrado en las raíces; de manera que la translocación puede presentarse aun si no se encuentra evidencia de ello (Nakajima et al., 2002; Ferrara et al., 2006; Loffredo et al., 2010 y Saiyood et al., 2010).

3.3.3 Naproxeno (NPX)

El NPX es un agente antiinflamatorio no esteroideo (NSAID, por sus siglas en inglés) de la familia de los ácidos α -arilpropiónicos con acción antipirética y analgésica. Al ser un medicamento cuya venta no requiere receta, se ha convertido en un analgésico de uso frecuente con dosis per cápita estimadas en 0.2-0.3 g/día/persona y mayores (Nakada et al., 2006). Introducido en 1976 por Syntex, su patente expiró en 1993 (Harrington & Lodewijk, 1997) y actualmente existe una gran variedad de presentaciones y formulaciones combinadas con otros fármacos producidas por diversos fabricantes en todo el mundo. Según datos de 15 países, en 2011, en promedio el 9.4% del mercado de los NSAID correspondía al NPX (McGettigan & Henry, 2013), alcanzando ventas por 18 millones de dólares, representando un incremento de 5% con respecto a 2010, según datos de Evaluate Ltd. Entre los NSAIDs más usados a nivel mundial el NPX es el medicamento con el menor riesgo de ocasionar enfermedades cardíacas (McGettigan & Henry, 2013). En una investigación realizada por Massó González et al. en 2010, se encontró que el NPX presenta riesgos medios (5.57%) de incidencia de sangrado y/o perforación del tracto gastrointestinal superior, por arriba del diclofenaco y el ibuprofeno usando dosis de 750, 100 y 1200 mg/día, respectivamente. En la Tabla 6 se presentan las propiedades fisicoquímicas correspondientes al NPX.

Tabla 6 - Propiedades fisicoquímicas, estructura y concentraciones del NPX.

Propiedades fisicoquímicas		Estructura ¹
Peso [g/mol]	230.26	
Presión de vapor a 25°C [Pa]	1.7E-4 ^a	
Solubilidad en agua a 25°C [mg/L]	15.9 ^a	
pKa	4.15 ^b	
logK _{ow}	3.18 ^b	
Concentraciones en suelos de cultivo y el agua residual con que son regados		
χ _{agua de riego Valle del Mezquital} [μg/L]	15.22 – 16.65 ^c 1.61 – 16.34 ^d	
χ _{agua de riego} [μg/L]	13 – 109 ^e 0.146 ^f 0.035 – 0.444 ^g	
χ _{suelo Valle del Mezquital} [ng/g]	0.55 – 0.73 ^h	
χ _{suelo} [ng/g]	-	
χ _{planta}	Variable según cultivo, órgano y condiciones, ver Tabla 9	

^a EPI Suite™ v4.11

^b Wu et al., 2012

^c Gibson et al., 2007

^d Chávez et al., 2011

^e Chen et al., 2011

^f Xu et al., 2009c

^g Calderón-Preciado et al., 2011a

^h Durán-Álvarez et al., 2009

¹ Sigma-Aldrich Co., Naproxeno

En el humano, el 80% del NPX ingerido es excretado a través de la orina y cerca de un 1.5% a través de las heces fecales después de ser extensamente metabolizado en el hígado y convertido en diversos glucurónidos, quedando menos de un 1% como el compuesto original (Davies y Anderson, 1997a). La vida media de eliminación del fármaco es de 17.7±3 horas en personas saludables y se puede incrementar en el caso de existir disfunciones renales (Anttila et al., 1980). Existe además la posibilidad de que en el caso de madres lactantes se presente una transferencia de NPX al infante a través de la leche materna (Davies y Anderson, 1997a).

3.3.3.1 NPX en agua

El NPX, al igual que otros fármacos y productos de cuidado personal, ingresan al ambiente principalmente a través del agua residual, previa excreción humana o disposición inadecuada de medicamentos (Bendz et al., 2005 y Nikolaou et al., 2007). En las plantas de tratamiento de agua residual, el NPX presenta remociones muy variables que van desde 0% hasta 100%, con varios autores coincidiendo en el rango de 40 a 70% (Ternes, 1998; Bendz et al., 2005; Fent et al., 2006 y Nakada et al., 2006). Tales remociones parecen deberse principalmente a la biodegradación del compuesto y no a la adsorción en los lodos (Quintana et al., 2005; Joss et al., 2006 y Kimura et al., 2007). En el agua superficial, el NPX es susceptible de ser fotodegradado (Packer et al., 2003; Lin & Reinhard, 2005 e Isidori et al., 2005) así como biodegradado de manera importante (Tixier et al., 2003 y Grenni et al., 2013); sin embargo, se ha visto que algunos de los productos de su fotodegradación son considerablemente más tóxicos para la flora y la fauna acuática que el compuesto original (Isidori et al., 2005). Las concentraciones a las cuales se han encontrado efectos de toxicidad crónica por NPX en organismos acuáticos son inferiores a los valores para la toxicidad aguda, sin embargo, en ambos casos la magnitud es muy variable (Isidori et al., 2005; Grenni et al., 2013).

3.3.3.2 *NPX en suelos*

La entrada de NPX al suelo se da a través del agua residual, cruda o tratada, y de la adición de biosólidos como fertilizante. Una vez en el suelo, el NPX es adsorbido en la fracción sólida, donde se presenta una correlación positiva importante entre el contenido de materia orgánica y el coeficiente de partición K_d (Xu et al., 2009a y Lin & Gan, 2011). La biodegradación es el principal mecanismo de disipación del contaminante en el suelo; su vida media depende, entre otros posibles factores, de la concentración adicionada y del contenido de arcillas y de materia orgánica en el suelo; pues, entre mayor sean dichos contenidos, más rápida y fuertemente es adsorbido el contaminante, limitando su biodisponibilidad. Cuando el contenido de carbono orgánico en el suelo es muy grande, los organismos degradadores degradan a NPX por vías de co-metabolismo, más que por el uso de este compuesto como fuente principal de carbono (Topp et al., 2008; Xu et al., 2009a y Monteiro & Boxall, 2010). Bajo condiciones de laboratorio, se ha visto que el NPX puede ser mineralizado hasta en un 50% en 27 días (Topp et al., 2008).

3.3.3.3 *NPX en plantas*

Bajo condiciones ambientales la mayor parte del compuesto se encuentra en su forma ionizada, dado su valor relativamente bajo de pK_a . Esto implica que su potencial de asimilación en las raíces, y su posterior transporte al resto de la planta, se puede ver limitado puesto que las moléculas ionizadas tardan más tiempo en penetrar diferentes tipos de membranas biológicas a causa de la repulsión que se presenta entre el anión y la membrana celular con carga negativa (Trapp, 2000; Trapp, 2009 y Wu et al., 2013). Una vez dentro de la planta, el NPX es susceptible de ser translocado a diferentes partes de ésta, pues se trata de un ácido débil y su hidrofobicidad, determinada por el parámetro $\log K_{ow}$, no es elevada y se reduce a medida que incrementa el pH del medio (Trapp et al., 2000; Calderón-Preciado et al., 2012 y Wu et al., 2013). Cabe aclarar que, aunque un suelo tenga un pH ligeramente ácido o neutro, las raíces de las plantas pueden exudar compuestos ácidos que disminuyen el pH en la rizósfera lo suficiente para incrementar la fracción no-ionizada de los compuestos ionizables como el NPX, facilitando así la penetración del compuesto en la planta (Calderón-Preciado et al., 2012). Existe evidencia que sugiere que el NPX puede ser metabolizado con cierta facilidad dentro de algunas plantas (Calderón-Preciado et al., 2012), lo cual podría explicar que se pueda encontrar contaminación en algunas plantas mientras que en otras, cultivadas bajo las mismas condiciones en el mismo lugar, no (Sabourin et al., 2012). Bajo condiciones de pH de la mayoría de los suelos, de ligeramente ácidos a neutras, existe cierto riesgo de bioacumulación de compuestos ácidos débiles como el NPX en diferentes partes de la planta así como en hojas y frutos (Trapp, 2009). Por otra parte, en diferentes vegetales puede predominar la acumulación preferencial en las raíces (Wu et al., 2013). Finalmente, resulta importante que, al igual que en el caso del BPA, dependiendo de los procesos metabólicos mediante los cuales se transforme el NPX, los cuales a su vez varían entre diferentes especies vegetales, éste puede estar más o menos biodisponible en niveles más altos de las cadenas tróficas (Coleman et al., 1997 y Calderón-Preciado et al., 2012).

3.3.4 Ibuprofeno (IBU)

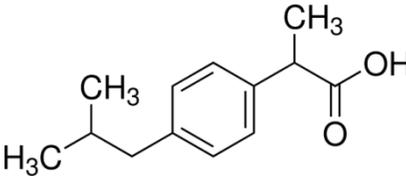
El IBU, antiinflamatorio no esteroideo con acción antipirética y analgésica, ocupa el segundo lugar en ventas de dicho tipo de fármacos, según un estudio realizado en 15 países (McGettigan & Henry, 2013), con una participación promedio de 11%, por debajo del diclofenaco. Desde 1983 fue aprobado como un medicamento de venta libre en el Reino Unido y, posteriormente en 1984, en EUA.

El IBU fue descubierto en el Reino Unido en 1961 tras un esfuerzo de casi una década por encontrar un medicamento sin los efectos gastrointestinales de la aspirina y sin los peligros de los corticoesteroides y la fenilbutazona, siendo éstos los principales fármacos antiinflamatorios utilizados en el momento, para el tratamiento de la artritis reumatoide (Adams, 2007 y Rainsford, 2011). Se ha comercializado desde 1969 y actualmente se venden formulaciones junto con otros fármacos y es manufacturado por diferentes empresas a nivel mundial, habiendo expirado la patente a mediados de los años ochenta.

Según un estudio publicado en 2000 (Sinclair et al., 2000), el IBU se utiliza generalmente para dolores de espalda y articulaciones así como dolores de cabeza y migraña, también se utiliza para dolores menstruales y derivados de lesiones, entre otros. Dadas sus propiedades antipiréticas, se utiliza también para controlar fiebres. Con frecuencia este fármaco se utiliza por periodos prolongados en caso de dolores crónicos como los derivados de desórdenes reumáticos. Según el mismo estudio de McGettigan & Henry de 2013, IBU presenta mayor riesgo de incidencia de complicaciones cardíacas que el NPX pero menor que el diclofenaco y, según el estudio de González et al. (2013), el IBU es, de los NSAID tradicionales, el que menor riesgo de sangrado y/o perforación del tracto gastrointestinal superior presenta (2.69%), debido principalmente a las dosis bajas generalmente utilizadas.

Tras la ingesta, entre ~0 y 15% de la dosis ingerida es excretada como el compuesto inalterado mientras que alrededor del 69% es excretada como metabolitos (Weigel et al., 2004). En la Tabla 7 se presentan la propiedades fisicoquímicas correspondientes al IBU.

Tabla 7 - Propiedades fisicoquímicas, estructura y concentraciones del IBU.

Propiedades fisicoquímicas		Estructura ^c
Peso [g/mol]	206.28	
Presión de vapor a 25°C [Pa]	6.3E-3 ^a	
Solubilidad en agua a 25°C [mg/L]	21 ^b	
pKa	4.91 ^c	
logK _{ow}	3.97 ^c	
Concentraciones en suelos de cultivo y el agua residual con que son regados		
χ _{agua de riego Valle del Mezquital} [μg/L]	4.38 – 5.09 ^d 0.68 – 4.7 ^e	
χ _{agua de riego} [μg/L]	0.2 – 0.48 ^f 1.15 ^g 0.011 – 0.303 ^h <0.7 – 4.06 ⁱ	
χ _{suelo Valle del Mezquital} [ng/g]	0.25 ^j	
χ _{suelo} [ng/g]	<3.72 – 318.5 ^k	
χ _{planta}	Variable según cultivo, órgano y condiciones, ver Tabla 9	

^a Daubert y Danner, 1989

^b EPI Suite™ v4.11

^c Wu et al., 2012

^d Gibson et al., 2007

^e Chávez et al., 2011

^f Chen et al., 2011

^g Xu et al., 2009c

^h Calderón-Preciado et al., 2011a

ⁱ Karnjanapiboonwong et al., 2011

^j Durán-Álvarez et al., 2009

^k Sigma-Aldrich Co., Ibuprofeno

3.3.4.1 IBU en agua

El IBU, al igual que otros fármacos, ingresa al agua principalmente por la excreción del fármaco tras la ingesta y por una inadecuada disposición de fármacos caducos. En las plantas de tratamiento de agua residual, el IBU tiene buenas remociones, generalmente superiores al 90% (Ternes, 1998; Bendz et al., 2005; Fent et al., 2006 y Nakada et al., 2006). El principal mecanismo de remoción en los sistemas convencionales de tratamiento de agua residual parece ser la biodegradación y no la adsorción en los lodos, según investigaciones de Jones et al. (2006). Se ha observado que el IBU en agua es poco susceptible de ser fotodegradado, con vidas medias que van desde 15 hasta las 9900 horas (Lin & Reinhard, 2005 y Yamamoto et al., 2009). Igualmente, se ha visto que se requiere de una micro-biota adaptada al compuesto para posibilitar su biodegradación puesto que, de lo contrario, se puede mantener estable con vidas medias de 450 a 480 horas (Yamamoto et al., 2009). Sin embargo, una vez adaptada la micro-biota, la biodegradación es rápida y extensa (Löffler et al., 2005). Se ha visto que el IBU permanece principalmente en solución, no presentando remociones importantes por asociación con los sedimentos, lo cual se debe a que comúnmente se encuentra ionizado y tiende a permanecer en la fase acuosa (Löffler et al., 2005; Jones et al., 2006 y Yamamoto et al., 2009).

3.3.4.2 IBU en suelos

El IBU presenta baja afinidad por la fracción sólida del suelo, por lo cual se espera que se encuentre móvil y biodisponible (Xu et al., 2009 a y b y González-Naranjo et al., 2013). En suelo, el IBU ha mostrado ser fácilmente biodegradable, con vidas medias de entre 0.91 y 6.09 días en distintos suelos. Igual que para el NPX, se ha encontrado una correlación negativa entre el

contenido de arcilla y de materia orgánica del suelo y la velocidad a la cual se desarrolla la biodegradación del compuesto, lo cual se puede explicar por una mayor sorción en suelos con mayores contenidos de arcilla y materia orgánica; consecuentemente, el compuesto presenta una menor biodisponibilidad (Xu et al., 2009a). El principal mecanismo de remoción del IBU en el suelo es la biodegradación, según experimentos de Xu et al. (2009a), quienes midieron la vida media del compuesto en un suelo estéril y otro sin esterilizar.

3.3.4.3 IBU en plantas

Al ser un ácido con un valor de pK_a bajo, al igual que el NPX, su asimilación se ve poco favorecida por encontrarse generalmente ionizado a los valores de pH que se esperaría encontrar en suelos cultivables. Sin embargo, mediante estudios de campo y en invernadero, se ha encontrado evidencia que sugiere que en sitios regados con agua residual, cruda o tratada, es posible encontrar asimilación de IBU en el tejido vegetal en diferente magnitud según la planta de la que se trate (Calderón-Preciado et al., 2011b y 2013). Esta diferente capacidad de asimilación se ha visto también en cultivos celulares de diferentes especies en los cuales además se observó un mayor porcentaje de remoción del compuesto de la solución del cultivo conforme menor fue la concentración inicial (Kotzya et al., 2010).

Por otra parte, en experimentos de fertilización con biosólidos bajo condiciones controladas semejantes a las de campo, se ha visto que el IBU no tiende a ser asimilado ni cuando se exceden las dosis recomendadas de fertilización y el contaminante queda en concentraciones altas comparadas con las encontradas en el Valle del Mezquital (Durán-Álvarez et al., 2009 y Cortés et al., 2013).

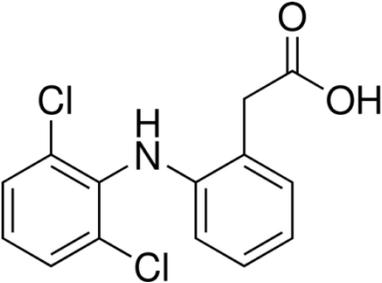
3.3.5 Diclofenaco (DIC)

El DIC, al igual que el NPX y el IBU, es un antiinflamatorio no esteroideo, en este caso de la familia de los ácidos fenilacéticos (Davies & Anderson, 1997b). Se utiliza como analgésico de uso prolongado para enfermedades artríticas y para el tratamiento de dolores musculoesqueléticos agudos y postoperatorios, así como para los dolores menstruales (Brogden et al., 1980). Tras su ingesta, menos del 1% es excretado en su forma inalterada en la orina (Kirchheiner et al., 2003).

De particular interés a nivel internacional ha sido el caso de la severa disminución en la población de buitres en el sur de Asia, derivada de la intoxicación y muerte de los animales por afectaciones del sistema renal tras la ingesta de cadáveres de ganado ungulado al cual se le administró DIC como tratamiento para condiciones reumáticas (Oaks et al., 2004). A raíz de esto, en 2006 se prohibió la producción, venta e importación de DIC veterinario en India, Nepal y Pakistán, gracias a lo cual se ha visto un repunte en la población de diversas especies de buitres en la zona (Cuthbert et al., 2011; Ogada et al., 2012).

Según el estudio realizado por McGettigan & Henry en 2013, el DIC es, junto con otros fármacos llamados rofecoxib y etoricoxib, el NSAID con más alto riesgo de causar complicaciones cardiovasculares; sin embargo, según González et al. (2010), presenta un riesgo intermedio (3.98%, entre el IBU y el NPX) de desarrollar problemas del tracto gastrointestinal. En la Tabla 8 se presentan las propiedades fisicoquímicas del DIC.

Tabla 8 - Propiedades fisicoquímicas, estructura y concentraciones del DIC.

Propiedades fisicoquímicas		Estructura ^h
Peso [g/mol]	296.15	
Presión de vapor a 25°C [Pa]	8.19E-6 ^a	
Solubilidad en agua a 25°C [mg/L]	2.37 ^a	
pKa	4.15 ^b	
logK _{ow}	4.51 ^b	
Concentraciones en suelos de cultivo y el agua residual con que son regados		
χ _{agua de riego Valle del Mezquital} [μg/L]	1.72 – 6.36 ^c 1.22 – 3.77 ^d	
χ _{agua de riego} [μg/L]	0.064 – 0.269 ^e	
	0.112 ^f	
χ _{suelo Valle del Mezquital} [ng/g]	-	
χ _{suelo} [ng/g]	-	
χ _{planta}	Variable según cultivo, órgano y condiciones, ver Tabla 9	

^a EPI Suite™ v4.11

^b Wu et al., 2012

^c Gibson et al., 2007

^d Chávez et al., 2011

^e Chen et al., 2011

^f Xu et al., 2009c

^g Calderón-Preciado et al., 2011a

^h Sigma-Aldrich Co., Diclofenaco

3.3.5.1 DIC en agua

En las plantas de tratamiento de agua residual, el DIC es removido en concentraciones de medias a bajas, en el rango de 21-40% en la mayoría de los casos, presentándose valores extremos de remoción de 0% y ligeramente superiores al 80% (Clara et al., 2005; Zhang et al., 2008 y Kosma et al., 2014), su principal mecanismo de remoción es la biodegradación (Kosjek et al., 2009). Se ha visto que en condiciones oxidantes, la degradación del DIC es mínima mientras que se tienen mejores resultados en condiciones anóxicas, ello puede deberse en parte a la presencia de átomos de cloro en la estructura del DIC, rasgo que comparte con el ácido clofíbrico (CFA), otro compuesto que presenta también remociones bajas debidas a una escasa afinidad por la fracción sólida y a una reducida biodegradabilidad (Zwiener et al., 2000; Zwiener & Frimmel, 2003 y Kosjek et al., 2007). Las mayores remociones se han presentado cuando se adicionan compuestos coagulantes como las sales de hierro y aluminio dada la sorción a la fracción sólida del lodo y su posterior remoción mediante coagulación-floculación (Carballa et al., 2005).

En agua superficial, se ha observado que la adsorción a sedimentos representa una mínima parte de la remoción total y es prácticamente despreciable. También se ha encontrado que la biodegradación es posible y puede ser un mecanismo importante siempre que estén presentes los grupos específicos de microorganismos capaces de degradar al compuesto (Buser et al., 1998 y

Gröning et al., 2007). Sin embargo, diversas investigaciones han demostrado que la principal vía de remoción es la fotodegradación (Buser et al., 1998; Packer et al., 2003 y Tixier et al., 2003), la cual, evidentemente, es mayor en la zona más próxima a la superficie de los cuerpos de agua (Poiger et al., 2001).

3.3.5.2 DIC en suelos

La adsorción del DIC en la fracción sólida del suelo es moderada y parece estar mediada principalmente por el contenido de materia orgánica, tanto del suelo como del agua de riego puesto que, al ser considerablemente hidrófobo, la presencia de materia orgánica suspendida y/o disuelta en el agua, disminuye la proporción del fármaco que se asocia a la fracción sólida del suelo (Chefetz et al., 2008). Dicha dependencia de la presencia de materia orgánica en el suelo también implica que su percolación profunda se reduce substancialmente en suelos con altos contenidos de carbono orgánico. Por otra parte, se ha visto que el contenido de arcillas juega un papel menos relevante en la retención del DIC en la matriz suelo (Gibson et al., 2010). Comparativamente, el DIC es el compuesto con menor movilidad de los tres NSAID propuestos para este trabajo, ello implica también que es razonable esperar que sea el menos propenso a ser asimilado dentro de la matriz vegetal por encontrarse, en principio, menos biodisponible.

En el suelo, el DIC es degradado con relativa facilidad, presentando pérdidas de entre 29 y 100% de las dosis aplicadas en distintos experimentos con distintos tipos de suelo (Xu et al., 2009b; Al-Rajab et al., 2010 y Gibson et al., 2010). De estas pérdidas, la evidencia sugiere que la mayor parte se deben a la biodegradación del compuesto (Xu et al., 2009d y Lin & Gan, 2011), la cual logró una completa mineralización de cerca del 50% del ¹⁴C-DIC adicionado en un estudio hecho por Al-Rajab et al. (2010). Sin embargo, y contrario a su comportamiento en el agua residual en PTAR, se ha visto que en condiciones anaerobias en el suelo, el DIC puede permanecer inalterado por tiempos muy prolongados (Lin & Gan, 2011).

3.3.5.3 DIC en plantas

Se ha visto que, en algunos casos, diversas plantas tienen una menor capacidad de asimilar DIC que otros fármacos como el IBU (Kotyza et al., 2010). Diversas investigaciones sugieren que el DIC es mínimamente susceptible de ser asimilado en la matriz vegetal debido a su presencia en forma ionizada a valores de pH neutros, ésta puede ser la principal razón de su escasa asimilación en cultivos hidropónicos en los que la solución hidropónica tenía un valor de pH de 6.5 (Wu et al., 2012 y 2013). Por otra parte, en cultivos realizados en suelo, su reducida asimilación se puede deber a que la fracción neutra puede tender a permanecer asociada a la materia orgánica del suelo ($K_{ow} = 4.51$, en el extremo superior del rango ideal) mientras que la fracción soluble se encuentra ionizada y es repelida por las células de la raíz dada su carga negativa (Calderón-Preciado et al., 2011 y 2013). Asimismo, en experimentos de fertilización realizados con biosólidos, bajo condiciones controladas semejantes a las de campo, se ha encontrado que el DIC no tiende a ser asimilado ni cuando se exceden las dosis recomendadas de fertilización y el contaminante

queda en concentraciones altas comparadas con las encontradas en el Valle del Mezquital (Durán-Álvarez et al., 2009 y Cortés et al., 2013). Finalmente, se ha observado que la escasa proporción del fármaco que logra ser asimilada por las raíces, tiende a permanecer en ellas y no presenta translocación hacia otras partes del tejido vegetal (Tanoue et al., 2012 y Wu et al., 2013).

3.4 Técnicas analíticas

Actualmente, no existe una metodología establecida de muestreo, procesamiento y análisis para la determinación de micro-contaminantes en matriz vegetal (Matamoros et al., 2012) aunque existen casos en los que se han seguido métodos de análisis estandarizados para otras matrices como el suelo (Sabourin et al., 2012). La metodología de análisis de muestras ambientales comprende todos los pasos desde la toma de muestras hasta el análisis mediante alguna técnica con la finalidad de determinar una respuesta específica del analito de interés en la matriz a estudiar. En la Tabla 9 se encuentran, detalladas brevemente, diversas técnicas analíticas usadas para la determinación de micro-contaminantes orgánicos en matriz vegetal. La selección de las técnicas mostradas aquí se basó en dos criterios: a) que dentro de los compuestos que analizan se encontraran los compuestos de interés del presente trabajo, o b) que la naturaleza de los procedimientos que utilizan fuera de interés para el desarrollo de un método de extracción y cuantificación de micro-contaminantes orgánicos en matriz vegetal.

3.4.1 Muestreo

El procedimiento de toma de muestras depende en gran medida de la finalidad del estudio. En muchos casos, todo el trabajo se realiza bajo condiciones controladas con el objetivo de determinar niveles potenciales de asimilación de los micro-contaminantes, dadas las condiciones experimentales establecidas (Brown et al., 2009; Saiyood et al., 2010; Calderón-Preciado et al., 2012; Gatullo et al., 2012 y Tanoue et al., 2012), o bien, con el único propósito de desarrollar una metodología de extracción y cuantificación de los analitos (Calderón-Preciado et al., 2009). En otros casos se persiguen ambos objetivos (Petersen et al., 2003 y Wu et al., 2012). Finalmente, existen investigaciones en las cuales el trabajo se realiza con muestras obtenidas de cultivos que se han desarrollado bajo condiciones no controladas en campo, invernadero o en laboratorio, con la finalidad de evaluar la asimilación y efectos de los micro-contaminantes bajo condiciones de campo o próximas a las del campo, a fin de determinar, independientemente del potencial de asimilación, las cantidades que realmente se podrían encontrar en los cultivos según las prácticas agrícolas utilizadas para su producción (Petersen et al., 2003; Calderón-Preciado et al., 2011b; Sabourin et al., 2012 y Cortés et al., 2013).

En cualquier caso, la toma de muestras debe ser lo más representativa posible, para ello resulta recomendable tomarlas aleatoriamente de entre una población. Para su preservación se recomienda la refrigeración y para minimizar el riesgo de degradación de los compuestos se recomienda también analizar las plantas lo más pronto posible (Matamoros et al., 2012).

3.4.2 Pretratamiento del tejido vegetal y preparación de muestra

En general, todas las técnicas analíticas incluyen una etapa de pretratamiento de la muestra. Una de las primeras actividades en este paso suele ser la limpieza de la planta, para evitar una sobreestimación en las mediciones a causa de los analitos que pudieran estar en la suciedad o tierra pegada a la planta. Dicha limpieza generalmente se realiza mediante el enjuague con agua, corriente y/o destilada, y, en algunos casos, con algún solvente como metanol (MeOH) para remover tierra y suciedad (o solución en el caso de los cultivos hidropónicos), de los tejidos a analizar, particularmente cuando se trata del radicular (Markert, 1995).

Posteriormente, se divide la planta en diferentes partes según la finalidad del estudio; en general, esta separación considera la parte aérea y la radical, esta última en muchas ocasiones no se analiza. Separaciones más detalladas pueden incluir la separación de la parte aérea en hojas y tallos e incluso frutos y/o semillas, según sea el caso.

A continuación, el pretratamiento de la matriz suele continuar con un secado cuya finalidad es proteger al material y los analitos de la biodegradación y obtener un punto de referencia constante mediante la medición del peso seco (Markert, 1995). Dos de los métodos más utilizados son la liofilización (Bokern et al., 1998; Imai et al., 2007; Sjöström et al., 2008; Brown et al., 2009 y Wu et al., 2012) y el secado en horno (Doucette et al., 2005; Ferrara et al., 2006; Saiyood et al., 2010; Winker et al., 2010 y Cortés et al., 2013). En algunos casos se maneja la muestra húmeda (Nakajima et al., 2002 y Tanoue et al., 2012) mientras que en otros la humedad de la muestra se retira mediante la aplicación de substratos absorbentes como la tierra diatomácea (Calderón-Preciado et al., 2009). En el secado en horno es importante cuidar que la temperatura no exceda aquella a la cual se degradan los compuestos; 40°C es un valor comúnmente utilizado y que se encuentra por debajo del punto a partir del cual los compuestos son inestables (Lin et al., s.f.; Tudja et al., 2001; Font et al., 2008; Sovizi, 2010; Tita et al., 2011 y Zayed et al., 2012).

Posteriormente, la matriz a analizar suele ser homogeneizada y conminuída. Uno de los principales objetivos de la homogeneización y conminución es producir una muestra representativa con una distribución uniforme de los analitos. Este paso puede ser una fuente de contaminación cruzada si no se tiene el cuidado de limpiar los implementos requeridos antes de utilizarlos (Markert, 1995); sin embargo, es indispensable si se desea obtener una buena extracción ya que de esta manera se incrementa la superficie de contacto entre la planta y los disolventes, minimizando la proporción de analito que pudiera quedar retenida en la muestra por obstrucción física al momento de la extracción. La conminución generalmente se hace a través de métodos convencionales, como el corte del tejido y la conminución con mortero o procesador de alimentos (Nakajima et al., 2002; Ferrara et al., 2006; Sjöström et al., 2008; Calderón-Preciado et al., 2009; Saiyood et al., 2010; Winker et al., 2010; Li et al., 2011; Matamoros et al., 2012; Sabourin et al., 2012; Tanoue et al., 2012; Wu et al., 2012 y Cortés et al., 2013).

La preparación de muestra depende del método de extracción a utilizar; por ejemplo, cuando se utilizan métodos como la agitación en solvente, la extracción Soxhlet o la extracción asistida con ultrasonido (Bokern et al., 1998; Nakajima et al., 2002; Petersen et al., 2003; Ferrara et al., 2006; Imai et al., 2007; Tanoue et al., 2012 y Wu et al., 2012), basta con introducir la muestra en los solventes tras el secado y la conminución. En algunas ocasiones, la muestra incluso puede manejarse húmeda (Lu et al., 2013). Por otra parte, cuando se utilizan técnicas como la extracción por líquidos presurizados o fluidos supercríticos, generalmente la muestra se homogeneiza con diversos substratos con la finalidad de evitar su apelmazamiento y la aparición de flujos preferenciales a través de la matriz o la retención de interferencias (Aguilera et al., 2005; Tanaka et al., 2007; Calderón-Preciado et al., 2009 y Cortés et al., 2013). Otra estrategia para la preparación de muestras ampliamente usada es la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD, por sus siglas en inglés) que consiste en dispersar la matriz a analizar sobre la superficie de un sorbente sólido (Florisol, tierra diatomácea, arena sílica, C18 depositado en sílica etc.) a través de su homogeneización con mortero y pistilo. En este proceso, el sorbente funciona como un abrasivo que, con los esfuerzos cortantes y normales que generan, destruyen la estructura de la matriz y la depositan en la superficie del sorbente, incrementando considerablemente el área superficial durante la extracción (Ling & Huang, 1995; Viana et al., 1996; Barker, 2007 y Calderón-Preciado et al., 2009). Estas metodologías de preparación de muestras requieren de la utilización de implementos adicionales en los cuales podrían quedar retenidos analitos, lo cual implica un mayor riesgo de contaminación cruzada y que es necesaria una limpieza exhaustiva que garantice la completa remoción de cualquier compuesto en el instrumental de laboratorio antes de preparar la siguiente muestra. Este paso puede resultar complicado y derivar en el consumo de una gran cantidad de solventes y un mayor tiempo de ejecución.

3.4.3 Extracción

3.4.3.1 Técnicas

Existen diferentes técnicas de extracción de compuestos orgánicos en matrices sólidas que hacen uso de métodos convencionales y modernos por igual así como combinaciones de ambos.

La inmersión en solventes y subsecuente agitación por tiempos prolongados sigue siendo una práctica común (Okuhata et al., 2010; Saiyood et al., 2010; Winker et al., 2010 y Gatullo et al., 2012) así como la extracción Soxhlet (Petersen et al.; 2003 y Li et al., 2011). Dichas técnicas generalmente requieren muchas horas para realizar la extracción y tienen un alto consumo de solventes.

Técnicas más rápidas han sido desarrolladas aprovechando equipos modernos cuyo funcionamiento se basa en el incremento en la tasa de difusión y la solubilidad derivados del incremento en la temperatura de los solventes utilizados y la presión a la que se realiza la extracción (Brown et al., 2009; Calderón-Preciado et al., 2009 y Cortés et al., 2013). Esta técnica se conoce como extracción con fluidos/líquidos presurizados (PFE y PLE, respectivamente) o

extracción acelerada con solventes (ASE, por sus siglas en inglés). Al incrementar la temperatura del solvente y la matriz, se altera el equilibrio entre la matriz y el soluto; este incremento disminuye la viscosidad del solvente y mejora su penetrabilidad en la matriz. Por otra parte, un incremento substancial en la presión a la que se efectúa el proceso permite mantener los solventes en fase líquida muy por encima de su temperatura de ebullición. Otra variante en la cual se utilizan la presión y la temperatura para alterar las propiedades de los extractantes es la extracción con fluidos supercríticos (SFE, por sus siglas en inglés) en la cual la temperatura y presión a las que se encuentra el extractante están por arriba de sus valores críticos, lo cual le confiere propiedades físicas que se encuentran entre las del gas y las del líquido, particularmente una menor viscosidad y mayor difusividad así como la posibilidad de variar su densidad ajustando la temperatura y la presión, lo cual altera la capacidad extractora del disolvente y permite extracciones más selectivas (Camel, 2001 y Aguilera et al., 2005). Otros métodos modernos de extracción se apoyan en el uso del ultrasonido (Schmidt & Schuphan, 2002; Sabourin et al., 2012; Tanoue et al., 2012; Wu et al., 2012 y Lu et al., 2013), el cual permite un mezclado intensivo y exhaustivo del solvente y la matriz mediante el suministro de energía a través de ultrasonido (Webster, 2006). Este procedimiento puede llegar a desintegrar las células mediante el fenómeno de cavitación (Hielscher Ultrasonics GmbH, 2014). Estas técnicas contemporáneas tienen como resultado extracciones más rápidas, con menor volumen de solventes y mayores recuperaciones empleando cantidades menores de muestra. Otros beneficios asociados a la utilización de equipos modernos es la posibilidad de automatizar la extracción, en particular la extracción acelerada con solventes puede automatizarse con relativa facilidad, incluyendo un paso de limpieza *in-line* (dentro de la misma celda de extracción o inmediatamente después sin la necesidad de manipulación por parte del operador). Esto permite obtener extractos más limpios que, en algunas ocasiones, es posible suministrar sin limpieza adicional a los equipos de análisis (Aguilera et al., 2005; Dionex Corporation, 2007; Tanaka et al., 2007 y Calderón-Preciado et al. 2009).

3.4.3.2 Solventes

La elección de los solventes en los procesos de extracción obedece a las características de los analitos que se desea extraer y a la técnica de extracción por utilizar.

En las técnicas que utilizan solventes líquidos (agitación, PLE, PFE, ASE, Soxhlet y ultrasonido) se utilizan solventes con diversos grados de polaridad, según la polaridad e hidrofiliidad de los analitos por extraer, así como la especiación esperada del compuesto, como en el caso de los compuestos ionizables como los fármacos. En el caso de la SFE se utiliza principalmente CO₂ por sus bajas constantes críticas, reducidas reactividad y toxicidad, y bajo costo económico (Aguilera et al., 2005). Actualmente, existen técnicas que, buscando ser más amigables con el ambiente y reducir el consumo de solventes orgánicos, utilizan agua como extractante (Doucette et al., 2005 y Cortés et al., 2013).

3.4.4 Concentración y purificación

En general, resulta imposible hacer una extracción específica del analito de interés, es decir, al extraer una matriz sólida se arrastran una serie de impurezas que son más predominantes que el analito. Por ello, es indispensable contar con un proceso de limpieza de la muestra antes de pasar a la etapa de análisis (Menkissoglu-Spiroudi & Fotopoulou 2004). En términos generales, los volúmenes obtenidos en la extracción suelen ser muy grandes comparados con el volumen a analizar y, estando los micro-contaminantes a concentraciones muy bajas, es necesario concentrarlos para posibilitar su correcta detección y cuantificación. En algunos casos, es posible realizar ambas tareas en un solo proceso. Existen diversas opciones aplicables para la purificación y concentración de los extractos en función de las características fisicoquímicas de los analitos y los extractos que se manipulan.

La concentración del extracto se realiza generalmente con calor o con nitrógeno (N_2) y en ocasiones puede estar asistida por una presión negativa o vacío. En algunos casos, los solventes orgánicos se evaporan a sequedad y posteriormente los analitos son resuspendidos en un volumen determinado de otro solvente. Esto permite tener un mayor control sobre la concentración pero también hace posible pasar los analitos a un solvente afín a la técnica que se utilizará para la manipulación de los extractos o directamente para la detección y cuantificación (Nakajima et al., 2002; Ferrara et al., 2006; Gibson et al., 2007; Imai et al., 2007; Durán-Álvarez et al., 2009 y Wu et al., 2012).

La purificación de la muestra consiste en eliminar las posibles interferencias que contiene la matriz, para ello existe gran variedad de técnicas. Una técnica de purificación aplicable antes de la extracción es la MSPD, discutida en el apartado 3.4.2 «Pretratamiento del tejido vegetal y preparación de la muestra». Mediante esta técnica, según la fase de soporte elegida, es posible remover parcialmente interferencias como clorofila y lípidos (Ling & Huang, 1995; Viana et al., 1996 y Calderón-Preciado et al., 2009). Tras la extracción, uno de los primeros pasos de limpieza es remover el material en suspensión o partículas de gran tamaño, mediante un filtrado o una centrifugación, y la subsecuente recuperación del sobrenadante (Ferrara et al., 2006; Sjöström et al., 2008 y Lu et al., 2013). En algunos casos, la filtración se hace inmediatamente antes del análisis. Una técnica tradicional de purificación es la extracción líquido-líquido, mediante la cual se pueden hacer limpiezas como el desgrasado y despigmentado; a través de este método, las grasas y los pigmentos se asocian a un solvente orgánico (Tanoue et al., 2012). Mediante la extracción líquido-líquido, también es posible remover el agua de la fase orgánica que contiene a los analitos, (Gibson et al., 2007; Durán-Álvarez et al., 2009 y Lu et al., 2013). En la extracción líquido-líquido se hace uso de las propiedades de los compuestos como son su potencial de ionización a diferentes valores de pH, para forzar a los analitos a asociarse a la fase que se desea.

Un método ampliamente utilizado para la limpieza de los extractos es la extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés). Esta es una técnica semi-cromatográfica con la cual es posible realizar la limpieza y el fraccionamiento de los analitos de las siguientes maneras (Figura 7):

- Retención de impurezas en el cartucho (extracción selectiva)
- Retención de analitos e impurezas en el cartucho
 - Lavado de impurezas y retención de analitos (lavado selectivo)
 - Elución de analitos y retención de impurezas (elución selectiva)
 - Elución selectiva en varios pasos para obtener diferentes fracciones con analitos de diferentes propiedades y procesarlas según se requiera

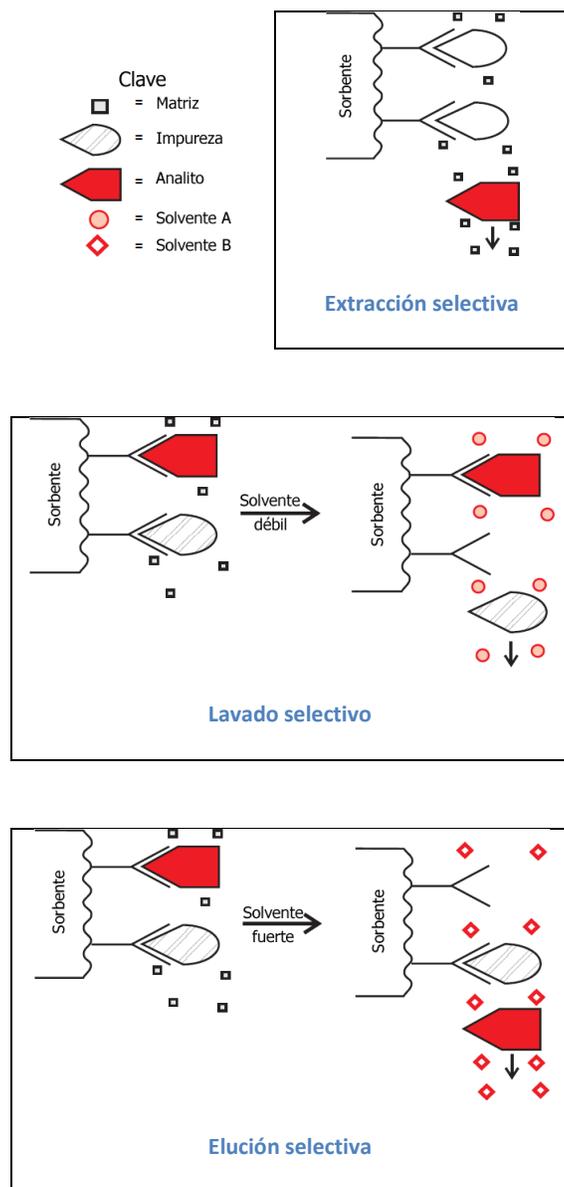


Figura 7 - Técnicas básicas de SPE. Adaptado de Sigma-Aldrich Co., 1998.

Existen diferentes tipos de fases sólidas para esta técnica de extracción (fase normal, fase reversa, fase de intercambio iónico, fase adsorptiva y fase polimérica balanceada), las cuales son capaces de retener impurezas y analitos de diversa naturaleza disueltos en fases móviles acuosas, orgánicas o mixtas y en diferentes rangos de pH. Los principales mecanismos mediante los cuales los analitos y las impurezas son retenidos en la fase estacionaria son las interacciones polares y no-polares y las interacciones iónicas. La preponderancia de unos sobre otros depende de la fase móvil que se utilice, su polaridad y pH, así como la especiación de los analitos y las impurezas en la solución (Sigma-Aldrich Co., 1998 y Żwir-Ferenc & Biziuk, 2006); de esta manera, diferentes fases sólidas pueden retener a diferentes compuestos (Schenck et al., 2002). La SPE permite no solo purificar los analitos sino también hacer una concentración de los mismos cuando entran disueltos en grandes volúmenes de muestra y posteriormente se eluyen con volúmenes pequeños de solvente (Balinova et al., 2007 y Gibson et al., 2007).

Para muestras con un alto contenido de interferencias, como los extractos vegetales, varios pasos de purificación pueden ser necesarios a fin de lograr una correcta detección y cuantificación de los analitos (Viana et al., 1996; Calderón-Preciado et al., 2009; Winker et al., 2010 y Li et al., 2011). De particular interés es la utilización de varias fases distintas para SPE; es decir, la utilización de dos cartuchos en tándem a través de los cuales percola la solución de manera secuenciada (Jacobsen et al., 2004; Pang et al., 2006 y Redshaw et al., 2008) o captando el eluato de un cartucho y haciéndolo percolar por otro u otros (Pang et al., 2006 y Balinova et al., 2007), por lo que en el primer cartucho se lleva a cabo una extracción selectiva y en los siguientes, una elución o extracción selectiva. La aplicación de varias fases de SPE se puede hacer con cartuchos monofásicos o multifásicos (Balinova et al., 2007 y González-Rodríguez et al., 2008).

3.4.5 Separación y detección

En las investigaciones sobre la presencia y destino de micro-contaminantes en el ambiente se han utilizado muy variadas técnicas analíticas para la detección y cuantificación. La selección de las técnicas suele estar relacionada con distintos factores, por una parte se encuentra el objetivo del estudio y los métodos utilizados, por otro, las características fisicoquímicas de los analitos, y, finalmente, el aspecto económico.

3.4.5.1 Separación

La mayoría de las técnicas analíticas se apoyan en alguna de las modalidades de la cromatografía para la separación de los compuestos de la matriz. Técnicas menos recientes aun hacían uso de la cromatografía en capa fina (Bokern et al., 1998); sin embargo, actualmente las técnicas contemporáneas, en su mayoría, hacen uso de la cromatografía de gases (GC) y de líquidos (LC, HPLC, UPLC). La elección de una sobre otra generalmente obedece a la volatilidad, polaridad y termolabilidad de los analitos, lo cual implica que los compuestos analizables por cromatografía de gases son aquellos con pesos moleculares inferiores a 1000 unidades, estables a las temperaturas manejadas en el equipo y no-polares. Existen técnicas que analizan compuestos relativamente

incompatibles con la GC (Gibson et al., 2007; Calderón-Preciado et al., 2009; Durán-Álvarez et al., 2009 y Lu et al., 2013), para lo cual se apoyan en la derivatización de los analitos, a fin de mejorar sus características fisicoquímicas y hacerlos más compatibles con la GC. Esto representa una opción económicamente viable para el análisis de muestras ambientales puesto que la LC tiene costos asociados mucho más elevados que la GC (Calderón, 2012).

3.4.5.1.1 Derivatización

La derivatización consiste en la modificación de diversos grupos funcionales en las moléculas con la finalidad de (Sigma-Aldrich, 1997):

- Mejorar la resolución y reducir el coqueo de los picos cromatográficos a través de una reducción en la polaridad de la molécula
- Aumentar la volatilidad de los analitos
- Mejorar la eficiencia analítica e incrementar la detectabilidad
- Incrementar la estabilidad de los compuestos (i.e. reducir la termolabilidad)

Al realizar estas modificaciones en algunos analitos previamente incompatibles con la GC, estos se vuelven separables con esta técnica.

Existen diversos agentes derivatizantes cuya selección obedece al tipo de grupo funcional por derivatizar. Las principales reacciones de derivatización son la sililación, la alquilación y la acilación. La alquilación consiste en substituir el átomo de hidrógeno (H) de un grupo funcional por un grupo alquilo, reduciendo la polaridad de la molécula. La sililación consiste en la substitución de un H activo por un grupo silil, reduciendo la polaridad y la capacidad de formar puentes de hidrógeno. Mediante esta técnica también se reduce la termolabilidad de los compuestos y se mejora su detección. La acilación consiste en convertir los compuestos con un hidrógeno activo dentro de la molécula en amidas, ésteres y tioésteres más estables que derivados obtenidos por otros métodos. Algunas reacciones de derivatización requieren realizarse en presencia de catalizadores (Sigma-Aldrich, 1997; Zakin y Haket, 2009). La derivatización se puede realizar en diferentes etapas del procesamiento, ya sea como un paso previo a la inyección en el cromatógrafo o durante la misma inyección (Calderón-Preciado et al., 2009).

3.4.5.2 Detección

Se han utilizado diversos detectores para el análisis de micro-contaminantes en matriz vegetal, desde detectores elementales o de estructura y de grupo funcional básicos, como el de captura de electrones (ECD, por sus siglas en inglés), el de ionización de llama (FID, por sus siglas en inglés), el de nitrógeno/fósforo (NPD, por sus siglas en inglés) o el fotométrico de llama (FPD, por sus siglas en inglés), hasta el de espectrometría de masas en tándem (MS/MS), pasando por los detectores de centelleo, de UV y de fluorescencia (FD, por sus siglas en inglés). Los detectores más ampliamente usados son los de MS y MS/MS (Matamoros et al., 2012) puesto que, aunque son

más costosos, brindan resultados más confiables que permiten la identificación virtualmente inequívoca de los compuestos (Segura et al., 1998), al basar su funcionamiento en parámetros y comportamiento específicos de los analitos de interés como la relación carga masa y el patrón de fragmentación. La mayor certeza en las determinaciones se obtiene con la utilización de MS/MS, puesto que se realiza la detección mediante el monitoreo de reacciones múltiples (MRM, por sus siglas en inglés), es decir, el ión finalmente detectado no proviene directamente del analito sino de uno de los iones producidos en su disociación mientras que, en el caso de la MS, el ión detectado es el producto de la disociación del analito; de esta manera, la MS/MS permite hacer la detección en una región virtualmente libre de ruido causado por la matriz (Calderón, 2012).

En investigaciones referentes al destino de los micro-contaminantes en ecosistemas y las rutas que siguen en los componentes de los mismos, ha resultado de utilidad la aplicación de analitos marcados con ^{14}C , isótopo radiactivo del C, el cual es posteriormente detectado por su decaimiento radiactivo en detectores de centelleo (Bokern et al., 1998; Nakajima et al., 2002; Schmidt & Schuphan, 2002 y Doucette et al., 2005). La principal ventaja de estas técnicas es que permiten seguir no sólo la disminución de un compuesto en una matriz y su concentración en otra (en función de la presencia de ^{14}C) sino también su completa mineralización y transformación en $^{14}\text{CO}_2$, lo cual permite tener un panorama más amplio sobre el destino del compuesto en el ecosistema. Ciertamente, en estricto sentido estas técnicas no detectan al compuesto sino únicamente la actividad radiactiva del ^{14}C . Al combinar estas técnicas con otras de detección enfocadas a la medición de los compuestos, es posible realizar análisis de gran profundidad que permiten determinar también qué porcentaje del ^{14}C asimilado en el tejido vegetal cuánto de éste se encuentra como compuesto padre y que porcentaje ha sido metabolizado (Nakajima et al., 2002; Schmidt & Schuphan, 2002 y Doucette et al., 2005).

3.4.5.2.1 Efectos de matriz

La detección y cuantificación por cromatografía, tanto de gases como de líquidos, está sujeta a errores derivados de los efectos de matriz, particularmente en muestras con alto contenido de interferencias. Los efectos de matriz son fenómenos que se presentan en el inyector, en la columna, en el detector o en los tres por el comportamiento de los diferentes componentes de la matriz en la cual están contenidos los analitos al momento de la inyección. Los diferentes tipos de detector se ven afectados de distinta forma por los efectos de matriz (Hajšlová & Zrostlíková, 2003). En general, se tienen los siguientes tipos de efectos de matriz:

- Falso negativo por enmascaramiento del analito
- Falso positivo por impureza con tiempo de retención igual y características similares
- Sobreestimación de la cantidad por aumento de la respuesta en el detector
- Subestimación de la cantidad por disminución de la respuesta en el detector

Estos problemas son más marcados para detectores elementales o de estructura y grupo funcional básicos como el de ECD, el NPD o el FPD. Los detectores de espectrometría de masas (MSD) se ven menos influenciados por los efectos de matriz, ya que su funcionamiento está basado más

íntimamente en la estructura particular de las moléculas (Segura et al., 1998 y Hajšlová & Zrostlíková, 2003).

La sobreestimación por aumento en la respuesta en el detector se debe a que el estándar externo o curva de calibración con respecto al cual se determinan las concentraciones en la muestra, generalmente es inyectado en un solvente orgánico puro mientras que la muestra contiene gran cantidad de interferencias. Al entrar en contacto los analitos e impurezas con el liner del inyector e incluso con el empaque de la columna, una parte queda adsorbida en sitios activos. La sobreestimación se presenta ya que en el estándar, la proporción de analito retenida por este mecanismo es mayor que en las muestras, puesto que en la muestra una parte de los sitios activos es ocupada por las interferencias. Esto se ejemplifica en la Figura 8.

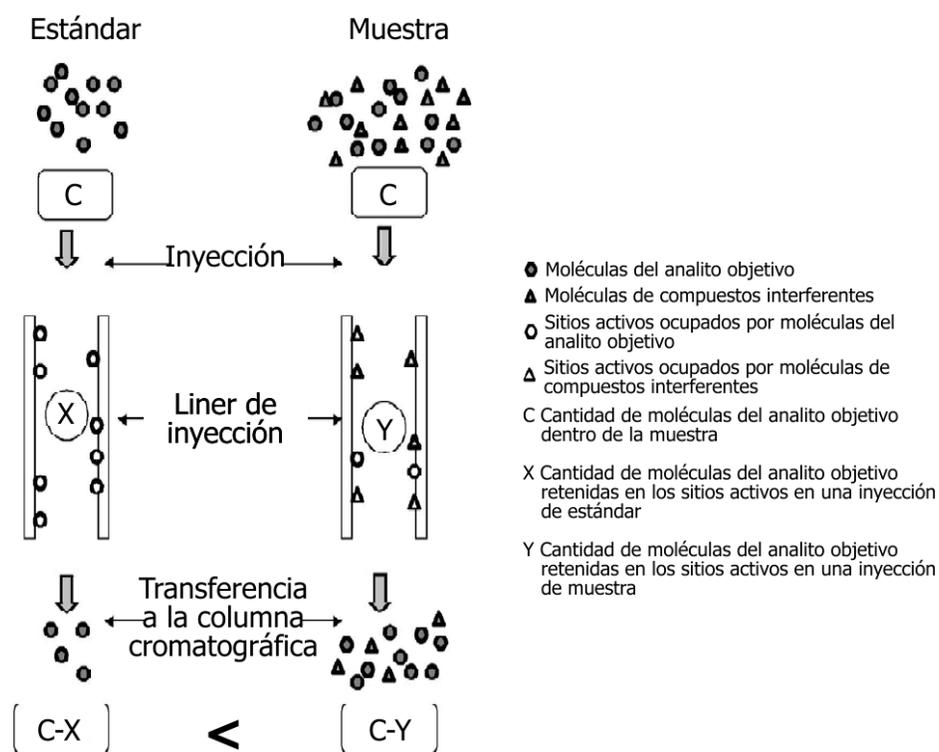


Figura 8 - Amplificación de señal, adaptado de Hajšlová & Zrostlíková, 2003

Los efectos de matriz derivados de la presencia de distintos compuestos interferentes no sólo tienen efectos puntuales en cada determinación sino que también pueden tener efectos acumulativos en inyecciones subsiguientes. Particularmente en la GC, compuestos no-volátiles como ceras, grasas, pigmentos y clorofilas, contenidos en la matriz aun después de la purificación se pueden depositar en el inyector, la columna capilar y partes de los detectores, impidiendo su correcto funcionamiento (Hajšlová & Zrostlíková, 2003).

3.4.5.2.2 Estándares

Una herramienta de gran utilidad para el análisis de muestras de matrices complejas como el tejido vegetal, los suelos y el agua residual, es la utilización de estándares internos para la cuantificación. Esta técnica consiste en adicionar un compuesto con características fisicoquímicas similares a las de los analitos de interés, pero con una respuesta claramente identificable y diferente en la medición. Por ejemplo, un tiempo de retención mayor o menor, o un espectro de masas sustancialmente diferente al del analito. Es recomendable agregar el estándar interno antes de realizar derivatizaciones puesto que, al compartir la naturaleza química del analito, precisa de ella para poder ser analizado; por otra parte, de esta manera, cualquier efecto de matriz que afecte al analito de interés afectará en similar medida al estándar interno. Posteriormente, al comparar la señal del estándar interno con una curva de calibración o un estándar externo, es posible corregir la respuesta obtenida y eliminar, en cierta medida, el error derivado de los efectos de matriz. Cabe resaltar que el estándar externo debe ser inyectado por separado a una concentración conocida y libre de los efectos de la matriz de estudio para cumplir su propósito. Es posible también manejar estándares subrogados o de recuperación, los cuales son adicionados antes de iniciar el procesamiento de la muestra, para estimar pérdidas de analitos a lo largo de todo el proceso. Los estándares de recuperación también deben tener características similares a los analitos de estudio y una respuesta claramente identificable. Diversas metodologías de análisis de matrices complejas hacen uso de la adición de estándares internos y de recuperación (Ling & Huang, 1995; Ferrara et al., 2006; Pang et al., 2006; Gibson et al., 2007; Tanaka et al., 2007; Brown et al., 2009; Calderón-Preciado et al., 2009; Durán-Álvarez et al., 2009; Wu et al., 2012 y Lu et al., 2013).

Tabla 9 – Técnicas para la extracción y cuantificación de micro-contaminantes orgánicos

Compuesto	Análisis de muestra	Cultivo	Medio	χ_{planta}	Límites	Recuperaciones	Autor
NP	1.- Liofilización 2.- Extracción con MeOH:DCM:H ₂ O 3.- Combustión de residuos sólidos y cuantificación por contador de centelleo líquido 4.- Cuantificación de extractos por TLC con analizador lineal	<i>Jitomate (Lycopersicon esculentum)</i>	Tierra contaminada a 5 mg/kg	0.0075 mg/kg tallo 0.005 mg/kg raíz	-	-	Bokern et al., 1998
			Tierra contaminada a 10 mg/kg	0.025 mg/kg tallo 0.012 mg/kg raíz			
		<i>Atriplex hortensis</i>	Tierra contaminada a 5 mg/kg	0.0245 mg/kg tallo 0.0165 mg/kg raíz			
			Tierra contaminada a 10 mg/kg	0.069 mg/kg tallo 0.055 mg/kg raíz			
NP	1.- Enjuague con agua desionizada 2.- Liofilización 3.- Adición de estándar subrogado (d4-NP) 4.- Extracción en equipo ASE con cloruro de metileno:acetona 5.- Concentración 6.- Limpieza en columna de sílica/Na ₂ SO ₄ 7.- Concentración 8.- Adición de estándar interno (d10-fenantreno) 9.- Inyección y análisis por CG-MS	<i>Triticum aestivum</i>	0.5g de biosólidos con 0.45mg de 4-NP mezclados con 16g de tierra colocados sobre 41g de tierra	nd	MDL NP 33.3µg/kg	NP deuterado 63-99%	Brown et al., 2009

Compuesto	Análisis de muestra	Cultivo	Medio	χ_{planta}	Límites	Recuperaciones	Autor		
NP, BPA, NPX, IBU, DIC y otros	1.- Conminución con N líquido 2.- MSPD en mortero con MgSiO ₃ , Na ₂ SO ₄ , Na ₂ -citrato 2H ₂ O, NaCl, Na ₂ H-citrato 3/2H ₂ O y hidromatrix 3.- Extracción en equipo PFE con acetona:hexano 4.- Adición de K ₂ CO ₃ 5.- Recuperación de fase orgánica y lavado con hexano (NP) 5.1.- Percolación en columna de MgSiO ₃ -MgSO ₄ 6.- Acidificación de fase acuosa y extracción con acetato de etilo 6.1.- Percolación en columna de Na ₂ SO ₄ (IBU, DIC, NPX y BPA) 7.- Adición de estándar interno (trifenilamina) 8.- Inyección directa de NP 9.- Derivatización de IBU, DIC, NPX y BPA e inyección 10.- Análisis por GC-MS (posteriormente GC-MS/MS)	Lechuga	Comprada en mercado	IBU 28.5 ng/g	LODs NP 58.1µg/kg BPA 13.6µg/kg IBU 16.1µg/kg DIC 23.2µg/kg LOQs NP 61.7µg/kg BPA 15.3µg/kg IBU 16.9µg/kg DIC 25.4µg/kg	IBU 83.2±0.88% DIC 69.5±2.8% BPA 61.1±0.2% NP 79.3±11.1% para 0.1mg/kg NP 54.6±9.9% para 0.5mg/kg	Calderón-Preciado et al., 2009		
		Alfalfa	Tierras de cultivo regadas con agua residual tratada o agua de río	IBU 0.025-0.061 µg/kg NPX <LOQ-0.014 µg/kg DIC <LOQ µg/kg	LOQs IBU 0.012µg/kg NPX 0.011µg/kg DIC 0.099µg/kg	-	Calderón-Preciado et al., 2011		
		Hojas de árbol de manzana		IBU <LOQ µg/kg NPX <LOQ µg/kg DIC <LOQ µg/kg					
				Lechuga	Cultivo hidropónico con $\chi_0 = 100\text{ng/mL}$	IBU 0.03-4.84 ng/g NPX 0.72-8.95 ng/g			Calderón-Preciado et al., 2012
				Lechuga	Cultivos de invernadero regados con agua de tratamiento secundario (ww)	ww: IBU ≤30ng/g NPX ≤113ng/g DIC ≤19ng/g gw: IBU ≤13ng/g			Calderón-Preciado et al., 2013
				Zanahoria	o freática (gw)	ww: IBU ≤16ng/g NPX ≤17ng/g			
NP	1.- Separación de la planta en raíces y follaje 2.- Secado a 80°C por 48h 3.- Adición de 8-12g de tejido seco a frasco de ebullición de 2L con agua desionizada, NaCl y NaHCO ₃ 4.- Reflujo con isoctano por 1h 5.- Determinación de NP en isoctano por HPLC-FD	<i>Agropyron cristatum</i>	Cultivo hidropónico con 0.0003mg/L y 0.004mg/L	3.9 – 75 mg/kg _{seco} raíz nd – 580 mg/kg _{seco} raíz	LOD 0.0005 mg/kg _{seco}	68-89%	Doucette et al., 2005		

Compuesto	Análisis de muestra	Cultivo	Medio	χ_{planta}	Límites	Recuperaciones	Autor						
BPA, NP	1.- Separación de la planta en raíces y tallos 2.- Secado a 80°C 3.- Molido en molino 4.- Extracción por agitación con 10mL de MeOH durante 4h de 0.1-0.5g de tejido 5.- Centrifugación y recuperación de sobrenadante 6.- Evaporación y resuspensión en acetoneitrilo:H ₂ O 7.- Filtrado 8.- Análisis por HPLC-UV	Jitomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	Cultivo hidropónico con BPA a 10mg/L y 50mg/L	BPA 96.7 $\mu\text{g/g}_{\text{seco}}$ raíz NP 41 $\mu\text{g/g}_{\text{seco}}$ tallo	LOD 2500pg	BPA 85%	Ferrara et al., 2006						
		Haba (<i>Vicia faba</i>)		BPA 1557.4 $\mu\text{g/g}_{\text{seco}}$ raíz 114.7 $\mu\text{g/g}_{\text{seco}}$ tallo									
		Rábano (<i>Raphanus sativus</i>)	Cultivo hidropónico con NP a 1mg/L con y sin materia orgánica	NP 2-15 μg , concentración no especificada				-	-	Gatullo et al., 2012			
		Raigras (<i>Lolium perenne</i>)		NP 0.6-7.2 μg , concentración no especificada									
		Rábano (<i>Raphanus sativus</i>)	Cultivo hidropónico con BPA a 4.6 y 46 mg/L	214-244 $\mu\text{g/g}_{\text{seco}}$							-	-	Loffredo et al., 2010
		Raigrás (<i>Lolium perenne</i>)		633-727 $\mu\text{g/g}_{\text{seco}}$ 211-307 $\mu\text{g/g}_{\text{seco}}$									
BPA	1.- Enjuague de las plantas con abundante agua destilada 2.- Separación de las plantas en raíces, tallos y hojas 3.- Liofilización 4.- Extracción con MeOH 5.- Evaporación a sequedad 6.- Resuspensión en etanol 7.- Análisis por HPLC-FID	Verdolaga (<i>Portulaca oleracea</i>)	Cultivo hidropónico con BPA a 11.41 $\mu\text{g/mL}$ (50 μM)	nd-720ng/g	-	-	Imai et al., 2007						
		45 cultivos florales (20 de <i>Salvia</i> spp. Y 25 de diversos cultivos florales)		Variable	-	-	Okuhata et al., 2010						
BPA	1.- Enjuague de las raíces con abundante agua 2.- Separación de la planta en raíces, hojas y tallos 3.- Extracción por inmersión en MeOH por 24h 4.- Evaporación a sequedad de extractos 5.- Resuspensión en 40% MeOH 6.- Análisis por HPLC con cuenta de centelleo	Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Cultivo hidropónico con BPA a 10 mg/L	nd-0.00354dpm/hoja 0.00158-0.014dpm/raíz	-	-	Nakajima et al., 2002						
NP	1.- Adición de 47érea47ne subrogado (d4-DEHP) 2.- Extracción Soxhlet con acetona:ciclohexano 3.- Evaporación 4.- Análisis por HPLC con fluorescencia	Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	Tierra de cultivo de limo arenoso y otra de arena limosa	nd	LOD NP 0.1mg/kg _{seco}	-	Petersen et al., 2003						
		Canola (<i>Brassica napus</i>)	Maceta preparada con NP a 60mg/kg _{seco}										
IBU, NPX y otros	1.- Enjuague de las partes comestibles de la planta con agua destilada 2.- Homogeneización con molino y mezclador 3.- Método USEPA 1694 (PPCPs en agua, suelo, sedimento y biosólidos) 3.1.- Adición de estándar subrogado 3.2.- Extracción con buffer de fostafo:acetoneitrilo mediante ultrasonido 3.3.- Evaporación del acetoneitrilo y dilución con agua 3.4.- Estabilización con NA ₂ EDTA.2H ₂ O•2H ₂ O 3.5.- Purificación con cartucho HLB 3.6.- Elución con MeOH 3.7.- Adición de estándar interno 3.8.- Análisis por LC-ESI-MS/MS	Granos de maíz (<i>Zea mays</i>)	Tierra de cultivo con suelo limoso fertilizada con biosólidos a 8ton _{seco} /ha con IBU 167ng/g _{seco} Y NPX 14 ng/g _{seco}	NPX 0.8ng/g _{seco} IBU nd	-	-	Sabourin et al., 2012						
		Zanahoria (<i>Daucus carota</i>)		nd									
		Jitomate		IBU 2.99 ng/g _{seco} en control NPX nd									
		Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)		nd									

Compuesto	Análisis de muestra	Cultivo	Medio	χ planta	Límites	Recuperaciones	Autor
BPA	1.- Separación de la planta en raíces, tallos y hojas 2.- Secado a 80°C 3.- Conminución 4.- Extracción por agitación con etanol (10mL/1.5g _{tejido seco}) por 24h 5.- Análisis por HPLC-UV	Bambú de la suerte (<i>Dracaena sandariana</i>)	Cultivo hidropónico con BPA a 4.57µg/mL (20µM)	440.66-598.6 µg/g _{seco} raíz 685.36-896.38 µg/g _{seco} tallo	-	-	Saiyood et al., 2010
NP	1.- Liofilización 2.- Conminución y 48érea48neización en licuadora 3.- Extracción de 1g de tejido por agitación con MeOH durante 24h 4.- Centrifugado y remoción del sobrenadante 5.- Lavado del sedimento por 1h en agitación con MeOH 6.- recuperación del sobrenadante, combinación y evaporación a sequedad 7.- Resuspensión en hexano 8.- Adición de estándar interno 9.- Análisis por HPLC con detector de fluorescencia	Haba (<i>Vicia faba</i>)	Macetas con tierra de distintas características contaminada con NP a 210 µg/g _{seco}	2.94-3.36 µg/g _{seco} tallo+hojas 2.19-7.45 µg/g _{seco} semillas 4.18-88.91 µg/g _{seco} raíz	-	-	Sjöström et al., 2008
BPA	1.- Filtración de los cultivos celulares e introducción de las células en cloroformo:MeOH (1:2), almacenamiento a -20°C 2.- Extracción por sonicación 3.- Filtración de residuos insolubles y lavado con cloroformo:MeOH:H ₂ O 1:2:0.8 4.- Combustión de filtros y material insoluble para cuantificación de residuos no extractables 5.- Combinación de los extractos celulares, adición de cloroformo y H ₂ O, 250µL c/u 6.- Separación de las fases formadas y análisis con contador de centelleo líquido	<i>Digitalis purpurea</i>	Cultivos celulares expuestos a 20µg de U- ¹⁴ C-BPA @ mg/L por 48h	90.3±2.2% del ¹⁴ C	-	-	Schmidt y Schuphan, 2002
		Frijol de soya (<i>Glycine max</i>)		9.4±1.2% del ¹⁴ C			
		Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)		86.1±4.3% del ¹⁴ C			
		<i>Datura stramonium</i>		19.8±3.5% del ¹⁴ C			
IBU y otro	1.- Corte del pasto 2.- Enjuague de la parte radical con agua corriente y destilada 3.- Secado al aire de raíces y en horno a 40°C por tres días de la parte aérea 4.- Corte y conminución del tejido seco 5.- Agitación por 2h en solución buffer de 6.5mL HCl + 25mL KCl, ambos 0.2M 6.- Filtración de sólidos 7.- Percolación de fase acosa en cartucho Absolut Nexus 8.-Elución con MeOH 9.- Concentración 10.- Análisis mediante GC-MS	Raigrás (<i>Lolium perenne</i>)	Macetas con luvisol fertilizadas una vez con orina enriquecida a a) 49µg/Kg _{seco} y b) 490µg/Kg _{seco} , en niveles estudiado solo y junto con otro fármaco. Tres meses de cultivo.	-	LODs Raíces: 20µg/Kg _{seco} Parte aérea: No determinado	Raíces: 67-98% Parte aérea: ND	Winker et al., 2010
NPX, IBU, DIC y otro	1.- Corte de la parte aérea de la planta 2.- Secado a 40°C en horno 3.- Conminución y homogeneización en licuadora 4.- Extracción en equipo ASE con 0.01M NaOH 5.- Ajuste de pH de extractos a 1.5 6.- Microextracción en fase líquida con fibras huecas (HF-LPME) con fase aceptora de carbonato de amonio 0.1M durante 4h 7.- Análisis de la fase aceptora por LC-MS	Soya (<i>Glycine max</i>) y trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	Macetas con tierra fertilizada con biosólidos digeridos. Concentraciones finales de a) DIC=132ng @ 0.1ng/g e IBU=1300ng @ 1ng/g y b) DIC=66ng @ 0.05ng/g e IBU=650ng @ 0.5ng/g	-	LODs DIC 0.4ng/g IBU 1.4ng/g	-	Cortés et al., 2013

Compuesto	Análisis de muestra	Cultivo	Medio	χ_{planta}	Límites	Recuperaciones	Autor	
NPX, IBU, DIC y otros	1.- Separación de las plantas en raíces, hojas y tallos 2.- Enjuague de los diferentes tejidos con agua desionizada 3.- Liofilización 4.- Conminución 5.- Adición de estándar subrogado (variantes deuteradas de los analitos) 6.- Extracción por sonicación de 0.2g con MTBE y posteriormente con acetoniitrilo 7.- Evaporación a sequedad 8.- Resuspensión en MeOH y dilución con agua 9.- Percolación en cartucho HLB y elución con MeOH 10.- Evaporación a sequedad y resuspensión en MeOH 11.- Filtración en jeringa con filtro de PTFE en inyección 12.- Análisis por HPLC-MS/MS	Lechuga	Cultivo hidropónico con compuestos a 500ng/L	NPX nd IBU nd DIC nd	MDLs NPX 0.1ng/g IBU 0.5ng/g DIC 0.2ng/g	Para 10 ng/g abs.%(corr.%) NPX 69.3 (94.8) IBU 63 (112.1) DIC 90.8 (97) Para 100 ng/g abs.%(corr.%) NPX 64.7 (98.2) IBU (58.8 (103.7) DIC 88.5 (101.6)	Wu et al., 2012	
		Espinaca		NPX nd-0.1 ng/g _{seco} IBU nd DIC nd		Para 10 ng/g abs.%(corr.%) NPX 57.3±3.7 (85.5±12.3) IBU 52.7±11.9 (100.5±15) DIC 78.6±15 (94.1±8.3)		
		Lechuga (<i>Lactuca sativa</i> L.)	Cultivo hidropónico con compuestos a 500 y 5000 ng/L	500ng/L NPX _{raíz} = 9.9 ± 4.9 IBU _{raíz} = 0.3 ± 0.2 DIC _{raíz} = 2.1 ± 0.7 5000ng/L NPX _{raíz} = 140 ± 40 NPX _{foliaje} = 0.1 ± 0.2 IBU _{raíz} = 3.3 ± 2.2 DIC _{raíz} = 20 ± 3		-	-	-
		Espinaca (<i>Spinacia oleracea</i> L.)		500ng/L NPX _{raíz} = 0.2 ± 0.2 NPX _{foliaje} = 0.04 ± 0.06 IBU _{raíz} = 0.6 ± 0.2 5000ng/L NPX _{raíz} = 4.1 ± 4.9 NPX _{foliaje} = 0.2 ± 0.2 IBU _{raíz} = 8.7 ± 9.6 DIC _{raíz} = 2.7 ± 1.3				
		Pepino (<i>Cucumis sativus</i> L.)		500ng/L NPX _{raíz} = 2.5 ± 0.7 NPX _{foliaje} = 0.2 ± 0.1 IBU _{raíz} = 0.5 ± 0.1 DIC _{raíz} = 0.3 ± 0.2 5000ng/L NPX _{raíz} = 29 ± 12 NPX _{foliaje} = 0.4 ± 0.1 IBU _{raíz} = 3.9 ± 1.2 IBU _{foliaje} = 0.3 ± 0.1 DIC _{raíz} = 2 ± 0.4				
Chile (<i>Capsicum annum</i> L.)	500ng/L NPX _{raíz} = 3.3 ± 1.1 NPX _{foliaje} = 0.6 ± 0.4 IBU _{raíz} = 1.8 ± 0.4 IBU _{foliaje} = 0.2 ± 0.2 DIC _{raíz} = 1.4 ± 0.2 5000ng/L NPX _{raíz} = 79 ± 11 NPX _{foliaje} = 6.2 ± 2.9 IBU _{raíz} = 67 ± 34 IBU _{foliaje} = 0.4 ± 0.3 DIC _{raíz} = 16 ± 3	Wu et al., 2013						

Compuesto	Análisis de muestra	Cultivo	Medio	χ planta	Límites	Recuperaciones	Autor
DIC y otros	1.- Decapitación de la planta 3-5cm por arriba de los cotiledones 2.- Enjuague de raíces y cotiledones con agua y MeOH 3.- Separación del tallo superior en hojas y tallo 4.- Corte y homogeneización de cada tipo de tejido 5.- Toma de 0.2g de muestra de cada tejido 6.- Extracción ultrasónica con acetonitrilo 7.- Desgrasado y despigmentado mediante extracción líquido-líquido con hexano:acetonitrilo, fase hexánica se descarta 8.- Evaporación, resuspensión con agua:acetonitrilo 6:4 y dilución con agua 9.- Percolación de por cartucho HLB acondicionado con MeOH y agua 10.- Elución con MeOH 11.- Evaporación del eluato y adición de estándar interno 12.- Resuspensión con agua:acetonitrilo 13.- Análisis por LC-MS/MS	Chicharo (<i>Pisum sativum</i>)	Cultivo hidropónico con a) DIC y otros a 0.25mg/L por 24h o b) DIC a 1mg/L por 72h	a_{raiz} : 27.5±29 ng/g _{fresco} $a_{cotiledón}$: 43.3±31 ng/g _{fresco} b_{raiz} : 42.9±11.2 ng/g _{fresco} $b_{cotiledón}$: 20.0±6.0 ng/g _{fresco}	MDLs Hojas: 4.02 ng/g _{fresco} Tallos: 2.53 ng/g _{fresco} Raíces: 3.19 ng/g _{fresco} Cotiledones: 3.36 ng/g _{fresco}	Hojas: 43.5% Tallos: 49.4% Raíces: 52.8% Cotiledones: 50.4%	Tanoue et al., 2012
NP, BPA y otros	1.- Vegetales y frutas sin pelar cortados en pedazos pequeños 2.- Homogeneización con 1N HCl en licuadora de laboratorio 3.- Adición de estándares 4.- Adición de acetona Na ₂ SO ₄ y mezclado 5.- Dos ciclos de extracción con ultrasonido por 15min 6.- Combinación de ambos extractos 7.- Filtración de los extractos 8.- Evaporación a sequedad en baño María 9.- Resuspensión en acetonitrilo 10.- Hidrólisis no-específica de los extractos con 1N HCl e incubación por 30min 11.- Extracción de la solución ácida con cloruro de metileno 12.- Evaporación a sequedad del extracto 13.- Adición de derivatizante y catalizador (BSTFA-TMCS y piridina) a los extractos secos 14.- Derivatización 15.- Resuspensión de extractos derivatizados con hexano 16.- Análisis por GC-MS/MS	Lechuga Jitomate Papa Calabaza Zanahoria Manzana Fresa Citrus	Compradas	BPA 2 ± 1.2ng/g BPA 0.2 ± 0.1ng/g BPA 4.3 ± 2.1ng/g NP 5.3 ± 3.2ng/g BPA 4.2 ± 2.8ng/g NP 5.1 ± 2.6ng/g BPA 4 ± 2.3ng/g NP 7.2 ± 3.6ng/g BPA 7.5 ± 5.4ng/g BPA 2 ± 1.4ng/g NP 11 ± 3.2ng/g BPA 9 ± 4.9ng/g	LOD NP 0.3ng/g BPA 0.03ng/g LOQ NP 1ng/g BPA 0.1ng/g	NP 95 – 102% BPA 95 – 102% Según cultivo	Lu et al., 2013
Varios pesticidas	1.- Homogeneización y conminución de la muestra en un picador de alimentos 2.- MSPD en mortero con Florisil 3.- Empaquetamiento de muestra, sobre cama con Na ₂ SO ₄ y Florisil, en columna de SPE 4.- Recubrimiento de la muestra empaquetada con capa adicional de Na ₂ SO ₄ 5.- Elución con hexano:acetona 9:1 6.- Concentración de eluatos 7.- Adición de estándar interno 8.- Ajuste de volumen a 1mL 9.- Análisis por GC-ECD y GC-MS, según el pesticida	<i>Cucumis anguria</i> , berenjena, col, col china y chicharo	Comprados en mercado	Cipermetrina y fenvalerato en col a 0.58 y 0.18µg/g, respectivamente	5.1-18.3ng/g, según pesticida y vegetal	113±5-92±4%. según pesticida y vegetal	Ling y Huang, 1995

Compuesto	Análisis de muestra	Cultivo	Medio	χ_{planta}	Límites	Recuperaciones	Autor
TetrabromoBPA (TBBPA) y otro	<ol style="list-style-type: none"> 1.- Separación de la planta en parte aérea y radical 2.- Enjuague de ambas partes con agua desionizada 3.- Liofilización 4.- Conminución con mortero de ágata y refrigeración 5.- Adición de estándar interno 6.- Extracción Soxhlet por 24h con acetona:hexano 1:1 7.- Evaporación casi total y acidificación con 5mL de H₂SO₄ 8.- Cetrifugado y recuperación del sobrenadante 9.- Adición de hexano y evaporación con N₂ 10.- Percolación en columna de sílica seguida de lavado con hexano 11.- Elución con acetona 12.- Evaporación, resuspensión en MeOH y refrigeración 13.- Análisis por HPLC-ESI-MS/MS 	Col y rábano	Macetas con tierra contaminada con TBBPA y con TBBPA y otro compuesto 1 1000µg/Kg	$Col_{\text{raiz}}: 10-16\text{ng/g}_{\text{seco}}$ $Col_{\text{hojaje}}: 5.5-6\text{ng/g}_{\text{seco}}$ $Rábano_{\text{raiz}}: 2-4\text{ng/g}_{\text{seco}}$ $Col_{\text{raiz}}: 2-3.5\text{ng/g}_{\text{seco}}$	0.6ng/g _{seco}	-	Li et al., 2011
Varios pesticidas	<ol style="list-style-type: none"> 1.- Conminución del material vegetal 2.- MSPD en motero con muestra, Florisil y arena lavada con ácido 3.- Empacado de la muestra en columna para SPE y recubrimiento de la muestra con lana de vidrio silanizada 4.- Elución con diclorometano 5.- Concentración de eluatos 6.- Adición de MeOH y concentración con N 7.- Dilución en agua 8.- Percolación por columna de C₈ y lavado de la columna con agua 9.- Elución con acetato de etilo 10.- Recuperación de la fase orgánica 11.- Concentración con N 12.- Toma de alícuota y análisis con GC-ECD 	Alcachofa, frijol verde, lechuga y jitomate	Cultivos libres de agroquímicos para el desarrollo de la técnica, vegetales comprados en mercado para determinación de la presencia	0.009-0.356mg/kg, diferentes pesticidas y vegetales	LOD 7-40ng/g, obtenidos con jitomate según pesticida	75±14-104±9%, según pesticida y vegetal	Viana et al., 1996
Varios pesticidas	<ol style="list-style-type: none"> 1.- Introducción de granos en desecador por 12h 2.- Molienda de granos en molino de piedra eléctrico 3.- Empaque de la celda de extracción con aminopropil seguido de la muestra y perlas de vidrio en el espacio muerto 4.- Extracción en equipo de SFE con CO₂ y acetato de etilo como colector y MeOH como modificador en la fase estática 5.- Ajuste de volumen del extracto con acetato de etilo y ciclohexano 6.- Dilución 1:3 con extractos de blanco 7.- Análisis mediante GC-ECD o GC-NPD 	Arroz blanco y arroz salvaje	Comprados en mercado	-	-	0-98±3%, según pesticida	Aguilera et al., 2005

Compuesto	Análisis de muestra	Cultivo	Medio	χ _planta	Límites	Recuperaciones	Autor
Varios pesticidas	<ol style="list-style-type: none"> 1.- Conminución y homogeneización del material vegetal con una licuadora 2.- Homogeneización de la muestra con Na₂SO₄ 3.- Empaque de la muestra sobre cama de carbón grafizado 4.- Extracción en equipo ASE con acetato de etilo 5.- Concentración del extracto en rotavapor y con N 6.- Adición de estándar interno 7.- Inyección y análisis por GC-MS 	<p>Espinaca (<i>Spinacia oleracea</i>), komatsuna (<i>Brassica campestris</i> var. <i>peruvidiris</i>), qing geng cai (<i>Brassica rapa</i> var. <i>chinensis</i>), broccoli (<i>Brassica rapa</i> var. <i>italica</i>), coliflor (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>), pimiento verde (<i>Capsicum annuum</i> L.) y okra (<i>Abelmoschus esculentus</i>)</p>	Compradas en mercado	-	LOD 3-8µg/kg, según pesticida	71±9.4-103±19%, según pesticida y vegetal	Tanaka et al., 2007
Fluoxetina (FLX)	<ol style="list-style-type: none"> 1.- Congelamiento de las plantas tras 12 semanas de cultivo 2.- Separación de la planta en cabeza, hojas, tallo y raíces 3.- Conminución en mortero de las fracciones por separado con arena y acetónitrilo/ácido fórmico 1% 4.- Adición de estándar interno en tubo de cetrifugado con la muestra 5.- Extracción por sonicación durante 15min 6.- Centrifugado y recuperación del sobrenadante 7.- Combinación del sobrenadante de los triplicados y filtración 7.- Evaporación al aire 8.- Dilución en agua Milli-Q 9.- Acidificación con H₃PO₄ 10.- Percolación por cartuchos de SPE en tándem (SAX - Strata-X (fase reversa)) 11.- Lavado del cartucho Strata-X con Milli-Q:MeOH 1:1 12.- Secado del cartucho 13.- Elución de analitos del cartucho Strata-X con MeOH ácido fórmico 1% 14.- Evaporación a sequedad con N 15.- Resuspensión en acetónitrilo 16.- Análisis por HPLC-ESI-MS 	Coliflor	Cultivadas en gel de Murashige Skoog con FLX a 280ng/mL	<p>Hojas: 0.26µg/g_{humedo} Cabeza: ND Tallo: 0.49µg/g_{humedo} Raíces: ND</p>	-	-	Redshaw et al., 2008

Compuesto	Análisis de muestra	Cultivo	Medio	χ _planta	Límites	Recuperaciones	Autor
Varios agentes antibacteriales veterinarios	1.- Liofilización de los granos 2.- Conminución en molino de café 3.- Homogeneización con arena 4.- Extracción mediante PLE 5.- Filtración con tamaño de poro de 0.45µm 6.- Dilución con agua Milli-Q 7.- Percolación por cartuchos de SPE en tándem (SAX - HLB) 8.- Lavado con ácido cítrico 0.04 M y acetato de potasio 0.1 M 9.- Secado de los cartuchos 10.- Elución de analitos del cartucho HLB con MeOH 11.- Análisis mediante LC-ESI-MS/MS	Granos de cebada	Cultivada en campo fertilizado con estiércol de cerdo. Concentración de agentes <10 µg/kg	-	0.2-1.5µg/kg, según agente	31.8-56.5%, según agente	Jacobsen et al., 2004
Varios pesticidas	1.- Pretratamiento y extracción de matrices 1.1.- Lechuga y durazno 1.1.1.- Homogeneización en licuadora 1.1.2.- Extracción por agitación con acetona por 30min 1.1.3.- Filtración de los extractos y reextracción de la pulpa 1.1.4.- Combinación y homogeneización de los extractos 1.2.- Trigo 1.2.1.- Extracción por agitación con acetona:agua 8:2 por 30min 1.2.2.- Filtración del extracto 2.- Toma de alícuotas de los extractos y dilución en agua bidestilada 3.- SPE 3.1.- Percolación por cartuchos de negro carbón grafizado (GCB) 3.2.- Lavado del cartucho con MeOH 3.3.- Elución de analitos con acetato de etilo:MeOH 8:2 3.4.- Percolación de eluatos por cartucho bifásico de SAX/PSA (sólo lechuga y durazno) 3.5.- Captación de eluato y subsecuente elución del cartucho con acetato de etilo:MeOH 8:2 4.- Evaporación con N 5.- Análisis por GC-ECD y GC-MS	Lechuga, durazno y trigo	-	-	LOD ECD: 0.0005-0.005 mg/kg según pesticida LOD MS: 0.0005-0.005 mg/kg según pesticida	66±2-141±7%, según pesticida, nivel de enriquecimiento y vegetal	Balinova et al., 2007

Compuesto	Análisis de muestra	Cultivo	Medio	χ planta	Límites	Recuperaciones	Autor
Varios pesticidas	1.- Homogeneización de muestra con Celite 545 2.- Extracción mediante PLE con acetonitrilo 3.- Primera limpieza en SPE 3.1.- Pesticidas a analizar por GC 3.1.1.- Toma de alícuota de los extractos según contenido de aceites 3.1.2.- Alícuotas percoladas por cartucho Envi-18 3.2.- Pesticidas a analizar por LC 3.2.1.- Concentración de los extractos en evaporación rotativa 3.2.2.- Extractos concentrados percolados por cartucho Sep-Pak Alumina N 4.- Elución de cartuchos con acetonitrilo 5.- Percolación de eluatos por columnas de SPE en tándem (Envi-Carb llena a tope con Na ₂ SO ₄ - Sep-pak NH ₂) 6.- Elución con acetonitrilo:tolueno 3:1 7.- Concentración de eluatos en evaporación rotativa 8.- Tratamiento de fracciones en inyección 8.1.- Pesticidas a analizar por GC 8.1.1.- Doble extracción líquido-líquido con hexano 8.1.2.- Evaporación de la fase hexánica 8.1.3.- Adición de estándares internos 8.1.4.- Inyección y análisis por GC-MS 8.2.- Pesticidas a analizar por LC 8.2.1.- Evaporación a sequedad con N 8.2.2.- Resuspensión con acetonitrilo:agua 3:2 8.2.3.- Adición de estándares internos 8.2.4.- Inyección y análisis por LC-MS/MS	Maíz, cebada, avena, arroz, y trigo	-	-	LOD 0.0005-0.3mg/kg	42-132%, según pesticida, nivel de enriquecimiento y tipo de grano	Pang et al., 2006

4 METODOLOGÍA

En este capítulo se detallan los pasos seguidos a fin de cumplir los objetivos propuestos. Primeramente, se realizó la selección de los micro-contaminantes a analizar; para ello se tomaron como base los analizados por Durán-Álvarez et al. (2009) y Gibson et al. (2007), tomando en cuenta que dichas técnicas consideran dos grupos de micro-contaminantes y hacen un manejo distinto para cada uno. A continuación, se determinó el tipo de cultivo por analizar y, con base en la revisión bibliográfica realizada, se propuso el método analítico. Una vez hecha la propuesta, se realizaron pruebas a fin de evaluar el método y proponer correcciones, esto se repitió en dos ocasiones. El material vegetal utilizado para la generación de muestras para la evaluación y validación de los métodos propuestos fue comprado en el Mercado de la Merced. Para la ejecución de cada método se compró nuevo material vegetal, lo cual introduce incertidumbres en la comparabilidad entre corridas analíticas. Para la validación de los métodos propuestos se siguió la estrategia adoptada en la validación del método de análisis de micro-contaminantes orgánicos en suelo en el grupo de investigación (Durán, 2009). En particular, para las recuperaciones se estableció como aceptable el rango entre 70 y 120% con una desviación estándar relativa máxima de 32%. En las pruebas realizadas, se utilizaron estándares de recuperación para evaluar las recuperaciones que brinda la técnica, estándares de enriquecimiento para evaluar el desempeño del método propuesto para cada uno de los analitos objetivo y estándares internos para la cuantificación de las respuestas. Como estándares de recuperación se utilizaron el compuesto marcado isotópicamente [$^2\text{H}_{16}$]-BPA para la fracción de los compuestos fenólicos y el NSAID Ketoprofeno (KP) para la fracción de los compuestos de carácter ácido. Como estándares internos se utilizaron el 4-n-NP, isómero del NP cuya cadena de alquilo no tiene ramificaciones, para la fracción fenólica y el ácido clofíbrico (CFA) para la fracción ácida. Como estándares de enriquecimiento se manejaron adiciones de distintas cantidades predeterminadas de los mismos analitos objetivo. En todas las extracciones se incluyeron blancos de método y blancos de muestra (nivel 0). Los blancos de método consistieron en celdas que únicamente contenían los substratos utilizados en la preparación de muestras y los estándares de recuperación, dichas celdas fueron extraídas y procesadas de la misma manera que el resto de las muestras. La finalidad de los blancos de método es determinar las cantidades de los analitos presentes en los solventes, substratos y material de laboratorio para posteriormente restarlas de las cantidades detectadas en las muestras. Todas las cuantificaciones fueron referidas a un estándar externo, un vial de cromatografía preparado con cantidades predeterminadas de los analitos objetivo y estándares de recuperación e interno inyectado a intervalos predefinidos entre muestras. Finalmente, se realizó la evaluación final del método corregido.

En este trabajo, se buscó lograr una extracción satisfactoria de los compuestos minimizando la utilización de substratos y solventes y simplificando el pretratamiento a fin de reducir tiempos de ejecución, requerimiento de insumos y vías de contaminación y pérdida de analitos. Para dichos fines, el trabajo se fundamentó en técnicas desarrolladas previamente para la extracción y determinación de micro-contaminantes orgánicos en otras matrices, así como en técnicas desarrolladas para la extracción y determinación en la matriz vegetal. En la Figura 9 se esquematiza el desarrollo de la metodología aplicada en esta investigación.

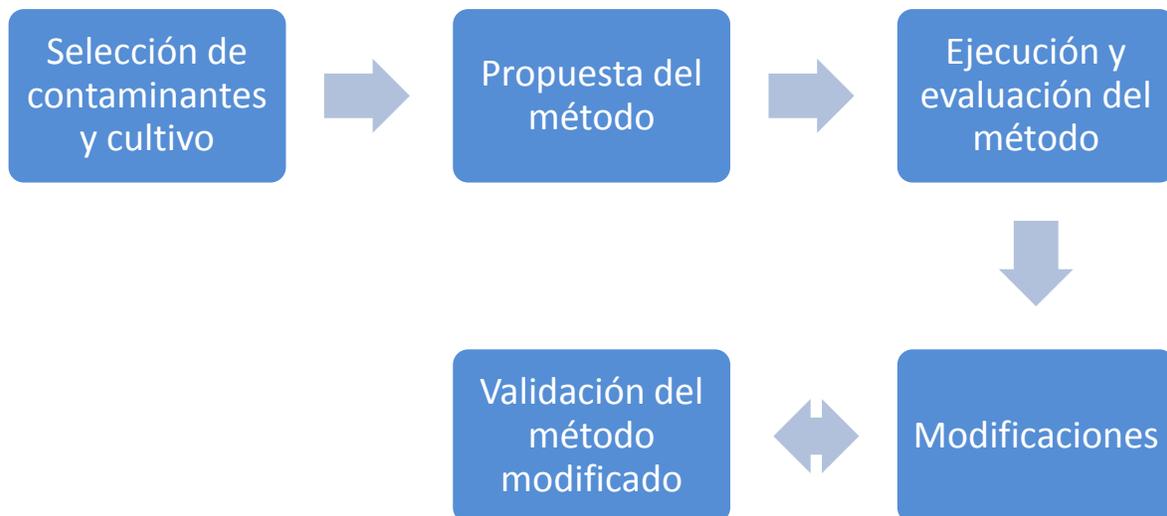


Figura 9 - Metodología

4.1 Selección de contaminantes y cultivos

Los contaminantes se seleccionaron de entre los analizados por Gibson et al. (2007) y Durán-Álvarez et al. (2009) en agua y suelo, respectivamente, en el Valle del Mezquital. Como criterio de selección, se buscó que los contaminantes cumplieran con las siguientes características:

- Ser compuestos químicos contenidos en productos de uso generalizado
- Que sean detectables mediante los métodos analíticos que se han desarrollado en el grupo de investigación para otras matrices
- Tener las más altas concentraciones en las investigaciones realizadas para suelo y agua residual por Gibson et al. (2007) y Durán-Álvarez et al., (2009)

Bajo dichas directrices, se eligieron: 4-nonilfenol, bisfenol-A, naproxeno, ibuprofeno y diclofenaco. En la Tabla 10 se observa que las concentraciones de dichos compuestos en el agua y suelo del Valle del Mezquital así como sus concentraciones el agua residual tratada para reúso agrícola, con fines comparativos.

Tabla 10 - Concentraciones de compuestos de interés en agua y suelo

Analito	Uso	Fuentes	Concentraciones en agua			Concentración suelo [ng/g]
			AR cruda [µg/L]	AR tratada [µg/L]	Manantial [ng/L]	
NP	Producción de detergentes	Degradación de alquifenoles etoxilados	9.9-25.7 ^a	<0.081 ^c	<1-10 ^a	35-132 ^b
BPA	Plastificante	Desorción de plásticos de policarbonato y resinas epóxicas	0.72-2.86 ^a	0.072-0.171 ^c	0.2-0.62 ^a	<2-18 ^b
NPX	Antiinflamatorio no esteroideo con acción antipirética y analgésica	Excreción de compuesto no metabolizado e incorrecta disposición de fármacos caducos	13.17-20.13 ^a	0.035-0.139 ^c	0.6-1 ^a	0.53-0.93 ^b
IBU			3.76-6.29 ^a	0.017-0.259 ^c	0.5-3.4 ^a	<0.1-0.29 ^b
DIC			1.34-6.74 ^a	0.072-0.171 ^c	<1 ^a	<0.1-2.1 ^b

^a En el Valle del Mezquital. Gibson et al., 2007

^b En el Valle del Mezquital. Durán-Álvarez et al., 2009

^c Agua para reúso. Calderón-Preciado et al., 2011

Para la selección del cultivo por analizar, se buscó que: a) se consumiera preferentemente crudo, b) que su desarrollo fuera rápido y c) que existiera evidencia de su cultivo en el Valle del Mezquital. El cultivo seleccionado fue el cilantro.

4.2 Metodología de extracción y cuantificación

4.2.1 Propuesta del método

Con base en la revisión bibliográfica, se buscó desarrollar un método lo más compatible posible con las técnicas de Durán-Álvarez et al. (2009) y de Gibson et al. (2007), previamente empleadas en el grupo de Tratamiento y Reúso del Instituto de Ingeniería. En particular, se propuso seguir la metodología de extracción y cuantificación propuesta por Durán-Álvarez et al. (2009) modificando la etapa de preparación de muestra a fin de incluir adiciones que permitieran obtener extractos de buena calidad de la matriz vegetal.

4.2.1.1 Pretratamiento

El material vegetal se enjuagó con agua destilada para retirar tierra e insectos, posteriormente se secó en horno a 40°C durante al menos 48 horas. La temperatura propuesta es menor a las utilizadas por otras técnicas reportadas en la Tabla 9 así como menor a las temperaturas a las cuales se degradan los compuestos según diversos autores (sección 3.4.2). Una vez seco, el material vegetal fue conminuido y homogeneizado en una licuadora. Para evitar contaminar la muestra, se utilizó un mecanismo totalmente metálico y un vaso de vidrio previamente enjuagado con acetona.

4.2.1.2 Preparación de muestra

Para el análisis se pesó 1 g de muestra seca y se homogeneizó con tierra diatomácea, $MgSiO_3$ y Na_2SO_4 , 1 g c/u, a fin de remover color y grasas vegetales en el extracto. Las muestras fueron empacadas en celdas de extracción de 22 mL sobre una cama de SiO_2 y Al_2O_3 , 3g c/u, para coadyuvar en la remoción de pigmentos en el extracto. Las muestras empacadas fueron adicionadas con los estándares de recuperación y de enriquecimiento en tres niveles. Para el nivel 0, únicamente se les adicionaron los estándares de recuperación, para los niveles bajo y alto se adicionaron 10 y 100 ng/g_{seco} para BPA, NPX, IBU y DIC, y 50 y 500 ng/g_{seco} para NP, según se detalla en la Tabla 11.

Tabla 11 - Estándares de recuperación y enriquecimiento propuestos

Función	Analito	Nivel 0	Nivel bajo	Nivel alto
Recuperación	[3H]-BPA	100 ng		
	KP			
Enriquecimiento	NP	0 ng/g_{seco}	50 ng/g_{seco}	500 ng/g_{seco}
	BPA		10 ng/g_{seco}	100 ng/g_{seco}
	NPX			
	IBU			
	DIC			

4.2.1.3 Extracción

Las muestras fueron extraídas en un equipo ASE 200 de la marca DIONEX® (Figura 10) empleando las condiciones listadas en la Tabla 12. Después de la extracción, los extractos se concentraron en un equipo CentriVap (Figura 11) a 60°C hasta reducir su volumen a ± 3 mL. Posteriormente, los concentrados fueron diluidos con 20 mL de agua HPLC.

Tabla 12 - Parámetros de extracción del equipo ASE 200

Solvente	Acetona:Hexano:Ácido acético 50:50:2 % v/v
Temperatura	100°C
Presión	1500 psi
Calentamiento	5 min
Static	5 min
Ciclos	2
Flush	60%



Figura 10 - Equipo ASE 200



Figura 11 - Equipo CentriVap

4.2.1.4 Extracción en fase sólida

Los cartuchos de extracción en fase sólida OASIS® HLB (Hydrophilic-lipophilic-balanced) con 200 mg de fase estacionaria fueron seleccionados para la concentración y limpieza de la muestra por ser capaces de retener compuestos polares como los fármacos. Estos cartuchos son los utilizados en las técnicas previamente montadas para el análisis de micro-contaminantes en agua residual y suelo en el grupo de investigación.

4.2.1.4.1 Acondicionamiento y percolación

Antes de su uso, los cartuchos fueron acondicionados agregando primero 10 mL de acetona grado HPLC para eluir cualquier interferencia que pudieran contener (Gibson et al., 2007). Posteriormente, se agregaron 5 mL de ácido acético al 5%_{v/v} y finalmente 5 mL de agua HPLC con la finalidad de activar los sitios de adsorción en los cartuchos. Los extractos diluidos fueron percolados a través de los cartuchos acondicionados, asistidos por una presión de vacío menor a 10 psi (Figura 12). Una vez concluida la percolación, los cartuchos se enjuagaron con 2 mL de agua grado HPLC.



Figura 12 - Percolación de extractos diluidos en cartuchos de SPE

4.2.1.4.2 Elución

Se realizó una elución en dos etapas. Los compuestos con carácter ácido fueron eluidos primero con una solución buffer de acetona:0.1M NaHCO_3 pH 10. Entonces, los cartuchos fueron enjuagados con 5 mL de agua HPLC. Tras dos horas de secado con un flujo de vacío menor a 10 psi, se eluyeron los compuestos fenólicos, (4-NP y BPA) con 6 mL de acetona. Ambas fracciones se capturaron en viales de 15 mL.

4.2.1.5 Concentración y derivatización

4.2.1.5.1 Fracción de los compuestos de carácter ácido

Los eluatos de la fracción ácida fueron evaporados con N_2 de ultra alta pureza a 40°C (Figura 13) para eliminar la acetona, posteriormente la fase acuosa fue acidificada con H_2SO_4 a $\text{pH}\sim 2$. Se realizó una extracción líquido-líquido agregando a la fase acuosa 2 mL de acetato de etilo grado HPLC. La mezcla fue agitada durante 5 minutos en un agitador orbital a 400 rpm y posteriormente centrifugada 1 minuto a 2500 rpm para romper la emulsión. El sobrenadante orgánico fue transferido a un vial de 15 mL y se repitió el proceso con la fase acuosa remanente. Posteriormente, la fase orgánica de acetato de etilo fue evaporada hasta un volumen aproximado de 500 μL . Entonces, Na_2SO_4 fue adicionado a las muestras a fin de remover cualquier remanente de agua. La fase orgánica libre de agua se transfirió a viales de cromatografía de 2 mL y el Na_2SO_4 se lavó dos veces con 300 μL de acetato de etilo que fue transferido también a los viales de cromatografía. Las muestras se evaporaron con N_2 y calor hasta aproximadamente 250 μL antes de

adicionarles el estándar interno correspondiente (Tabla 13). En un vial de cromatografía de 2 mL se preparó también una mezcla de estándares con los analitos y estándares internos y de recuperación (estándar externo, Tabla 14) para realizar la cuantificación con las Ecuaciones 2, 3 y 4 que se presentan más adelante en la sección 4.2.1.6. Las muestras y el estándar externo se evaporaron hasta la sequedad.

La derivatización se realizó adicionando los agentes derivatizantes correspondientes (Tabla 15) e introduciendo las muestras y el estándar externo en un baño de agua a 60°C durante 30 minutos. Finalmente, el contenido de todos los viales fue diluido hasta 500 µL con acetato de etilo.

4.2.1.5.2 Fracción de los compuestos fenólicos

Las muestras fueron evaporadas hasta aproximadamente 100 µL, posteriormente se agregó Na₂SO₄ a fin de remover cualquier remanente de agua y se transfirieron a viales de cromatografía de 2 mL. El Na₂SO₄ se lavó dos veces con 300 µL de acetato de etilo HPLC el cual fue transferido a los viales de cromatografía. Las muestras se evaporaron con N₂ y calor hasta aproximadamente 250 µL, se adicionó el estándar interno correspondiente (Tabla 13) y se preparó el estándar externo (Tabla 14), finalmente las muestras y el estándar se evaporaron hasta la sequedad.

La derivatización se realizó adicionando los agentes derivatizantes correspondientes (Tabla 15) e introduciendo las muestras y el estándar en un baño de calor a 60°C durante 30 minutos. Finalmente, el contenido de todos los viales fue diluido hasta 500 µL con acetato de etilo.

Tabla 13 - Estándares internos propuestos

Fracción	Estándar	Cantidad agregada [ng]	Concentración nominal [ng/µL]
Ácida	CFA	100	0.2
Fenólica	4-n-NP	500	1

Tabla 14 - Estándares externos propuestos

Fracción	Estándar	Cantidad agregada [ng]	Concentración nominal [ng/µL]
Ácida	CFA	500	1
	KP		
	NPX		
	IBU		
	DIC		
Fenólica	4-n-NP	1250	2.5
	[³ H] ₁₆ -BPA		
	BPA		
	NP		

Tabla 15 - Agentes derivatizantes

Fracción	Derivatizantes
Ácida	25 µL acetato de etilo HPLC + 25 µL MTBSTFA
Fenólica	15 µL piridina + 35 µL BSTFA



Figura 13 - Evaporación de fases orgánicas con N_2 de ultra alta pureza y calor

4.2.1.6 *Análisis por GC-MS*

Las diferentes fracciones se inyectaron por separado en un cromatógrafo de gases HP6890N con una columna capilar de sílica fundida modelo HP5-MS acoplado a un detector selectivo de masas HP5973N (Figura 14). Las condiciones de operación del equipo se detallan en la Tabla 16.



Figura 14 - Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas

Tabla 16 - Condiciones de operación del GC-MS

Componente	Condición				
Inyector	Inyección		Temperatura del puerto		
	Modo	Volumen			
	Splitless	1 µL			
Horno	Temperatura				
	Inicial	Gradiente	Final		
	100°C por 1 min	20°C/min	280°C por 10 min		
Columna	Longitud	Grosor	Grosor fase estacionaria	Gas acarreador	Flujo
	30 m	0.25 mm	0.25 µm	He	1 mL/min
Detector de masas	Modo	Temperatura			Energía del electrón
		Interfase	Fuente	Cuadrupolo	
	SIM	250°C	230°C	150°C	

Los iones característicos monitoreados para el análisis y los tiempos de retención se detallan en la Tabla 17, el ión principal se presenta subrayado.

Tabla 17 - Tiempos de retención e iones característicos

Función	Compuesto	Tiempo de retención [min]	Iones característicos [m/z]		
Analito objetivo	NP	7.30-7.65	<u>221</u>	193	207
	BPA	9.70	<u>357</u>	372	
	IBU	7.93	<u>263</u>	264	
	NPX	10.17	<u>287</u>	185	344
	DIC	11.45	<u>352</u>	214	354
Estándar de recuperación	[² H ₁₆]-BPA	9.66	<u>368</u>	386	217
	KP	10.83	<u>311</u>	312	295
Estándar interno	4-n-NP	8.27	<u>179</u>	292	
	CFA	7.75	<u>143</u>	271	243

La integración de los cromatogramas, que consiste en establecer la base de los picos hasta la cual se calculará el área bajo la curva o la altura del pico, se hizo manualmente en todos los casos. Para el cálculo de las concentraciones se emplearon los métodos del estándar interno y el estándar externo. El estándar externo se utilizó para calcular la concentración en cada muestra mediante una regla de tres en la cual se comparó la respuesta de la muestra con la respuesta del estándar

externo para cada analito de interés (Ecuación 2). El estándar interno se utilizó para construir un factor de corrección que multiplica a la concentración de cada analito determinada con el estándar externo (Ecuaciones 3 y 4).

Ecuación 2 - Cálculo de concentración absoluta con estándar externo

$$\chi_{Aim} = \frac{R_{im} * \chi_{iee}}{R_{iee}}$$

Ecuación 3 - Factor de corrección por estándar interno

$$FCEI = \frac{R_{Eiee}}{R_{EIm}} * \frac{\chi_{EIm}}{\chi_{Eiee}}$$

Ecuación 4 - Concentración corregida por estándar interno

$$\chi_{Cim} = FCEI * \chi_{Aim}$$

Donde:

- χ_{Aim} [ng/ μ L] Concentración absoluta calculada del analito "i" en la muestra
- R_{im} Respuesta del analito "i" en la muestra
- χ_{iee} [ng/ μ L] Concentración nominal del analito "i" en el estándar externo
- R_{iee} Respuesta del analito "i" en el estándar externo
- FCEI Factor de corrección por estándar interno
- R_{Eiee} Respuesta del estándar interno en el estándar externo
- R_{EIm} Respuesta del estándar interno en la muestra
- χ_{EIm} [ng/ μ L] Concentración nominal del estándar interno en la muestra
- χ_{Eiee} [ng/ μ L] Concentración nominal del estándar interno en el estándar externo
- χ_{Cim} [ng/ μ L] Concentración corregida del analito "i" en la muestra

4.2.2 Ejecución y evaluación del método propuesto

El método propuesto fue evaluado con una corrida de análisis en la cual se prepararon triplicados de cada nivel de enriquecimiento (Tabla 11) y un blanco de método. El blanco de método consistió en una celda empacada con los substratos seleccionados y adicionada con los estándares de recuperación pero sin material vegetal. El blanco de método fue extraído y procesado como si se tratase de una muestra. Antes de la inyección, los estándares internos también fueron adicionados en el blanco de método. En dicha evaluación se consideraron los siguientes aspectos:

- Facilidad de preparación de muestra
- Color del extracto
- Facilidad de procesamiento de extractos
- Recuperaciones entre 70 y 120% con una desviación estándar relativa menor a 32%

4.2.3 Modificaciones I - Substratos, estándares y solventes de extracción

Con base en los resultados obtenidos de la evaluación del método propuesto inicialmente, se prescindió de los substratos utilizados excepto la tierra diatomácea y se disminuyó la cantidad de material vegetal por muestra de 1 a 0.5 g. Así también, se incrementaron las cantidades adicionadas de los estándares internos y de recuperación (de 100 a 250 ng), excepto en el caso del 4-n-NP, a fin de lograr una mejor integración de los picos de dichos compuestos; además se homogeneizaron los niveles de enriquecimiento de NP con los de los demás compuestos (Tabla 18). Los niveles de enriquecimiento concuerdan con los manejados por Wu et al. (2012).

Tabla 18 - Estándares de recuperación, enriquecimiento e internos del método modificado I

Función	Estándar	Nivel 0	Nivel bajo	Nivel alto
Recuperación	[² H ₁₆]-BPA KP	250 ng		
Enriquecimiento	NP BPA NPX IBU DIC	0 ng/g _{seco}	10 ng/g _{seco}	100 ng/g _{seco}
Interno	CFA	250 ng		
	4-n-NP	500 ng		

A fin de garantizar que la variabilidad observada en los resultados no se debiera a una respuesta no-lineal o no repetible del equipo en el rango de concentraciones propuesto, antes de continuar con otras pruebas se realizaron las pruebas de linealidad y repetibilidad detalladas más adelante en la sección 4.2.4 Validación del método modificado I. De igual manera, se compararon dos métodos de integración: el original propuesto por la técnica que considera el área bajo la curva y el propuesto que considera únicamente la altura del pico.

Finalmente, se realizó también una extracción comparando dos mezclas de solventes distintas, la original propuesta (Acetona:Hexano:Ácido acético 50:50:2) y una con MeOH en vez de

hexano (Acetona:MeOH:Ácido acético 50:50:2) a fin de seleccionar aquella que brindara mejores resultados. Dicha substitución obedece principalmente a las dificultades en el manejo de los extractos derivadas de la formación de precipitados al extraer las muestras con hexano, según indican Durán-Álvarez et al. (2009). Igualmente, existe evidencia de que la utilización de hexano favorece la extracción de pigmentos y grasas de las plantas (Tanoue et al., 2012). La substitución del hexano fue posible gracias a que inicialmente éste se utilizó por Durán-Álvarez et al. (2009) para extraer los compuestos más apolares y recalcitrantes adsorbidos fuertemente a la fase orgánica del suelo por interacciones hidrofóbicas, de los cuales ninguno se buscó analizar en este trabajo. Por otra parte, la elección del MeOH se basó en que es un solvente utilizado en varias técnicas de extracción de compuestos orgánicos en vegetales (Tabla 9). Para la extracción comparativa se prepararon muestras de cilantro y lechuga, esta última utilizada en el desarrollo de algunas técnicas analíticas (Calderón-Preciado et al., 2009 y Wu et al., 2012), con la finalidad de determinar si se obtienen mejores extracciones en otra matriz vegetal.

Para la prueba de extracción comparativa, se prepararon dos muestras de cilantro y dos de lechuga para cada nivel de enriquecimiento, una fue extraída con la mezcla con hexano y la otra con la mezcla con metanol. Se prepararon también dos blancos de método, uno para el hexano y otro para el metanol.

Con base en los resultados obtenidos en la extracción comparativa, se decidió continuar la experimentación con la mezcla de solventes consistente en Acetona:MeOH:Ácido acético 50:50:2.

4.2.4 Validación del método modificado I

Para la validación del método se llevaron a cabo diversas pruebas para determinar la linealidad y repetibilidad de la respuesta del equipo de GC-MS y para evaluar el comportamiento del método mediante el uso de muestras enriquecidas con el fin de determinar las recuperaciones y verificar el nivel de correlación entre la respuesta y la cantidad de analito en la muestra. Las pruebas se realizaron tomando como referencia lo reportado en Durán (2009).

4.2.4.1 Linealidad

Se prepararon por triplicado mezclas de los analitos y de los estándares internos y de recuperación para compuestos de carácter ácidos y compuestos fenólicos a diferentes concentraciones (Tabla 19) y se analizaron por sextuplicado. Se buscó que los coeficientes de correlación para la pareja respuesta del equipo/concentración fueran iguales o mayores que 0.99.

Tabla 19 - Soluciones para la prueba de linealidad

Solución	1	2	3	4	5	6	7
Concentración [ng/μL]	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10

4.2.4.2 Repetibilidad

Se prepararon por triplicado mezclas de los analitos, así como de los estándares internos y de recuperación para las dos clases de compuestos a diferentes concentraciones (Tabla 20) y se analizaron por sextuplicado. Se determinó el promedio de las respuestas para cada concentración y se calculó el coeficiente de variación (Cv). Se consideraron satisfactorios valores del coeficiente de variación menores al 15%.

Tabla 20 - Soluciones para prueba de repetibilidad

Solución	1	2	3	4
Concentración [ng/ μ L]	0.01	0.1	1	10

4.2.4.3 Especificidad

Se determinó mediante la sobreposición de cromatogramas correspondientes a los estándares externos y muestras con y sin enriquecimiento y se identificaron cuidadosamente los picos correspondientes a cada compuesto dentro de los cromatogramas de las muestras, tanto en los de respuesta total como en los de los iones principales de los compuestos.

4.2.4.4 Recuperación

Se realizó una corrida en la cual se prepararon por triplicado muestras de 0.5 g de cilantro y lechuga para cada nivel de enriquecimiento (Tabla 18) junto con un triplicado de blanco de método. Las muestras se extrajeron y procesaron según el método propuesto (sección 4.2.1) y tomando en cuenta las modificaciones especificadas en la sección 4.2.3. El método modificado I utilizado se expone en la Figura 15.

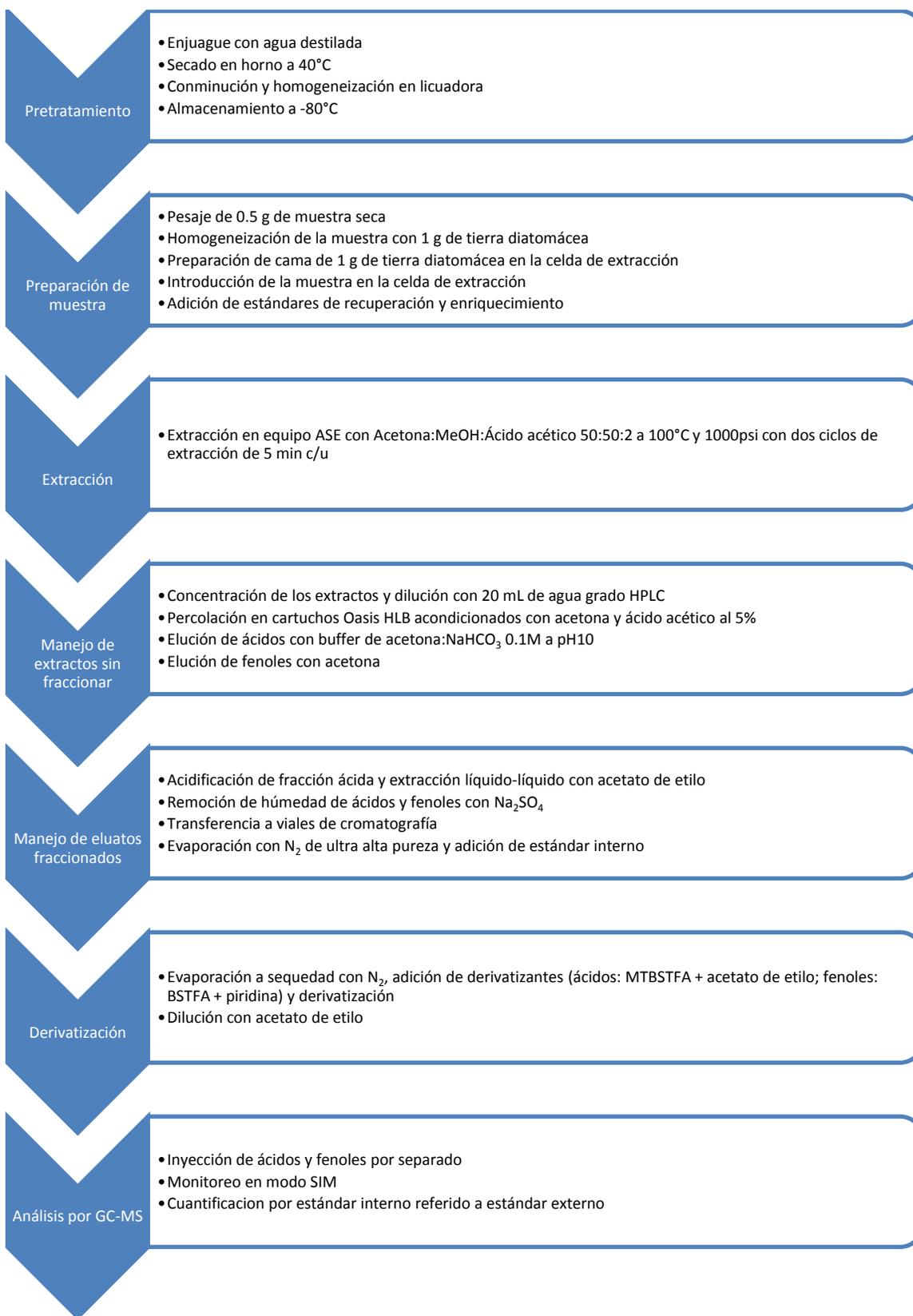


Figura 15 - Método modificado I

4.2.5 Modificaciones II - Limpieza mediante SPE en tándem

Como se puede ver en los resultados de la validación del método modificado I en el capítulo de resultados, sección 5.3.4, las recuperaciones fueron erráticas y los cromatogramas, aunque presentan una respuesta específica a todos los compuestos, tienen un nivel de ruido excesivo, lo cual impide la identificación de algunos analitos en el nivel bajo de enriquecimiento, y aun en el alto la dificultan. Adicionalmente, la gran cantidad de pigmentos presentes en la matriz al momento de la inyección pueden afectar las mediciones a corto y largo plazo, como se discutió en el apartado 3.4.5.2.1 «Efectos de matriz». Por estas razones se consideró indispensable contar con otro paso de purificación, puesto que la SPE con los cartuchos Oasis HLB fue insuficiente para remover los compuestos interferentes. De igual manera, se realizó una prueba comparativa de extracción utilizando diversas configuraciones de substratos en la que se determinó que la turbidez en los extractos obedecía a la utilización de tierra diatomácea. Las adecuaciones hechas al método fueron:

- Utilización de $MgSiO_3$ en vez de tierra diatomácea al momento de preparar la muestra.
- Centrifugado de los extractos diluidos para remover material el suspensión (Rodríguez Evangelista, 2014).
- Acidificación de los extractos hasta un valor de pH de 1.8 antes de la percolación por los cartuchos de SPE para garantizar que todos los compuestos se encontraran en su estado neutro y eliminar lípidos coextraídos (Yang et al., 2011 y Rodríguez Evangelista, 2014).
- Utilización de SPE en tándem con un cartucho Chromabond® SB de intercambio aniónico fuerte (SAX) con 500 mg de fase estacionaria.

La preparación de muestras consistió en colocar dos filtros de fibra de vidrio dentro de la celda de extracción de 11 mL, sobre los cuales se depositó la mezcla de muestra consistente en 4.5 g de $MgSiO_3$ y 0.5 g de cilantro previamente secado en horno y conminuido en una licuadora; los estándares de enriquecimiento y recuperación se colocaron directamente sobre la muestra una vez colocada dentro de la celda de extracción. Las extracciones se realizaron nuevamente con la mezcla de solventes consistente en MeOH:Acetona:Ácido acético 50:50:2. Los extractos fueron concentrados con el equipo CetriVap, previamente utilizado, durante 90 min a 60°C. Una vez concentrados, fueron diluidos con 20 mL de una solución de H_2SO_4 al 0.085%_{v/v} de pH 1.8; las diluciones fueron transferidas a viales de polipropileno de 50 mL para centrifugar, previamente enjuagados con acetona. Los viales de extracción de vidrio fueron enjuagados dos veces con 3 mL de la solución de H_2SO_4 ; ambos enjuagues se transfirieron a los viales de polipropileno correspondientes. Los viales de polipropileno fueron centrifugados durante 1 h a 3500 rpm para sedimentar la mayor parte del material vegetal en suspensión que no fue retenido por los filtros durante la extracción. Antes de la percolación de los extractos centrifugados, los cartuchos fueron acondicionados en dos etapas, una por separado (primera) y la otra en tándem (segunda). En la primera etapa, se hicieron percolar 8 mL de acetona por los cartuchos; momentos antes de que la totalidad de la acetona percolara a través de los cartuchos SB, éstos se coloracon sobre los cartuchos Oasis HLB y 10 mL de la solución de H_2SO_4 0.085% fueron adicionados. El flujo fue asistido con vacío. Inmediatamente antes que se vaciaran los cartuchos SB, fueron vertidos en

ellos los extractos centrifugados, evitando en todo momento que quedaran vacíos los cartuchos SB hasta haber percolado la totalidad del extracto. Los viales de polipropileno fueron enjuagados dos veces con 2 mL de la solución de H₂SO₄ y los enjuagues se vertieron en los cartuchos correspondientes. Finalmente, se hicieron pasar 3 mL de la solución de H₂SO₄ por los cartuchos SB y los cartuchos fueron descartados. Una vez habiendo percolado la totalidad de los extractos por los cartuchos Oasis HLB, se les adicionaron 2 mL de la solución de H₂SO₄ y se procedió con las eluciones de los compuestos de carácter ácido y los fenólicos mediante el método antes descrito, pero substituyendo el agua por solución de H₂SO₄ en el enjuague tras la elución de los compuestos de carácter ácido.

Finalmente, el lavado del Na₂SO₄ en la etapa de procesamiento de las muestras se hizo por triplicado para garantizar la mayor recuperación posible. El método modificado II se expone en la Figura 17.

4.2.6 Validación del método modificado II

Para la validación del método modificado II se siguió la misma estrategia propuesta para la validación del método modificado I (apartado 4.2.4). Brevemente, se prepararon por triplicado muestras de cada nivel de enriquecimiento (Tabla 21) y blancos de método. Se realizaron las extracciones y el procesamiento de los extractos según el método propuesto en la segunda modificación. Posteriormente, se realizó la detección y cuantificación mediante GC-MS para determinar las recuperaciones de cada compuesto en los niveles de enriquecimiento. A fin de garantizar la correspondencia entre las respuestas de los analitos en las muestras y de los analitos en los estándares, se utilizaron los mismos estándares para la preparación de los estándares externos y la adición de estándares de recuperación y enriquecimiento.

Los estándares de recuperación e internos se agregaron en la misma cantidad que los propuestos en el método original puesto que se supuso que con las adecuaciones hechas al método, las interferencias dejarían de presentar dificultades en la cuantificación de los estándares. Por otra parte, se mantuvieron los niveles de enriquecimiento propuestos en el método modificado I a fin de garantizar que la técnica validada sería capaz de cuantificar los analitos de interés a los niveles esperados en muestras ambientales.

Tabla 21 - Estándares de recuperación, enriquecimiento e internos del método modificado II

Función	Estándar	Nivel 0	Nivel bajo	Nivel alto
Recuperación	[² H ₁₆]-BPA KP	100 ng		
Enriquecimiento	NP BPA NPX IBU DIC	0 ng/g _{seco}	10 ng/g _{seco}	100 ng/g _{seco}
Interno	CFA	100 ng		
	4-n-NP	500 ng		

4.2.7 Límites de detección (LOD)

El cálculo de los límites de detección se hizo en base a la altura de la señal correspondiente al compuesto y la altura de la señal de ruido del equipo. Ambas señales se midieron manualmente, en una muestra con concentración conocida y el máximo nivel de ruido. Se estableció una regla de tres entre la altura del pico del compuesto y la altura del nivel de ruido, ambas medidas desde el eje.

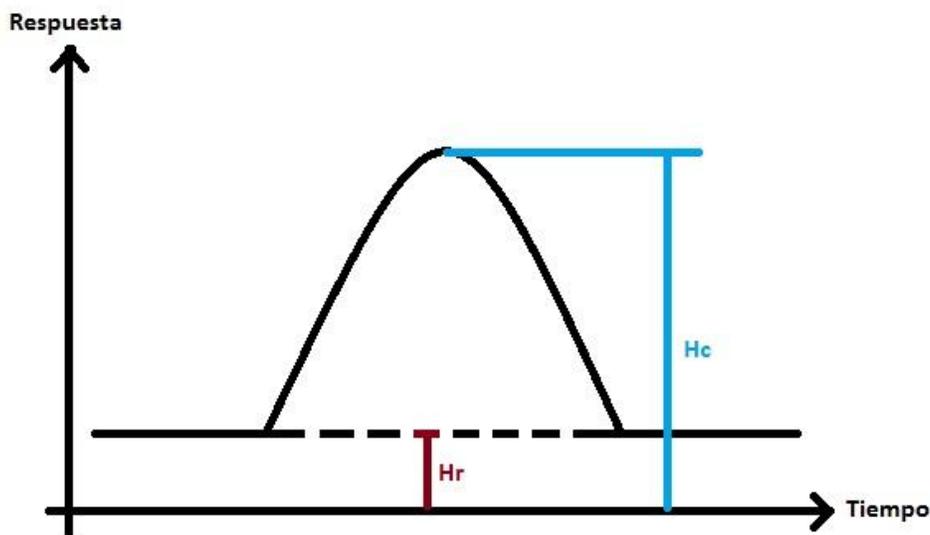


Figura 16 - Relación altura de pico/altura de ruido

Ecuación 5 - Cálculo del LOD

$$LOD = \frac{3H_r\chi_{nom}}{H_c}$$

Donde:

- χ_{nom} : concentración nominal del analito en la muestra enriquecida
- H_r : altura del nivel de ruido medida desde el eje
- H_c : altura del pico del compuesto medida desde el eje

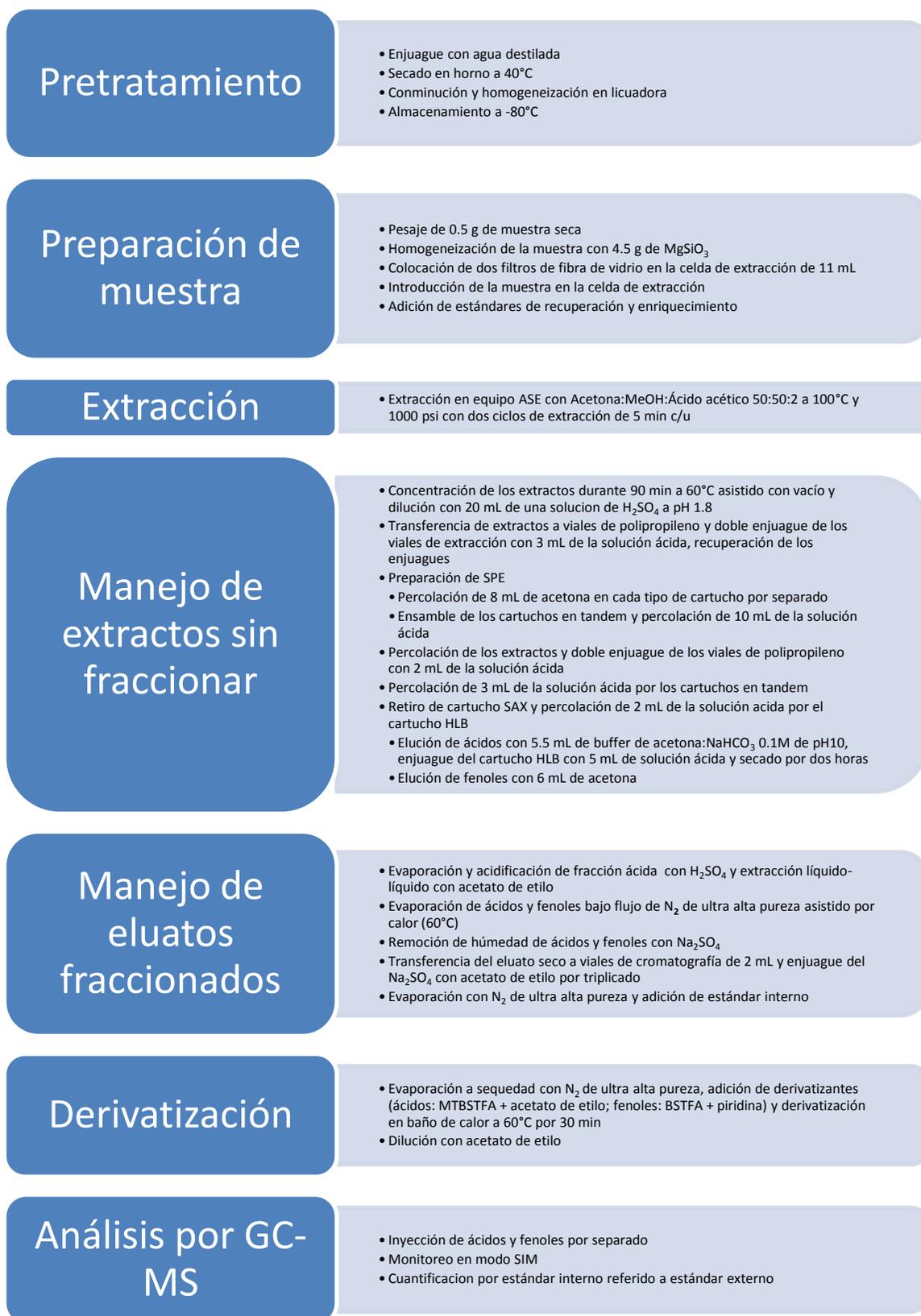


Figura 17 - Método modificado II

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en las diferentes etapas de la metodología se presentan a continuación. Éstos se resumen en tablas donde se reportan los resultados de los cálculos realizados para cada concepto de interés. Dentro de cada apartado se presenta primero un resumen de los resultados obtenidos, seguido por una discusión general sobre los resultados obtenidos y diversas determinaciones tomadas en función de los mismos para su aplicación en análisis subsecuentes, posteriormente, se presenta un análisis de los resultados para cada familia de compuestos.

Cabe resaltar que las principales problemáticas que llevaron a la implementación de la SPE en tándem, como método de purificación, fueron: i) la alta variabilidad en la respuesta de los analitos, reflejada en los altos valores del coeficiente de variación calculados para cada grupo de resultados, ii) la interferencia positiva que derivó en recuperaciones muy por arriba del 100% en varios casos, y iii) la imposibilidad de detectar y cuantificar algunos compuestos en los niveles bajos, como a continuación se detalla. Como se trató en el apartado 3.4.5.2.1 Efectos de matriz, la problemática observada se puede deber a la extracción de interferencias en altas concentraciones junto con los analitos. Adicionalmente, la literatura cita casos en los cuales las cuantificaciones en los niveles bajos de enriquecimiento han sido imposibles debido a los altos niveles de ruido (Winker et al., 2010). A pesar de dichos problemas, es posible asegurar que se obtuvo una respuesta específica en el equipo ante la presencia de cada uno de los analitos, ello con base en los cromatogramas presentados en el apartado 5.3.3 Especificidad, en los que se aprecia claramente una respuesta proporcional a la concentración en el tiempo de retención correspondiente, aún para compuestos con una gran interferencia como el DIC (Figura 19).

5.1 Ejecución y evaluación del método propuesto

Los extractos obtenidos fueron de un color verde oscuro, con un fuerte olor a cilantro, con turbiedad derivada de la presencia de un precipitado blanquecino fácilmente resuspendible, el cual posteriormente se determinó que estaba compuesto en parte por tierra diatomácea que logró llegar al vial de extracción, y con una delgada nata de color verde más oscuro. Durante la evaporación a sequedad para la derivatización, se formó en el fondo del vial una plasta de color verde muy oscuro y con un fuerte olor a cilantro que se atribuyó inicialmente a la presencia de los aceites esenciales de la planta, posiblemente mezclados con alguno de los reactivos utilizados durante la extracción de las muestras. Esto se expone en apartados posteriores.

Dada la escasa remoción de color y lo que se piensa es aceite esencial, se determinó poco provechoso continuar con la utilización de los diversos substratos propuestos inicialmente (i.e. tierra diatomácea, $MgSiO_3$ y Na_2SO_4 , SiO_2 y Al_2O_3) exceptuando a la tierra diatomácea, cuyas funciones fueron, por un lado, evitar el apelmazamiento de la muestra para impedir la formación de flujos preferenciales en la celda de extracción, y por el otro lado, evitar el paso de las partículas de menor tamaño obtenidas por la conminución del material seco. Debido a la suspensión del uso de estos materiales fue posible utilizar celdas de extracción de menor tamaño, disminuyendo con ello tanto el consumo de solventes como el tiempo requerido para la preparación de las muestras,

lo cual trajo como resultado una apreciable agilización en la ejecución de la técnica. Igualmente, al disminuir la cantidad de adiciones a la muestra, se redujeron posibles vías de contaminación.

La formación del precipitado antes mencionado derivó en el taponamiento de los cartuchos de SPE durante la percolación de los extractos, lo cual llevó a la prolongación de este paso, así como a la necesidad de usar mayor vacío y por más tiempo a fin de hacer pasar el extracto a través del cartucho y durante el paso de secado antes de la elución de la fracción fenólica. A fin de solucionar esto, la primer medida tomada fue la sustitución del hexano por otro solvente igualmente apto para realizar la extracción de los compuestos estudiados ya que, según reportan Durán-Álvarez et al. (2009), el precipitado se forma en presencia de hexano. Sin embargo, como se expondrá posteriormente en el apartado 5.4, la formación del precipitado obedece más bien a la utilización de tierra diatomácea en la extracción y no a la presencia de hexano en la mezcla de extracción. La sustitución del hexano por MeOH se consideró viable pues, como detallan Durán-Álvarez et al. (2009), la función del hexano es principalmente la extracción de los compuestos no polares adsorbidos fuertemente a la fracción orgánica del suelo mediante interacciones hidrofóbicas. Según da constancia la literatura, el hexano se ha utilizado para la remoción de grasas y pigmentos coextraídos (Tanoue et al., 2012); debido a ello, otro motivo para substituir el hexano en la mezcla de extracción fue disminuir la co-extracción de grasas y aceites vegetales de la muestra. Dicha co-extracción se hizo evidente por la formación de una interfase, que evidencia la inmiscibilidad de la mezcla hexano:acetona.

En corridas analíticas subsecuentes se decidió homogeneizar los niveles de enriquecimiento para todos los analitos con la finalidad de garantizar que el método fuese capaz de detectar y cuantificar la presencia de micro-contaminantes en el mismo rango de concentraciones para todos los analitos de estudio.

Con base en los resultados obtenidos en la ejecución del método propuesto, se tomó la determinación de reducir la cantidad de muestra utilizada de 1 a 0.5 g para todas las corridas analíticas subsecuentes; esta cantidad de muestra es consistente con lo reportado para técnicas analíticas modernas (Calderón-Preciado et al., 2009 y Wu et al., 2012). Dicha reducción también obedece a una estrategia alternativa para disminuir la cantidad de interferencias co-extraídas en la muestra y que se inyectan en el equipo de GC-MS, reduciendo con ello la saturación del detector y la caída en la sensibilidad y la reproducibilidad de los resultados debido a los efectos de matriz puntuales y acumulativos discutidos anteriormente (apartado 3.4.5.2.1 Efectos de matriz).

Debido a la variabilidad de los FCEI y las recuperaciones calculadas para los estándares de recuperación, se decidió incrementar la cantidad adicionada de los estándares internos y de recuperación (excepto 4-n-NP) en corridas subsecuentes a fin de facilitar la correcta integración de los picos de cada compuesto, en particular de los correspondientes a los estándares internos pues la corrección de las concentraciones depende de dicha integración. En todos los casos, la respuesta del 4-n-NP fue consistente y claramente identificable con un pico bien definido, por lo tanto no se consideró necesario hacer modificaciones a la cantidad agregada de este estándar.

5.1.1 Compuestos de carácter ácido

Tabla 22 - Recuperaciones promedio para compuestos de carácter ácido por nivel de enriquecimiento

Promedio de recuperaciones por nivel $\pm \sigma$ [%]			
Nivel	IBU	NPX	DIC
0*	1.35 \pm 1.35	142.7 \pm 69.05	ND
bajo	132.92 \pm 22.49	ND	85.66 \pm 26.56
alto	134.64 \pm 66.54	11.42	89.57 \pm 49.15

* ng/g_{seco}

En la Tabla 22 se muestran las recuperaciones promedio para los niveles bajo y alto de enriquecimiento manejados en la ejecución y evaluación del método propuesto (Tabla 11).

Para el IBU, las recuperaciones fueron insatisfactorias en ambos niveles, excediendo el 120% máximo. En el caso del NPX, la falta de detección del compuesto en el nivel bajo se debe a que la concentración calculada en este nivel fue menor a la calculada para el nivel 0 (Tabla 25); lo mismo sucedió en la mayoría de las inyecciones del nivel alto, de ahí que la recuperación en el nivel alto sea de sólo 11.4% y no haya sido posible determinar la desviación estándar. Las recuperaciones promedio del DIC fueron similares para los niveles bajo y alto, sin embargo en el nivel alto la variabilidad de las respuestas excedió el límite aceptable con una desviación estándar de ~49% y una desviación estándar relativa mayor a 32%.

En la Tabla 23 se encuentran las cantidades y concentraciones de los analitos detectadas en los blancos de método (Blanco) y en los blancos de muestra (Nivel 0).

Tabla 23 - Cantidades y concentraciones de los analitos encontradas en blancos

Cantidades y concentraciones encontradas en blancos			
Nivel	IBU	NPX	DIC
Blanco*	0.38 \pm 0.08	1.5 \pm 0.25	1.06 \pm 0.76
0**	1.35 \pm 1.35	142.7 \pm 69.05	ND

* ng

** ng/g_{seco}

En los blancos de método se detectaron cantidades pequeñas para todos los analitos de carácter ácido, siendo la menor de 0.38 ng para el IBU y la mayor de 1.5 ng para el NPX. En el nivel 0 se tuvo una respuesta excesivamente grande para el NPX (~143 ng/g_{seco}) que probablemente se debe a interferencias, pues no guarda relación con ninguna de las cantidades reportadas en las técnicas analíticas revisadas en la Tabla 10. La respuesta del equipo para DIC en el nivel 0 fue menor que la obtenida para el blanco de método, por lo tanto se reporta como ND.

5.1.2 Compuestos fenólicos

Tabla 24 - Recuperaciones promedio para compuestos fenólicos por nivel de enriquecimiento

Promedio de recuperaciones por nivel $\pm \sigma$ [%]		
Nivel	NP	BPA
0*	942.3 \pm 65.05	8.9 \pm 5.5
bajo	76.38 \pm 58.5	87.34 \pm 33.38
alto	97.09 \pm 10.14	85.15 \pm 7.44

* ng/g_{seco}

En la Tabla 24 se pueden apreciar las recuperaciones de los analitos con carácter fenólico.

Las recuperaciones del BPA en los niveles bajo y alto fueron satisfactorias y prácticamente iguales (85 y 87%). Sin embargo, en el nivel bajo la variabilidad de las respuestas fue mucho mayor que en el alto y quedó fuera del rango aceptable con una desviación estándar relativa de 38%. El caso del NP fue similar al del NPX, las respuestas de todas las repeticiones para dos de las tres muestras en el nivel bajo presentaron recuperaciones negativas; de manera que se consideraron como *No Detectado* (ND) y no fueron incluidas en el cálculo de la recuperación promedio. La repetibilidad de la medición fue insatisfactoria dada la alta variabilidad de la respuesta (desviación estándar relativa ~77%). En contraste a los niveles medio y bajo, la respuesta del NP fue buena en el nivel alto de enriquecimiento, con una recuperación promedio próxima al 100% y una desviación estándar de ~10%.

En la Tabla 25 se encuentran las cantidades y concentraciones de los analitos detectadas en los blancos de método (Blanco) y en los blancos de muestra (Nivel 0).

Tabla 25 - Cantidades y concentraciones de los analitos encontradas en blancos

Cantidades y concentraciones encontradas en blancos		
Nivel	NP	BPA
Blanco*	303.75 \pm 16.4	11.95 \pm 1.05
0**	942.3 \pm 65.05	8.9 \pm 5.5

* ng

** ng/g_{seco}

Se detectaron concentraciones de 303.76 y 11.95ng/g_{seco} para NP y BPA, respectivamente, que pueden obedecer a la ubicuidad de dichos analitos.

En el nivel 0, se detectaron concentraciones muy grandes de NP en el nivel 0 (942.29ng/g_{seco}) que pueden deberse a contaminación de la muestra al ser lavada antes de su venta. De igual manera, las concentraciones de BPA detectadas se pueden deber a contaminación antes de la adquisición de la muestra o durante su transporte en una bolsa plástica. Finalmente, no es posible descartar que al menos una parte de las concentraciones detectadas en el nivel 0 efectivamente correspondan a una asimilación en el tejido vegetal durante su crecimiento.

5.1.3 Estándares de recuperación

En la Tabla 26 se muestran las recuperaciones promedio de los estándares de recuperación en los blancos y los niveles 0, bajo y alto de enriquecimiento.

Tabla 26 - Recuperaciones promedio de los estándares de recuperación

Promedio de recuperaciones por nivel $\pm \sigma$ [%]		
Nivel	KP	[² H ₁₆]-BPA
Blanco	60.16 \pm 0.72	87.95 \pm 26.61
0	198.39 \pm 44.93	137.14 \pm 30.95
bajo	95.7 \pm 17.69	108.02 \pm 22.1
alto	139.07 \pm 85.32	112.45 \pm 23.54

El KP como estándar de recuperación tuvo una recuperación promedio excesivamente alta en las muestras del nivel 0 y el nivel alto (mayor a 120% en ambos casos) y una recuperación aceptable en el nivel bajo (~96%). Las desviaciones estándar son, en general, grandes en todos los casos, si bien guarda relación con la magnitud de la recuperación promedio y cumple con el criterio de aceptación establecido previamente. En el nivel alto la desviación estándar es excesivamente grande y no cumple con el criterio de aceptación establecido. Adicionalmente, se aprecia lo que parece ser un fenómeno de amplificación de la respuesta al comparar las recuperaciones promedio de las muestras y los blancos puesto que la recuperación en los blancos fue de apenas 60% y en los tres niveles de enriquecimiento fue mayor a 90%, siendo que la cantidad adicionada es la misma. El KP puede haber sido afectado de manera importante por las interferencias que no fueron removidas durante la purificación.

El [²H₁₆]-BPA tuvo una buena recuperación en los blancos de método (~88%) con una desviación estándar de ~27%. Las recuperaciones para los niveles bajo y alto de enriquecimiento fueron satisfactorias y prácticamente iguales (~108 y ~112%, respectivamente). Para el nivel 0, la recuperación promedio de 137% excedió el límite superior del intervalo de aceptabilidad. En todos los casos las desviaciones estándar fueron aceptables. En los niveles bajo y alto, el comportamiento del estándar de recuperación [²H₁₆]-BPA fue similar al de los analitos fenólicos, sin embargo aquellos presentaron mayores variaciones en la respuesta en el nivel bajo de enriquecimiento.

5.2 Extracción comparativa con MeOH y hexano

Las recuperaciones obtenidas de extracciones realizadas con las mezclas de solventes acetona:hexano:Ácido acético y acetona:MeOH:Ácido acético, ambas 50:50:2, fueron evaluadas, y los resultados se discuten a continuación. En general, los extractos obtenidos con ambos solventes fueron similares en color; aunque con el metanol se observó que el sobrenadante de color verde más oscuro presente inmediatamente después de la extracción era menor.

5.2.1 Compuestos de carácter ácido

De acuerdo con lo mostrado en la Tabla 27, ambas mezclas de solventes tuvieron un comportamiento similar en la recuperación de los analitos extraídos. En el nivel bajo se tuvieron recuperaciones promedio excesivamente altas para todos los analitos y el NPX en cilantro extraído con MeOH. En particular, parece que las interferencias extraídas con MeOH dificultan más la cuantificación de DIC en cilantro que aquellas extraídas con hexano; sin embargo, no es posible asegurar que en el nivel bajo alguno de los solventes tuviera un comportamiento claramente superior. En la Figura 18 se aprecia el cromatograma para el tiempo de retención correspondiente al DIC; la línea negra corresponde al estándar mientras que la verde y la morada corresponden a las extracciones hechas con MeOH y la azul y la roja a las extracciones hechas con hexano. Como se puede ver, aun en el caso del hexano, el nivel de interferencia únicamente permite registrar la respuesta al compuesto en el nivel alto de enriquecimiento (línea azul). La variabilidad en la respuesta parece estar estrechamente relacionada tanto con el solvente utilizado como con la matriz, ello se puede ver tomando como ejemplo el incremento porcentual en los coeficientes de variación del NPX y el IBU para las extracciones en cilantro del nivel bajo. De igual manera, un mismo solvente tiene respuestas muy diferentes según la matriz, como se puede ver en el coeficiente de variación calculado para el IBU extraído con MeOH en cilantro y lechuga, o del NPX extraído con hexano.

En el nivel alto, la variabilidad de las respuestas fue más baja con MeOH en la mayoría de los casos, sin embargo, la variabilidad para ambas mezclas se mantuvieron por debajo del 32%, de manera que con ambas los resultados fueron satisfactorios. Resulta de interés que la cuantificación del DIC en cilantro en el nivel alto únicamente fue posible con hexano, con una recuperación promedio de 106.3%.

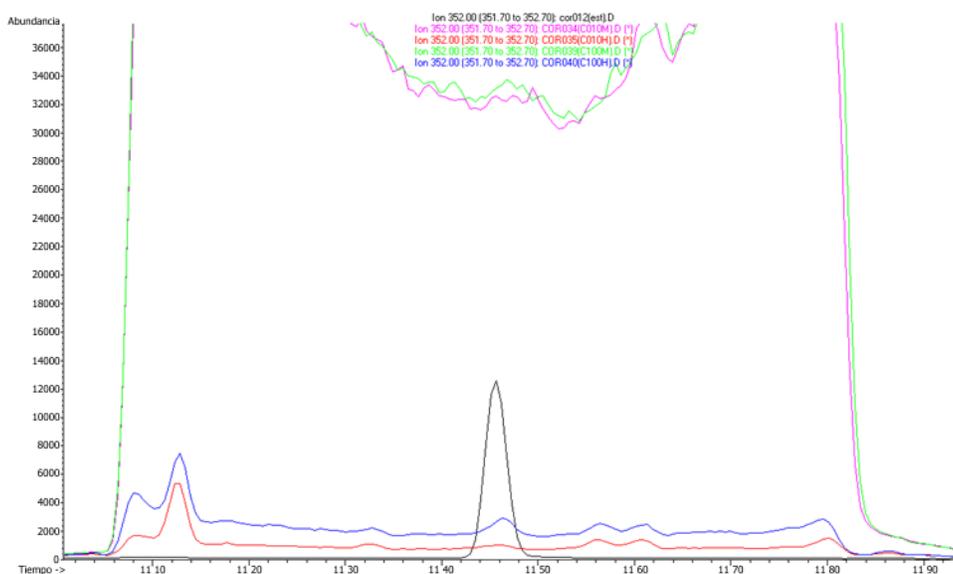


Figura 18 - Interferencias para DIC en extracciones con hexano y con MeOH

Tabla 27 - Recuperaciones y desviaciones estándar para la prueba de extracción comparativa con lechuga y cilantro de compuestos de carácter ácido.

Planta	Nivel	Promedio de recuperaciones por nivel $\pm \sigma$ [%]					
		IBU		NPX		DIC	
		Met	Hex	Met	Hex	Met	Hex
Cilantro	0*	9.30 \pm 4.89	8.57 \pm 0.46	16.62 \pm 12.21	3.22 \pm 1.40	ND	14.15
	bajo	447.77 \pm 129	245.6 \pm 32.87	117.77 \pm 42.57	862.15 \pm 93.26	ND	195.85 \pm 104.38
	alto	177.3 \pm 9.61	166.6 \pm 7.01	147.96 \pm 26.06	150.28 \pm 8.78	ND	106.3 \pm 14.31
Lechuga	0*	4.18 \pm 1.65	12.46 \pm 5.79	3.29	1.56 \pm 1.35	ND	ND
	bajo	215.81 \pm 12.07	223.21 \pm 89.38	160.64 \pm 32.57	198.16 \pm 70.96	ND	262.7 \pm 153.25
	alto	193.28 \pm 5.09	153.94 \pm 18.12	170.08 \pm 6.02	10.56 \pm 2.59	107.95 \pm 15.47	100.62 \pm 7.22

* ng/g _{seco}

5.2.2 Compuestos fenólicos

Los resultados para las muestras del nivel bajo de enriquecimiento (Tabla 28) fueron desfavorables en todos los casos. En el nivel alto, las recuperaciones para NP con MeOH fueron de 91% para cilantro y lechuga mientras que para BPA fueron de 127 y 109%, siendo menor la recuperación observada para lechuga. La variabilidad en las respuestas fue máxima para el NP en lechuga con una desviación estándar relativa de 28%. Las recuperaciones calculadas para las extracciones con hexano fueron en general menores, siendo la mínima de ~15% para el BPA en lechuga y la máxima de 93% para NP en lechuga. Las respuestas para BPA y NP en cilantro fueron menores en ambos casos para el hexano que para el MeOH. La variabilidad de las respuestas para NP en cilantro extraído con hexano presentó el máximo absoluto de toda la prueba con una desviación estándar relativa de 109%. La desviación estándar relativa calculada para las extracciones con hexano (8 a 109%) en general fue mayor que el calculado para los extractos obtenidos con MeOH (~5 a 28%), esto se puede deber a que, como se mencionó previamente, el hexano favorece la extracción de pigmentos, grasas y aceites, interferencias que pueden afectar el desempeño del equipo.

Tabla 28 - Recuperaciones y desviaciones estándar para la prueba de extracción comparativa con lechuga y cilantro de compuestos fenólicos.

Planta	Nivel	Promedio de recuperaciones por nivel $\pm \sigma$ [%]			
		NP		BPA	
		Met	Hex	Met	Hex
Cilantro	0*	190.75 \pm 9.43	448.85 \pm 39.31	34.35 \pm 3.79	62.46 \pm 5.58
	bajo	241.27 \pm 180.89	181 \pm 144.6	133.5 \pm 17.64	ND
	alto	91.04 \pm 11.78	45.92 \pm 50.08	126.87 \pm 6.24	74.66 \pm 6.22
Lechuga	0*	9.10 \pm 2.60	206.59 \pm 16.28	48.51 \pm 7.64	113.76 \pm 3.12
	bajo	ND	381.09 \pm 136.62	167.91 \pm 41.42	ND
	alto	91.05 \pm 25.54	93.08 \pm 19.68	108.55 \pm 7.14	14.87 \pm 5.9

* ng/g _{seco}

5.2.3 Estándares de recuperación

En la Tabla 29 se muestran las recuperaciones promedio de los estándares de recuperación en los blancos y los niveles 0, bajo y alto de enriquecimiento. Los resultados correspondientes al estándar de recuperación [²H₁₆]-BPA en cilantro y los blancos de método extraídos con la mezcla acetona:hexano:ácido acético no se incluyen ya que no se les adicionó el estándar de recuperación.

Tabla 29 - Recuperaciones promedio de los estándares de recuperación

		Promedio de recuperaciones por nivel $\pm \sigma$ [%]				
Planta	Nivel	KP		[² H ₁₆]-BPA		
		Met	Hex	Met	Hex	
Cilantro	Blanco	84.66 \pm 4.62	91.61 \pm 2.58	109.39 \pm 3.58	No se adicionó	
	0	131.96 \pm 12.74	139.25 \pm 11.66	78.61 \pm 33.74		
	bajo	112.48 \pm 4.59	141.33 \pm 4.82	115.14 \pm 19.13		
	alto	120.89 \pm 5.67	121.48 \pm 7.18	115.5 \pm 21.07		
Lechuga	Blanco	84.66 \pm 4.62	91.61 \pm 2.58	109.39 \pm 3.58		
	0	134 \pm 9.29	145.25 \pm 84.64	122.55 \pm 12.79		135.25 \pm 3.93
	bajo	115.9 \pm 3.13	141.51 \pm 64.82	132.92 \pm 7.26		142.64 \pm 4.21
	alto	120.43 \pm 3.09	107.6 \pm 8.06	133.38 \pm 9.82		141 \pm 7.45

En todos los casos correspondientes al KP en cilantro, las extracciones con hexano tuvieron recuperaciones mayores que las extracciones hechas con MeOH y en la mayoría de los casos fueron superiores a 120%. Las desviaciones estándar fueron bajas en todos los casos para ambas mezclas utilizadas, cumpliendo con el criterio de aceptación propuesto. Para las muestras de lechuga, las extracciones con hexano tuvieron recuperaciones más altas que extraídas con MeOH; adicionalmente, las desviaciones estándar fueron demasiado elevadas, excediendo el máximo aceptable. En el caso del KP, el MeOH tuvo un mejor desempeño global con más valores calculados dentro del rango aceptable.

En las muestras de lechuga, el [²H₁₆]-BPA tuvo recuperaciones más próximas al máximo aceptable en los extractos con MeOH. En todos los casos las recuperaciones de este estándar surrogado fueron mayores a 120% excepto para los blancos extraídos con MeOH. Las desviaciones estándar fueron bajas en todos los casos.

5.3 Validación del método modificado I

Las pruebas para validar el método modificado I se realizaron según el orden en que fueron propuestas en la sección de Metodología y los resultados se presentan en el mismo orden.

5.3.1 Linealidad

Se evaluó la linealidad en la respuesta del equipo a diferentes concentraciones de los analitos de interés y de los utilizados como estándares internos y de recuperación. Se aprovechó la prueba para determinar si es factible cambiar el método de integración para considerar la altura del pico como respuesta en vez del área bajo la curva.

En la Tabla 30 se encuentran los coeficientes de correlación lineal (R^2) calculados. Como se puede apreciar, el coeficiente R^2 para el DIC está ligeramente por debajo del 0.99 esperado, para ello se recalcularon los coeficientes considerando únicamente las concentraciones entre 0.01 y 1 ng/ μ L, en este rango la respuesta del DIC es claramente lineal con un coeficiente R^2 de 0.99. Se puede apreciar que la diferencia entre los coeficientes R^2 calculados para la integración con áreas bajo la curva y aquellos calculados para la integración con altura de pico son prácticamente

iguales, de modo que se puede utilizar la altura de pico como unidad de respuesta para los compuestos de carácter ácido sin problema alguno.

Tabla 30 - Coeficientes R^2 de la prueba de linealidad considerando altura y área para compuestos de carácter ácido

Compuesto	R^2 para 0.01-10ng/ μ L		R^2 para 0.01-5ng/ μ L	
	Área	Altura	Área	Altura
IBU	0.9915	0.9901	0.9959	0.9940
NPX	0.9997	0.9993	0.9959	0.9932
DIC	0.9692	0.9695	0.9991	0.9980

En la Tabla 31 se puede ver que lo mismo ocurre para los compuestos fenólicos. Las respuestas del NP tienden más a la linealidad en el rango de concentración de 0.01 a 1 ng/ μ L mientras que el R^2 para el BPA disminuye ligeramente en dicho rango sin descender del 0.99. Al igual que para los compuestos de carácter ácido, las diferencias entre la integración por áreas y por alturas de pico es despreciable.

Tabla 31 - Coeficientes R^2 de la prueba de linealidad considerando altura y área para compuestos fenólicos

Compuesto	R^2 para 0.01-10ng/ μ L		R^2 para 0.01-5ng/ μ L	
	Área	Altura	Área	Altura
NP	0.9849	0.9851	0.9950	0.9946
BPA	0.9998	0.9998	0.9973	0.9968

5.3.2 Repetibilidad

En la prueba de repetibilidad se evaluó la variación en la respuesta cromatográfica para un mismo compuesto en cuatro niveles de concentración a lo largo de seis repeticiones. Se evaluó también la diferencia entre la variación de las integraciones considerando el área bajo la curva y la altura de pico.

En la Tabla 32 se muestran los coeficientes de variación para las respuestas de los diferentes niveles de concentración obtenidas de la inyección por sextuplicado. Como se puede ver, las menores variaciones en todos los casos y para ambos métodos de integración se tuvieron para la concentración de 1 ng/ μ L y los mayores para la de 0.01 ng/ μ L. No obstante, dichas variaciones fueron mínimas en todos los casos, siendo el máximo absoluto 4% para la integración por área bajo la curva de y 4.7% para la altura, ambos correspondientes al NPX a 0.01 ng/ μ L. La mayor variación en las respuestas para NPX concuerda con los resultados previamente analizados en los cuales las mayores desviaciones estándar se tuvieron para el NPX.

Tabla 32 - Coeficientes de variación para altura de pico y área bajo la curva para la prueba de repetibilidad para los compuestos de carácter ácido

Concentración [ng/μL]	Cv para áreas [%]			Cv para alturas [%]		
	IBU	NPX	DIC	IBU	NPX	DIC
0.01	3.50	4.00	1.90	3.10	4.70	2.60
0.1	1.20	1.90	2.20	1.90	2.00	3.10
1	0.70	0.90	1.30	1.10	0.80	1.80
10	0.90	1.20	1.40	2.80	3.10	1.90

En la Tabla 33 se muestran los coeficientes de variación para las respuestas de los diferentes compuestos fenólicos. Se puede apreciar que la variación es más homogénea a lo largo de las diferentes concentraciones probadas, que aquella observada para los compuestos de carácter ácido. Las menores y mayores variaciones se tuvieron, en general, en la concentración de 1 ng/μL y de 0.01 ng/μL, respectivamente, excepto para el BPA, el cual tuvo la mayor variación a la concentración de 0.1 ng/μL. El valor máximo de variación para el área bajo la curva fue de 6.8% para BPA a 0.1 ng/μL, mientras que para la altura de pico fue de 6.5% tanto para NP a 0.01 ng/μL como para BPA a 0.1 ng/μL.

Tabla 33 - Coeficientes de variación (Cv) para altura de pico y área bajo la curva para la prueba de repetibilidad para los compuestos fenólicos

Concentración [ng/μL]	Cv para áreas [%]		Cv para alturas [%]	
	NP	BPA	NP	BPA
0.01	4.60	4.80	6.50	4.50
0.1	2.70	6.80	3.30	6.50
1	2.00	2.90	2.00	2.60
10	3.40	2.90	3.30	2.60

Con base en las pruebas de linealidad y repetibilidad, se decidió realizar las integraciones de los cromatogramas obtenidos en el análisis de las muestras considerando la altura del pico como respuesta, puesto que permite establecer más fácilmente una línea base de referencia y las diferencias en el coeficiente R^2 , para ambos métodos, son despreciables. Únicamente para el NP se conservó la integración considerando el área bajo la curva ya que, al ser una mezcla de isómeros, su respuesta está repartida en varios picos dentro de un intervalo de aproximadamente 0.35 segundos. Puesto que la integración por altura de pico considera únicamente la mayor altura medida y no es posible afirmar con seguridad la predominancia de un isómero sobre los demás en todos los casos, la única manera de considerarlos todos es utilizando como respuesta el área bajo la curva.

5.3.3 Especificidad

A fin de comprobar la especificidad del análisis, se compararon los cromatogramas del estándar externo con los de las muestras en los tres niveles de enriquecimiento para compuestos de carácter ácido y para los compuestos fenólicos.

En la Figura 19, se observan los cromatogramas comparativos de los iones específicos de cada compuesto para los tres niveles de enriquecimiento. En el eje de las abscisas se encuentra el tiempo de retención mientras el eje de las ordenadas corresponde a la abundancia. La línea negra corresponde al estándar externo, mientras que las líneas morada, roja y verde corresponden a los niveles de enriquecimiento de 0, 10 y 100 ng/g_{seco}, respectivamente. En los tres niveles resulta evidente que se tiene una respuesta específica a la presencia del analito y que esta respuesta es proporcional a la concentración en la que se encuentra dicho compuesto. Sin embargo, es posible apreciar una muy fuerte interferencia en el tiempo de retención correspondiente al DIC, así como tres picos considerablemente bien definidos que, sin embargo, no corresponden al analito pues, como se puede apreciar, no coinciden con el tiempo de retención del estándar (11.45 min.).

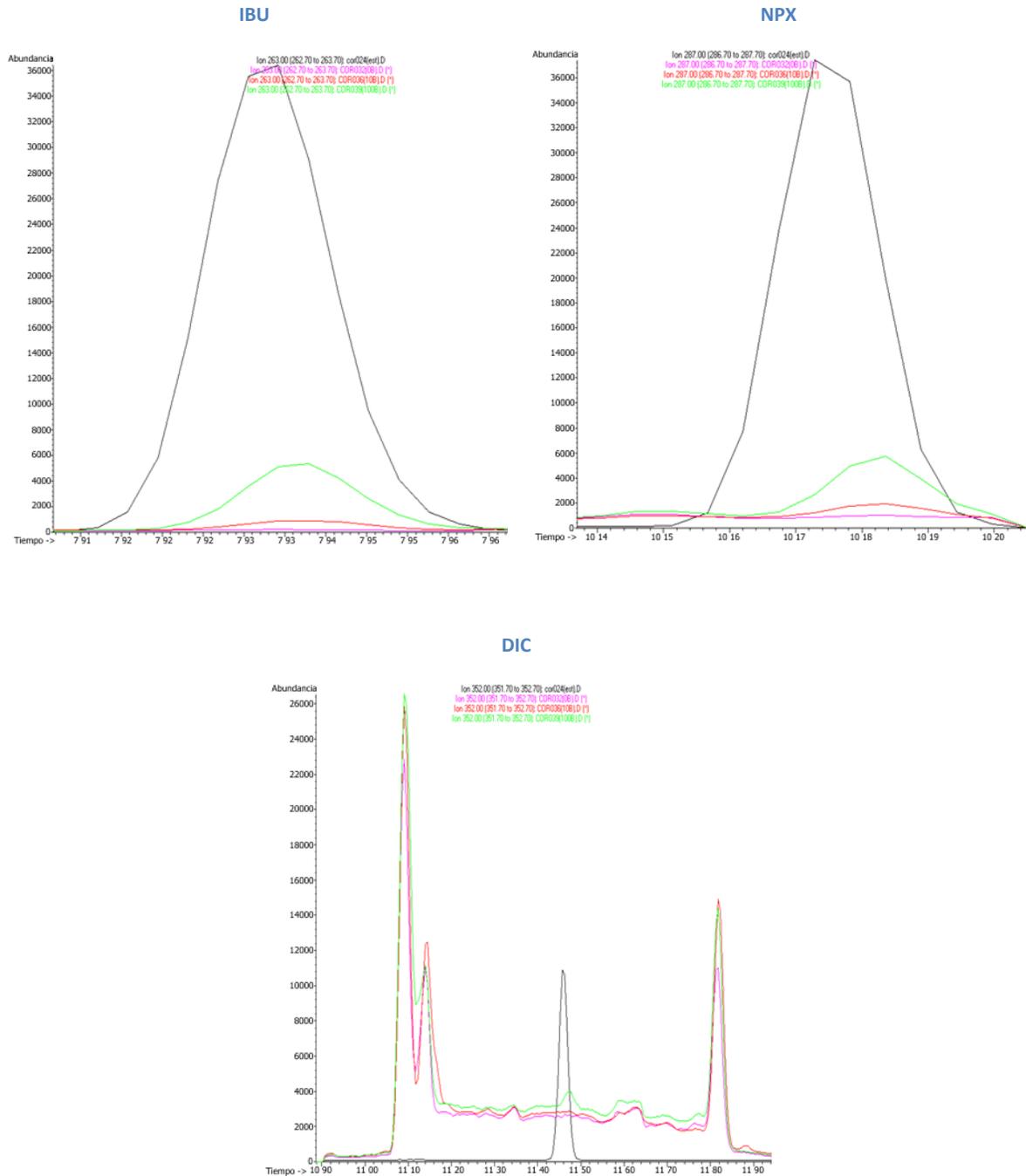


Figura 19 - Cromatogramas comparativos del ión característico para los tres niveles de enriquecimiento de los compuestos de carácter ácido. Especificidad de la respuesta.

En la Figura 20, se pueden apreciar los cromatogramas para los compuestos fenólicos. Tanto para el BPA como para el NP, se puede ver que la línea correspondiente al nivel 0 presenta cierta respuesta en los cromatogramas. Esto se puede deber a que el BPA es un compuesto que se encuentra en gran cantidad de productos y, por lo tanto, es difícil evitar que las muestras entren en contacto con el compuesto. El NP puede entrar en contacto con las muestras por asimilación o adsorción cuando son regadas con agua residual, por la aplicación de pesticidas que contienen

nonilfenoles polietoxilados que posteriormente se transforman en nonilfenol así como por contacto con diversos materiales de empaque (Guenther et al., 2002). Por otra parte, frecuentemente los vegetales son enjuagados antes de ser puestos a la venta, de manera que es probable que durante dicho lavado hayan entrado en contacto con los analitos al ser enjuagados con agua contaminada. La presencia de BPA y NP ha sido reportada tanto en agua de fuentes subterráneas como en agua de la llave y agua embotellada (Casajuana & Lacorte, 2003; Gibson et al., 2007 y Li et al., 2010). Finalmente, no se debe descartar la posibilidad de que la respuesta de los analitos en las plantas analizadas se deba a una asimilación de los micro-contaminantes durante su crecimiento. El desplazamiento del tiempo de retención en el cual aparece el pico para el BPA se puede deber a efectos de matriz como por ejemplo la interacción de los compuestos propios de la muestra con el analito (Hajšlová & Zrostlíková, 2003; Johnson et al., 2003 y Gong et al., 2004). Independiente de esto, se puede apreciar que la respuesta es proporcional a la cantidad presente en ambos casos.

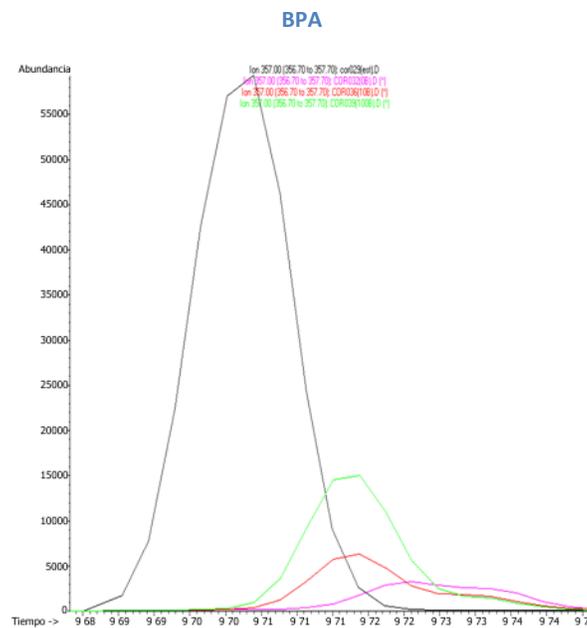
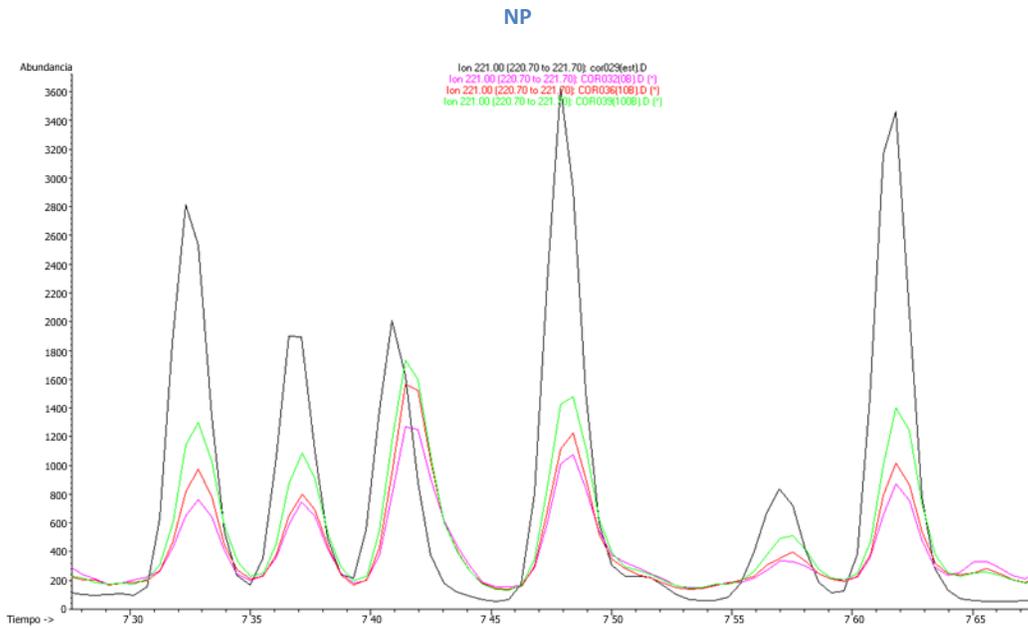


Figura 20 - Cromatogramas comparativos del ión característico para los tres niveles de enriquecimiento de los compuestos fenólicos. Especificidad de la respuesta.

5.3.4 Recuperación

La recuperación de los analitos al final de una corrida se evaluó tanto para cilantro como para lechuga, en los tres niveles de enriquecimiento propuestos para el método modificado (Tabla 18).

En general, las recuperaciones de los analitos de carácter ácido fueron más altas para el cilantro, mientras que las recuperaciones de los fenoles fueron mejores en las extracciones en la

lechuga. En ambos casos, los extractos fueron coloridos, sin embargo los extractos de cilantro tuvieron un color verde muy intenso, mientras que los de lechuga mostraron un color ligeramente dorado (Figura 21). Se pudo observar que, en todos los casos, el color, y su diferencia según la planta, se mantuvo aun después de la limpieza mediante SPE (Figura 22), sugiriendo que estas impurezas fueron eluidas por la acetona. Lo anterior fue particularmente notorio en la elución de los compuestos fenólicos, cuya elución se lleva a cabo con acetona pura. La inyección de muestras con alto contenido de pigmentos y otros coextractos de la matriz vegetal resulta desfavorable, no sólo porque éstas representan una serie de interferencias para las muestras analizadas, sino que tales interferencias afectarán el análisis de muestras futuras, ya que la presencia de un alto contenido de pigmentos y compuestos orgánicos favoreció el rápido ensuciamiento de la fuente de emisión de electrones en el espectrómetro de masas. Ello sin duda puede influir negativamente en las determinaciones futuras, al no permitir el correcto funcionamiento del equipo y además puede deteriorar la columna capilar, reduciendo su tiempo de vida y propiciando un desempeño inadecuado (Schenck et al., 2002). En general el desempeño de este método modificado no fue mejor que el del propuesto inicialmente dado que las recuperaciones y variación en las respuestas fueron mucho mayores. Por ello, fue necesario implementar nuevas estrategias de limpieza de los extractos en el método modificado II.

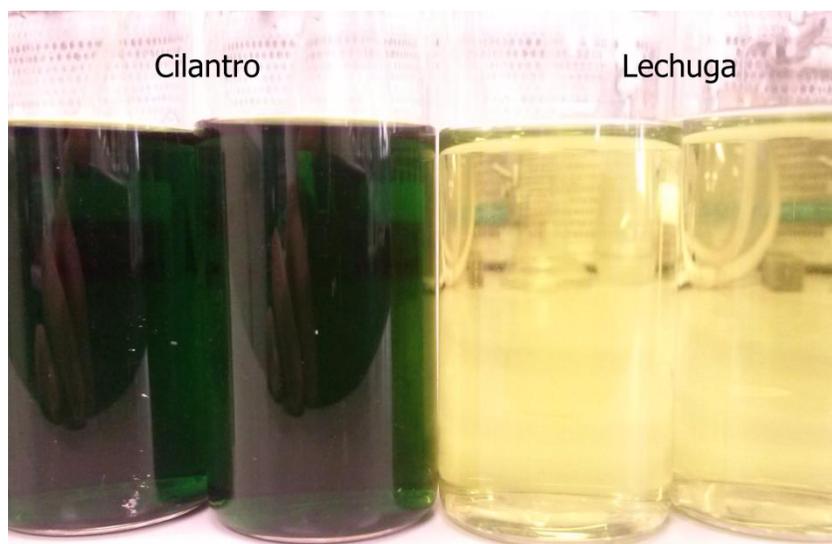


Figura 21 - Extractos de cilantro y lechuga



Figura 22 - Muestras de cilantro y lechuga listas para inyección en cromatógrafo.

5.3.4.1 Cilantro

5.3.4.1.1 Compuestos de carácter ácido

Tabla 34 - Recuperaciones de compuestos de carácter ácido para la validación del método modificado I con cilantro

Promedio de recuperaciones por nivel $\pm \sigma$ [%]			
Nivel	IBU	NPX	DIC
0*	5.37 \pm 4.99	6.84 \pm 5.72	ND
bajo	210.34 \pm 55.14	251.95 \pm 77.29	ND
alto	166.15 \pm 11.31	148.74 \pm 10.88	107.69 \pm 16.39

* ng/g _{seco}

Las recuperaciones de los fármacos ácidos presentadas en la Tabla 34 resultan ser desfavorables en la mayoría de los casos. En los niveles bajos de fortificación los datos obtenidos fueron incongruentes. Esto se puede ver en que las concentraciones obtenidas al final del análisis llegan a ser 200% de lo inicialmente adicionado, aunque las desviaciones estándar para IBU y NPX fueron aceptables. El DIC no pudo ser detectado por la señal tan alta de ruido en el nivel bajo (Figura 19). En lo que respecta al nivel alto, únicamente el DIC tuvo una recuperación promedio aceptable. Tanto el IBU como el NPX tuvieron una recuperación promedio muy por arriba del 120%. En todos los casos, las desviaciones estándar relativas del nivel alto de enriquecimiento fueron aceptables, lo cual indica una baja variabilidad en las respuestas.

Con respecto a los resultados obtenido con el método propuesto originalmente, las recuperaciones y la variación en las respuestas fueron mucho mayores en todos los casos excepto para el DIC en el nivel alto, lo cual hizo necesario buscar otras opciones para purificar los extractos.

En la Tabla 35 se encuentran las cantidades y concentraciones de los analitos detectadas en los blancos de método (Blanco) y en los blancos de muestra (Nivel 0).

Tabla 35 - Cantidades y concentraciones de los analitos encontradas en blancos en cilantro

Cantidades y concentraciones encontradas en blancos			
Nivel	IBU	NPX	DIC
Blanco*	1.56 ± 0.38	2.58 ± 0.84	ND
0**	5.37 ± 4.99	6.84 ± 5.72	ND

* ng
** ng/g_{seco}

En los blancos se encontraron cantidades promedio de 1.56 y 2.58 ng de IBU y NPX, respectivamente, mientras que DIC no fue detectado. Para el nivel 0, la respuesta del DIC fue igualmente incuantificable, a causa de las interferencias. Para el IBU y el NPX se calcularon concentraciones promedio en el nivel 0 de 5.37 y 6.84 ng/g_{seco}, respectivamente, sin embargo en ambos casos la variabilidad de las respuestas fue excesivamente grande, saliendo del rango de aceptabilidad. En comparación con las cantidades registradas en blancos y nivel 0 con el método propuesto inicialmente, las cantidades de IBU y NPX detectadas en los blancos de método fueron mayores, al igual que la variación en las respuestas. Para el nivel 0, la cantidad promedio detectada de IBU fue mucho mayor, sin embargo la variabilidad se ubicó en un nivel similar; para el NPX la cantidad detectada fue mucho menor mientras que la variación se incrementó de manera importante.

5.3.4.1.2 Compuestos fenólicos

Tabla 36 - Recuperaciones de compuestos fenólicos para la validación del método modificado I con cilantro

Promedio de recuperaciones por nivel ± σ [%]		
Nivel	NP	BPA
0*	354.03 ± 17.51	33.52 ± 11.89
bajo	902.84 ± 552.04	273.27 ± 169.91
alto	188.93 ± 56.71	132.34 ± 17.05

* ng/g_{seco}

Los compuestos fenólicos tuvieron resultados más desfavorables que los obtenidos para los compuestos de carácter ácido (Tabla 36). Como se puede apreciar en la Tabla 36, las recuperaciones obtenidas para el nivel bajo de enriquecimiento superan por muchos el 120% para NP y BPA. Las grandes desviaciones estándar calculadas indican una gran variabilidad en las respuestas medidas. En el nivel alto la recuperación promedio del BPA se encuentra por arriba del 120%, sin embargo es mucho mejor que para el nivel bajo y presenta una desviación estándar baja de ~17%. Con respecto al NP, la recuperación promedio es igualmente mejor en el nivel alto que en el nivel bajo; no obstante, sigue excediendo por mucho el 120% propuesto, aunque su desviación estándar es mucho menor y la variación en las respuestas es aceptable. Con respecto al método propuesto inicialmente, las recuperaciones son mucho mayores, particularmente en el

nivel bajo de enriquecimiento, esto puede obedecer a una amplificación de la señal por efectos de matriz. De igual manera, la variación en las respuestas fue mayor que en el método propuesto inicialmente.

En la Tabla 37 se encuentran las cantidades y concentraciones de los analitos detectadas en los blancos de método (Blanco) y en los blancos de muestra (Nivel 0).

Tabla 37 - Cantidades y concentraciones de los analitos encontradas en blancos en cilantro

Cantidades y concentraciones encontradas en blancos		
Nivel	NP	BPA
Blanco*	138.78 ± 4.64	4.48 ± 0.79
0**	354.03 ± 17.51	33.52 ± 11.89

* ng
** ng/g_{seco}

En los blancos de la fracción de los analitos fenólicos, se detectaron concentraciones considerablemente altas de NP con ~139 ng en promedio mientras que para el BPA se detectaron ~4.5 ng en promedio. En las muestras del nivel 0 se detectó una concentración de 354.03 ng/g_{seco} de NP y de 33.5 ng/g_{seco} de BPA. En comparación con las concentraciones calculadas con el método propuesto inicialmente, las cantidades registradas en los blancos son menores para ambos analitos fenólicos. Para el nivel 0, la concentración de NP calculada con el método modificado fue mucho menor y la variación en las respuestas fue prácticamente igual.

5.3.4.1.3 Estándares de recuperación

En la Tabla 38 se muestran las recuperaciones promedio de los estándares de recuperación en los blancos y los niveles 0, bajo y alto de enriquecimiento.

Tabla 38 - Recuperaciones promedio de los estándares de recuperación en cilantro

Promedio de recuperaciones por nivel ± σ [%]		
Nivel	KP	[¹⁴ H ₁₆]-BPA
Blanco	105.26 ± 8.04	84.82 ± 3.3
0	127.73 ± 7.34	18.3 ± 3.01
bajo	125.89 ± 13.61	48.87 ± 6.48
alto	125.89 ± 10.58	40.51 ± 8.58

El KP mostró buenas recuperaciones promedio, tanto en las muestras como en los blancos de método, si bien en las muestras se encontró ligeramente por encima del límite superior del rango aceptable. En todos los casos, las desviaciones estándar se ubicaron dentro de lo esperado, lo cual indica una baja variación en las respuestas para los blancos y para cada nivel de enriquecimiento. Comparado con el método propuesto inicialmente, los valores de recuperación promedio son más congruentes entre si y las desviaciones estándar son mucho menores; de igual

manera, los valores de las recuperaciones promedio se encuentran más próximos a los valores límite del rango aceptable.

Para el estándar de recuperación [²H₁₆]-BPA, una buena respuesta fue obtenida para los blancos, con una recuperación promedio de 84.82% y una desviación estándar baja (3.3%). No obstante, se ubicó por debajo del límite inferior del rango aceptable en todas las muestras, en particular en las muestras del nivel 0 (~18%), mientras que en los niveles bajo y alto sube por encima del 40% en ambos casos. En todos los casos, la variabilidad en las respuestas del [²H₁₆]-BPA fue aceptable con desviaciones estándar bajas. En comparación con el método propuesto inicialmente, la recuperación promedio en las muestras fue mucho menor; sin embargo, la variación en las respuestas también disminuyó. Esto puede ser indicio, por un lado, de que la cantidad de interferencias co-extraídas que afectan al estándar disminuyó al cambiar la mezcla de solventes, y por el otro, de que la mezcla de solventes tiene una menor afinidad con el compuesto.

5.3.4.2 Lechuga

5.3.4.2.1 Compuestos de carácter ácido

Tabla 39 - Recuperaciones de compuestos de carácter ácido para la validación del método modificado I con lechuga

Promedio de recuperaciones por nivel ± σ [%]			
Nivel	IBU	NPX	DIC
0*	3.46 ± 2.93	6.26 ± 6.33	28.46 ± 3.40
bajo	266.08 ± 57.06	186.47 ± 90.44	94.4 ± 42.73
Alto	193.07 ± 17.33	143.87 ± 14.41	124.36 ± 10.51

* ng/g _{seco}

Las recuperaciones de los analitos de carácter ácido para la validación utilizando lechuga (Tabla 39) fueron insatisfactorias en general. Para el nivel bajo, se tuvieron recuperaciones promedio excesivamente altas para IBU y NPX (266 y 186%, respectivamente), aun cuando la variación en las respuestas de IBU se mantuvo relativamente baja, lo cual se refleja en una desviación estándar de ~57%, mientras que para NPX este valor fue mayor a 90%, lo cual queda fuera del rango aceptable. Para el DIC en el nivel bajo, se tuvo una recuperación promedio buena, sin embargo la variabilidad de las respuestas fue muy grande, dando como resultado una desviación estándar de ~43%. En el nivel alto, las recuperaciones promedio se encontraron por arriba del 120% en todos los casos, siendo la mayor la del IBU, con 193%, y la menor la del DIC con 124%. Este último puede ser considerado como aceptable. En todos los casos las desviaciones estándar fueron bajas. En comparación con los resultados obtenidos para las extracciones de cilantro, el comportamiento de los analitos es muy similar, particularmente en el caso del IBU en el cual, en ambos niveles de enriquecimiento, las recuperaciones y desviaciones estándar fueron muy similares. En el nivel alto, las recuperaciones y desviaciones estándar para NPX y DIC son igualmente similares, no así en el nivel bajo.

En la Tabla 42 se encuentran las cantidades y concentraciones de los analitos detectadas en los blancos de método (Blanco) y en los blancos de muestra (Nivel 0).

Tabla 40 - Cantidades y concentraciones de los analitos encontradas en blancos en lechuga

Cantidades y concentraciones encontradas en blancos			
Nivel	IBU	NPX	DIC
Blanco*	4.72 ± 5.34	4.90 ± 4.64	3.04 ± 2.93
0**	3.46 ± 2.93	6.26 ± 6.33	28.46 ± 3.40

* ng

** ng/g_{seco}

Las concentraciones de los analitos encontradas en los blancos de método se encuentran entre 3.04 y 4.90 ng y son coherentes con lo reportado por Durán en 2009.

En el nivel 0, las cantidades variaron de 3.46 a 28.46 ng/g_{seco}. En el caso del IBU, la cantidad calculada se encuentra muy por debajo de lo encontrado por Calderón-Preciado et al. (2009) en lechuga comprada en un mercado local (28.5 ng/g). No obstante, en la mayoría de los casos, la variación en las respuestas es excesivamente grande. El comportamiento de las cantidades encontradas en los blancos de método y de muestra, así como la variación de las repuestas, es similar para el caso del cilantro y la lechuga.

5.3.4.2.2 Compuestos fenólicos

Tabla 41 - Recuperaciones de compuestos fenólicos para la validación del método modificado I con lechuga

Promedio de recuperaciones por nivel ± σ [%]		
Nivel	NP	BPA
0*	244.40 ± 25.12	28.71 ± 9.74
bajo	269.71 ± 218.21	290.12 ± 154.89
alto	72.33 ± 34.85	104.57 ± 13.4

* ng/g_{seco}

En la Tabla 41 se encuentran las recuperaciones promedio calculadas para los analitos fenólicos en la validación del método analítico modificado usando lechuga. Como se puede ver en la Tabla, las recuperaciones promedio en el nivel bajo para ambos analitos resultaron ser excesivamente grandes y con una variación igualmente grande con desviaciones estándar de ~218 y ~155% para NP y BPA, respectivamente. En el nivel alto, las recuperaciones se encontraron dentro del rango aceptable (70-120%) en ambos casos, sin embargo, el NP tuvo una desviación estándar relativa que sale del rango aceptable (~48%). La desviación estándar del BPA fue pequeña y aceptable (~13%). En comparación con los resultados obtenidos para los compuestos fenólicos en cilantro, el comportamiento del BPA es prácticamente igual en ambos niveles de enriquecimiento. En el caso del NP, las recuperaciones promedio en ambos niveles fueron mucho menores; no obstante, la variación de las respuestas fue considerablemente mayor, lo cual se puede ver reflejado en las desviaciones estándar calculadas.

En la Tabla 42 se encuentran las cantidades y concentraciones de los analitos detectadas en los blancos de método (Blanco) y en los blancos de muestra (Nivel 0).

Tabla 42 - Cantidades y concentraciones de los analitos encontradas en blancos en lechuga

Cantidades y concentraciones encontradas en blancos		
Nivel	NP	BPA
Blanco*	108.62 ± 20.26	11.36 ± 7.25
0**	244.40 ± 25.12	28.71 ± 9.74

* ng

** ng/g_{seco}

Las concentraciones de los analitos encontradas en los blancos de método se encuentran entre 11.36 y 108.62 ng y son coherentes con lo reportado por Durán en 2009.

En el nivel 0, las cantidades variaron de 28.71 a 244.4 ng/g_{seco}. En el caso del BPA, tanto en el blanco como en el nivel 0, la variación en las respuestas es excesivamente grande. El comportamiento de las cantidades encontradas en los blancos de método y de muestra, así como la variación de las repuestas, es similar para el caso del cilantro y la lechuga.

5.3.4.2.3 Estándares de recuperación

En la Tabla 43 se muestran las recuperaciones promedio de los estándares de recuperación en los blancos y los niveles 0, bajo y alto de enriquecimiento.

Tabla 43 - Recuperaciones promedio de los estándares de recuperación en lechuga

Promedio de recuperaciones por nivel ± σ [%]		
Nivel	KP	[¹⁴ H ₁₆]-BPA
Blanco	84.73 ± 60.3	92.43 ± 5.54
0	130.18 ± 19.53	75.97 ± 17.29
bajo	121.27 ± 6.69	35.26 ± 19.07
Alto	118.55 ± 4.48	38.94 ± 18.93

En general, las recuperaciones del KP fueron satisfactorias. En el nivel bajo, la recuperación promedio sobrepasó el límite superior por 1.27%. En el nivel 0, la recuperación fue de ~130%, excediendo por 10% el máximo aceptable. Por otra parte, en todas muestras la variación en las respuestas para cada nivel fue baja, siendo la desviación estándar máxima de ~20% para el nivel 0. Sin embargo, la variación en los blancos de método fue excesivamente grande. En comparación con las respuestas obtenidas para el KP en extracciones de cilantro hechas con el método modificado I, las recuperaciones en todos los niveles y los blancos de método son prácticamente iguales. La variación de las repuestas es menor en los niveles bajo y alto y el desempeño del método en general fue más satisfactorio. Esto implica que el desempeño del estándar de recuperación en estas dos matrices diferentes es muy similar.

El estándar de recuperación [$^2\text{H}_{16}$]-BPA tuvo recuperaciones progresivamente más bajas, iniciando con ~92% en los blancos de método hasta menos de 40% en los niveles bajo y alto. De igual manera, la variación de las respuestas fue mucho mayor que en el caso del cilantro. No obstante, en ambos casos el desempeño general fue muy similar.

5.4 Comparación del efecto de la utilización de distintos sustratos en conjunto con SPE en tándem

La apariencia física de los extractos de cilantro se evaluó con base en la preparación de la muestra usando diferentes configuraciones: a) únicamente con tierra diatomácea; b) una combinación de tierra diatomácea y MgSiO_3 ; y c) únicamente con MgSiO_3 . En la Figura 23 se muestran los distintos extractos tras una centrifugación a 2500 rpm durante 40min. A, B y C corresponden a diferentes configuraciones compuestas únicamente por tierra diatomácea, D es una combinación de tierra diatomácea y MgSiO_3 . E y F corresponden únicamente a MgSiO_3 . Resulta evidente que la turbidez asociada a los extractos obtenidos usando tierra diatomácea es mucho mayor que la de los extractos obtenidos con el uso de MgSiO_3 . Lo antes mencionado guarda relación con lo observado en otras investigaciones en las que se realizaron extracciones utilizando tierra diatomácea como sustrato para evitar el apelmazamiento y la aparición de flujos preferenciales (Villagrasa et al., 2006). Adicionalmente, como se puede ver en la Figura 24, aunque una parte del color contenido en los extractos es retenido en el cartucho de SAX, una fracción lo suficientemente grande como para colorar el cartucho de manera notable logra llegar hasta el cartucho HLB en los extractos con tierra diatomácea. Es razonable suponer que los pigmentos viajan asociados a las partículas de tierra diatomácea, una parte de la cual queda retenida en el primer cartucho y la otra en el segundo. Esta suposición obedece a que este material ha sido utilizado como sorbente para purificar clorofila (Stanier & Smith, 1960 y Broyde & Brody, 1966), como sustrato para cromatografía de pigmentos en vegetales (Bickoff et al., 1954 y Strain et al., 1967) y para remover colorantes en solución acuosa (Al-Ghouti et al., 2003; Badii et al., 2010).

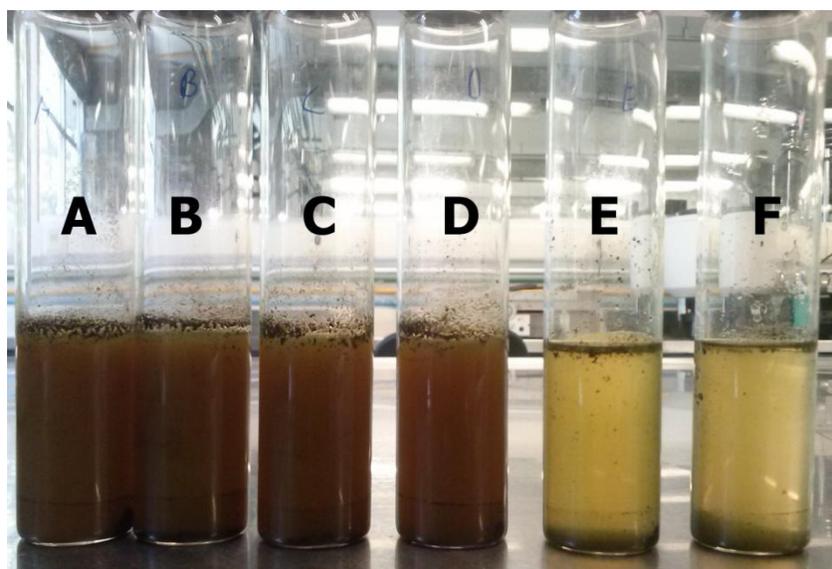


Figura 23 - Extractos con diferentes configuraciones de sustratos tras centrifugado



Figura 24 - Cartuchos tras la percolación de los extractos diluidos

Como se puede apreciar en la Figura 25, los eluatos de la fracción ácida obtenidos a partir de los extractos en los que se usó tierra diatomácea tienen un color más intenso que aquellos obtenidos usando $MgSiO_3$, aunque estos últimos no están del todo libres de color. Por otra parte, resulta igualmente evidente que los eluatos de la fracción fenólica de los extractos con $MgSiO_3$ son más claros que los correspondientes a las extracciones realizadas con tierra diatomácea (Figura 26) y, más aun, es posible apreciar que aun tras la SPE en tándem, en los eluatos correspondientes a las extracciones realizadas con tierra diatomácea aun se aprecia la turbiedad derivada de la presencia de partículas de este sustrato que lograron cruzar ambos cartuchos (Figura 27).

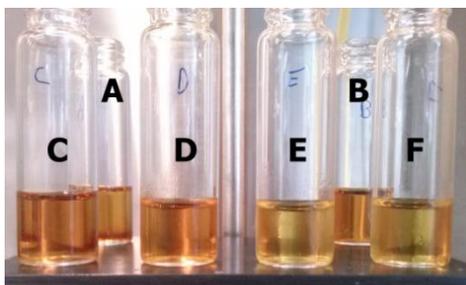


Figura 25 - Eluatos ácidos



Figura 26 - Eluatos fenólicos

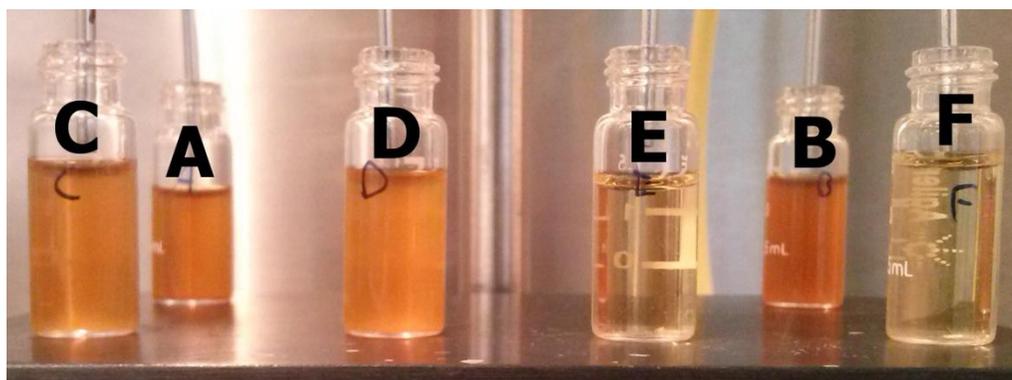


Figura 27 - Diferencia en turbiedad en muestras procesadas de ácidos

5.5 Validación del método modificado II

Para la validación del método modificado II, únicamente se realizaron las pruebas de recuperación y especificidad, puesto que las de repetibilidad y linealidad fueron realizadas para la validación del método modificado I y sus resultados son también válidos para el método modificado II pues se trata del mismo equipo utilizado bajo las mismas condiciones y con los mismos compuestos y los estándares utilizados se manejaron en solvente orgánico puro. Las pruebas de recuperación se realizaron únicamente con cilantro, pues el principal objetivo de este trabajo es el desarrollo de una técnica capaz de realizar extracciones y cuantificación aun en especies vegetales con altos contenidos de compuestos interferentes.

Como punto de partida, cabe hacer notar la importancia de la centrifugación para reducir la turbiedad de la muestra, evitar el tamponamiento de los cartuchos y coadyuvar en la remoción de color. En la Figura 28 se muestra un extracto recién colocado en el vial de polipropileno y uno tras una hora de cetrifugado a 3500 rpm.



Figura 28 - Viales de polipropileno con extractos diluídos antes y después de centrifugar

Posteriormente, es posible apreciar que la fracción correspondiente a los compuestos de carácter ácido tiene una coloración ámbar. Dicha coloración puede ser debida a la coextracción de pigmentos de las muestras, los cuales no fueron retenidos en el cartucho de SAX y fueron eluidos del cartucho HLB con el buffer de acetona: NaHCO_3 . En contraste, la fracción fenólica presenta una ligera coloración dorada debido a que los cartuchos HLB se encontraban ya prácticamente libres de pigmentos al momento de realizar la elución de fenoles (Figura 29).

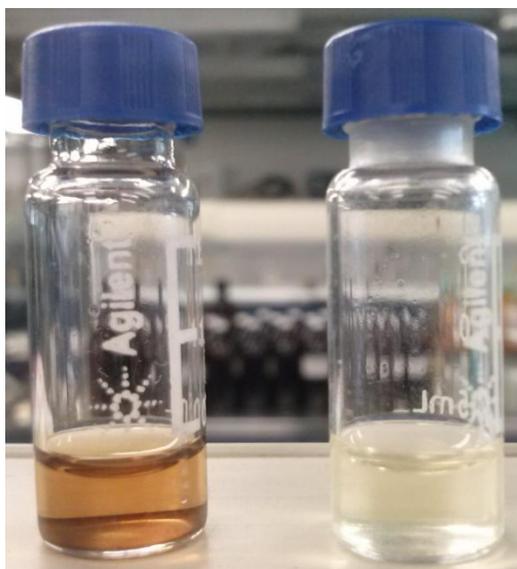


Figura 29 - Facciones ácida y fenólica listas para inyectar tras SPE en tándem y extracción con MgSiO_3

5.5.1 Especificidad

En la Figura 30 se presentan los cromatogramas de los compuestos de carácter ácido para la prueba de especificidad de la respuesta. Los cromatogramas correspondientes a los compuestos fenólicos no se presentan ya que, como se verá más adelante en el apartado correspondiente a las recuperaciones de los compuestos fenólicos en esta prueba (5.5.2.2), no se detectaron respuestas en los niveles de enriquecimiento bajo y alto.

Al comparar los cromatogramas con los de la primer validación, se puede ver que la respuesta para el nivel bajo del IBU es ligeramente más alta. Para el NPX se aprecia una respuesta disminuida del estándar, lo cual puede explicar las altas recuperaciones calculadas. Para el DIC se aprecia, de manera consistente, un nivel muy alto de ruido que apenas permite la cuantificación en el nivel alto, en el cual se aprecia un pico muy pequeño.

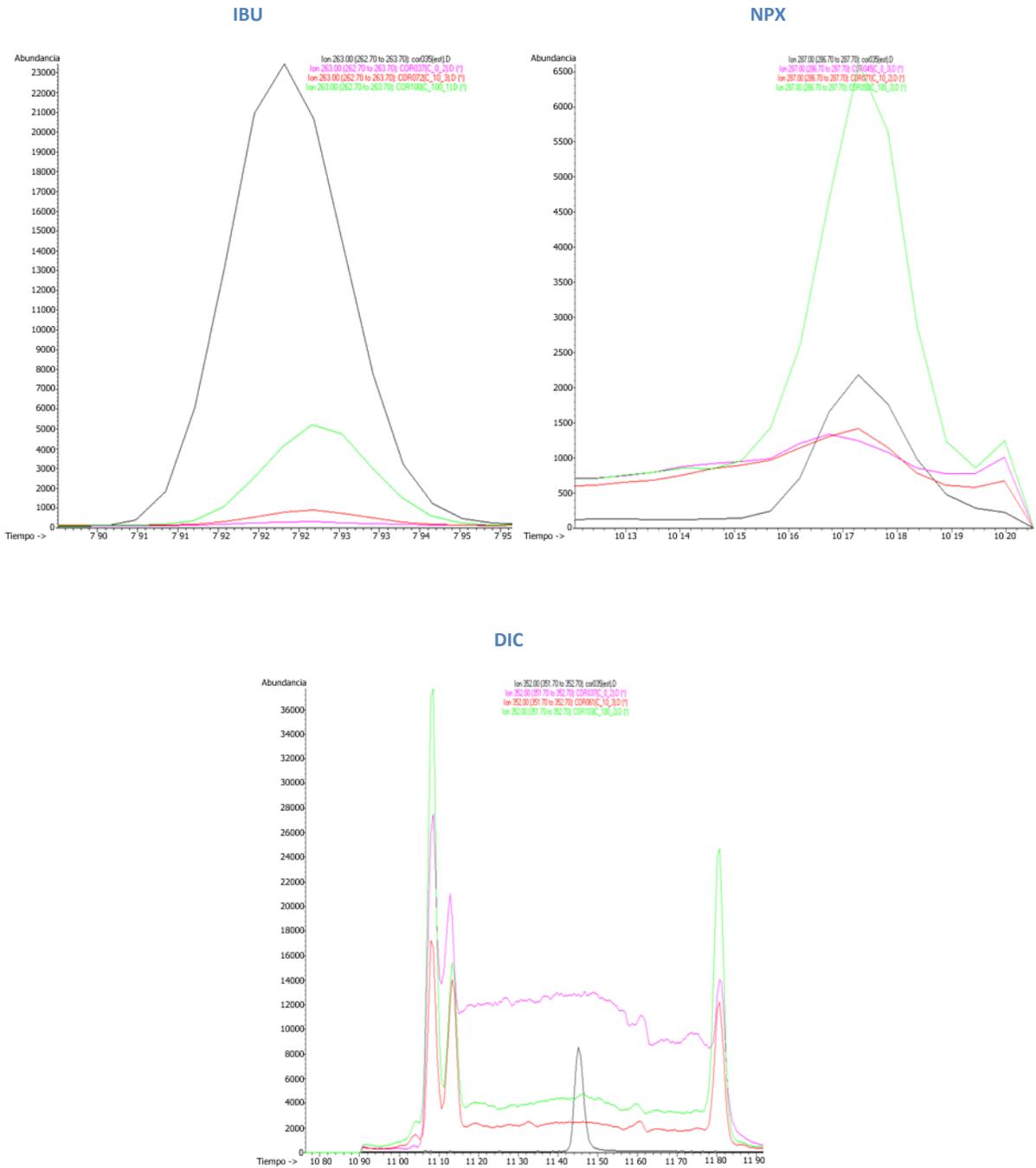


Figura 30 - Cromatogramas comparativos del ión característico para los tres niveles de enriquecimiento de los compuestos de carácter ácido. Especificidad de la respuesta.

5.5.2 Recuperaciones

5.5.2.1 Compuestos de carácter ácido

Tabla 44 - Recuperaciones de compuestos de carácter ácido para la validación del método modificado II

Promedio de recuperaciones por nivel $\pm \sigma$ [%]			
Nivel	IBU	NPX	DIC
0*	ND	82.17 \pm 17.4	ND
bajo	97.48 \pm 13.23	2681.65 \pm 304.32	ND
Alto	88.93 \pm 10.95	1474.26 \pm 406.72	143.77 \pm 45.83

* ng/g_{seco}

En la Tabla 44 se aprecian las recuperaciones calculadas para cada uno de los niveles de enriquecimiento de los compuestos de carácter ácido.

Las recuperaciones de los analitos ácidos resultaron insatisfactorias para NPX y DIC, excediendo por mucho el límite superior de 120% en ambos casos para los dos niveles de enriquecimiento. Por otra parte, las recuperaciones de IBU resultaron ser excelentes para ambos niveles de enriquecimiento y con una muy baja dispersión en las respuestas. La variación en las respuestas de NPX y DIC se encuentra dentro del rango aceptable, principalmente para NPX, lo cual es indicio de que el comportamiento de las muestras es consistente dentro de cada nivel de enriquecimiento.

En comparación con las dos iteraciones previas del método, ésta es la primera en la cual se obtienen resultados satisfactorios, tanto en recuperación promedio como en variación en las respuestas, para un mismo compuesto en ambos niveles de enriquecimiento (IBU). Comparativamente, la respuesta del NPX sale totalmente de lo esperado, si bien sus desviaciones estándar caen dentro del rango aceptable.

Dadas las recuperaciones incongruentes y la falta de evaluación en un principio de las condiciones de extracción, no es posible hacer afirmaciones sobre el funcionamiento satisfactorio de la técnica para algunos de los compuestos. Sin embargo, de calcularse un límite de detección, sería únicamente para el IBU ya que fue el único compuesto para el cual se tuvieron recuperaciones satisfactorias en los niveles bajo y alto así como una variabilidad aceptable en las respuestas. Dicho LOD sería del orden de 6.81 ng/g_{seco}, como se muestra en la Tabla 45. En cualquier caso, este LOD es alto comparado con los de otras técnicas analizadas en los antecedentes y, además, coincide con la cantidad detectada en los blancos de método, como se muestra posteriormente en el apartado correspondiente.

Tabla 45 - LOD IBU

Hr [u]	Hc [u]	χ_{nom} [ng/ μ L]	LOD [ng/ μ L]	LOD [ng/g _{seco}]
175	771	0.01	0.0068	6.81

En la Tabla 46 se encuentran las cantidades y concentraciones de los analitos detectadas en los blancos de método (Blanco) y en los blancos de muestra (Nivel 0).

Tabla 46 - Cantidades y concentraciones de los analitos encontradas en blancos

Cantidades y concentraciones encontradas en blancos			
Nivel	IBU	NPX	DIC
Blanco*	6.47 ± 0.63	6.92 ± 3.05	0.74 ± 0.27
0**	ND	82.17 ± 17.4	ND

* ng

** ng/g_{seco}

En los blancos de método se encontraron concentraciones de todos los analitos entre 0.74 y 6.92 ng, siendo la máxima de NPX.

En el nivel 0 únicamente se detectaron concentraciones de NPX ~82 ng/g_{seco}. Las respuestas altamente desfavorables e incongruentes de este compuesto en los niveles bajo y alto de enriquecimiento, sugieren que esta detección no es acertada.

5.5.2.2 Compuestos fenólicos

Tabla 47 - Recuperaciones de compuestos fenólicos para la validación del método modificado II

Promedio de recuperaciones por nivel ± σ [%]		
Nivel	NP	BPA
0*	ND	21.3 ± 11.8
bajo	ND	ND
alto	ND	ND

* ng/g_{seco}

En la Tabla 47 se muestran las recuperaciones y cantidades medidas de los compuestos fenólicos en las muestras enriquecidas y los blancos. No se detectó respuesta alguna para BPA ni NP en ninguna de las muestras enriquecidas. Una posible explicación es la retención de los analitos en el cartucho SAX y/o en los viales de polipropileno utilizados para la cetrifugación. Tras la dilución de los extractos en la solución de H₂SO₄, los analitos pueden haber formado complejos con la materia orgánica disuelta (DOM). Estos complejos pueden haber quedado retenidos en la fase estacionaria del cartucho de SAX de acuerdo a lo que desmostraron Boyer et al. (2008), quienes encontraron que es posible retener DOM de diversa naturaleza mediante mecanismos de intercambio aniónico. Ello implica que, si los analitos han formado complejos con la DOM, es probable que, aun encontrándose en estado neutro debido al pH del medio (el pH de la solución ácida es de 1.8 mientras que el valor de pK_a más bajo es de 9.6), sean retenidos por la fase del cartuchos SAX. Dicha formación de complejos orgánicos con la DOM fue observada por Zhu et al. (2012), quienes reportaron que el BPA tiene la capacidad de formar complejos con la DOM presente en agua superficial. Evidentemente la naturaleza de la DOM analizada en dicha investigación y la presente en los extractos diluídos puede diferir de manera importante, sin embargo es muy probable que los mecanismos mediante los cuales se forman los complejos se presenten también en los

extractos diluídos. De igual manera, existen antecedentes sobre la capacidad del polipropileno de adsorber compuestos orgánicos (Koh et al., 2005), lo cual puede suceder también en los cartuchos SPE, sin embargo el menor tiempo de residencia en ellos en solución, así como la presencia del material adsorbente podrían contribuir a disminuir la cantidad de analitos y/o complejos orgánicos retenidos por el polipropileno. Sin embargo, los resultados sugieren que la razón más probable es el ensuciamento del equipo puesto que, de haber sido la retención de los compuestos la causa fundamental de su ausencia, esto debería haber afectado por igual al BPA y el [²H₁₆]-BPA en los tres niveles de enriquecimiento.

En la Tabla 48 se encuentran las cantidades y concentraciones de los analitos detectadas en los blancos de método (Blanco) y en los blancos de muestra (Nivel 0).

Tabla 48 - Cantidades y concentraciones de los analitos encontradas en blancos

Cantidades y concentraciones encontradas en blancos		
Nivel	NP	BPA
Blanco*	12.59 ± 0.69	1.66 ± 0.41
0**	ND	21.3 ± 11.8

* ng
** ng/g_{seco}

En los blancos de método se encontraron concentraciones de todos los analitos entre 1.66 y 12.59 ng, siendo la máxima de NP.

En el nivel 0 únicamente se detectaron concentraciones de BPA con ~21 ng/g_{seco}. Las respuestas altamente desfavorables e incongruentes de este compuesto en los niveles bajo y alto de enriquecimiento, sugieren que esta detección no es acertada.

5.5.2.3 Estándares de recuperación

En la Tabla 49 se muestran las recuperaciones promedio de los estándares de recuperación en los blancos y los niveles 0, bajo y alto de enriquecimiento.

Tabla 49 - Recuperaciones promedio de los estándares de recuperación

Promedio de recuperaciones por nivel ± σ [%]		
Nivel	KP	[² H ₁₆]-BPA
Blanco	127.46 ± 29.13	42.14 ± 6.98
0	56.16 ± 5	523.73 ± 150.17
bajo	441.74 ± 41.89	1.8 ± 1.35
Alto	321.95 ± 78.41	12.27 ± 8.35

En las recuperaciones de KP se aprecia claramente un incremento de la señal para los niveles bajo y alto de enriquecimiento. La ausencia de dicho incremento en el nivel 0 sugiere que podría estar sucediendo una de dos cosas: a) la adición de una cantidad mayor de KP debida a

contaminación de los estándares de enriquecimiento; o bien, b) una amplificación derivada de la ocupación de sitios activos dentro de la columna cromatográfica por los analitos que eluyen en tiempos de retención menores a los del KP ocasionando un ingreso mayor de KP dentro del espectrómetro de masas, como se discutió previamente en el apartado 3.4.5.2.1 Efectos de matriz. No obstante, este comportamiento se presenta consistentemente en todas las muestras, lo cual se puede apreciar puesto que las desviaciones estándar son reducidas. De todas las iteraciones del método, en ésta el KP tuvo las respuestas más desfavorables.

Las recuperaciones del estándar de recuperación [$^2\text{H}_{16}$]-BPA fueron excesivamente erráticas e incongruentes, siendo bajas en los blancos de método, prácticamente nulas en los niveles alto y bajo de enriquecimiento y excesivamente altas en el nivel 0. Por otra parte, la alta variabilidad de las respuestas en los niveles bajo y alto derivaron en desviaciones estándar muy elevadas, lo cual indica que aun dentro de cada nivel de enriquecimiento, el comportamiento de las muestras no fue consistente. Al igual que con el KP, de todas las iteraciones del método, en ésta el [$^2\text{H}_{16}$]-BPA tuvo las respuestas más desfavorables.

6 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- La matriz vegetal es más compleja y con un mayor contenido de interferencias que dificultan el análisis de contaminantes a nivel de trazas que el agua residual, el suelo y los lodos de planta de tratamiento de agua residual.
- Si bien la metodología diseñada para la extracción y cuantificación de los analitos de interés en las matrices altamente complejas agua residual, suelo y lodo brindó muy buenos resultados en estos casos, su aplicación directa en muestras de tejido vegetal no tuvo resultados similares.
- La utilización de diversos substratos durante la extracción de los compuestos, que en muchos casos permite obtener extractos virtualmente listos para el análisis cromatográfico, no derivó en una extracción selectiva de los analitos de interés ni en una retención notable de interferencias.
- Aun cuando el cartucho Oasis® HLB es empleado en gran variedad de técnicas por su versatilidad y capacidad para retener compuestos de muy diversas características, su utilización como único cartucho para la purificación de los extractos de muestras vegetales no permitió remover las interferencias co-extraídas.
- Los cromatogramas demuestran la presencia de compuestos co-extraídos cuya fragmentación produce iones con una relación masa/carga y tiempos de retención iguales a los iones monitoreados para algunos compuestos.
- La sustitución del hexano por MeOH en la mezcla de solventes utilizada para la extracción dio como resultado una menor presencia de aceites co-extraídos (verificado únicamente mediante inspección visual) sin repercutir de manera importante en las recuperaciones o variabilidad de las respuestas.
- La sustitución de la tierra diatomácea por $MgSiO_3$ en la preparación de la muestra fue un punto clave para lograr la obtención de extractos susceptibles de ser limpiados mediante centrifugación.
- La utilización en tándem de dos cartuchos con fases distintas permitió retener una parte importante de los pigmentos aún presentes en los extractos centrifugados.

Con base en estas conclusiones, las recomendaciones son:

- Evaluar desde un principio distintas condiciones de extracción variando los tiempos, temperaturas, número de ciclos y mezclas de solventes para determinar la combinación que brinda las más altas recuperaciones.
- Experimentar con diversos cartuchos para la SPE, conservando como segundo cartucho el HLB por la facilidad de su manejo y las ventajas que ofrece como por la posibilidad de manejar analitos de diversa naturaleza y realizar fraccionamientos según se requiera.
- Explorar los beneficios de utilizar la espectrometría de masas en tándem (MS/MS) con la finalidad de eliminar el enmascaramiento producido por compuestos interferentes cuya primer fragmentación produce iones con relación masa/carga y tiempo de retención iguales a los de los analitos de interés.

7 REFERENCIAS

- Abollino, O., Aceto, M., Malandrino, M., Sarzanini, C., & Mentasti, E. (2003). Adsorption of heavy metals on Namontmorillonite. Effect of pH and organic substances. *Water research*, 37(7), 1619–27. doi:10.1016/S0043-1354(02)00524-9
- Acosta, J., Jansen, B., Kalbitz, K., Faz, A., & Martínez-Martínez, S. (2011). Salinity increases mobility of heavy metals in soils. *Chemosphere*, 85(8), 1318–24. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.07.046
- Adams, S. (2007). Some reflections on ibuprofen. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 100(48), 1. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18335845>
- Ademollo, N., Ferrara, F., Delise, M., Fabietti, F., & Funari, E. (2008). Nonylphenol and octylphenol in human breast milk. *Environment international*, 34(7), 984–7. doi:10.1016/j.envint.2008.03.001
- Aguilera, A., Rodríguez, M., Brotons, M., Boulaid, M., & Valverde, A. (2005). Evaluation of supercritical fluid extraction/aminopropyl solid-phase “in-line” cleanup for analysis of pesticide residues in rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(24), 9374–82. doi:10.1021/jf0518047
- Ahel, M., Giger, W., & Schaffner, C. (1994). Behaviour of alkylphenol polyethoxylate surfactants in the aquatic environment—II. Occurrence and transformation in rivers. *Water Research*, 28(5), 1143–1152. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0043135494902011>
- Al-Ghouti, M. a., Khraishah, M. a. M., Allen, S. J., & Ahmad, M. N. (2003). The removal of dyes from textile wastewater: a study of the physical characteristics and adsorption mechanisms of diatomaceous earth. *Journal of Environmental Management*, 69(3), 229–238. doi:10.1016/j.jenvman.2003.09.005
- Al-Rajab, A. J., Sabourin, L., Lapen, D. R., & Topp, E. (2010). The non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac is readily biodegradable in agricultural soils. *Science of the total environment*, 409(1), 78–82. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.09.020
- Amahmid, O., Asmama, S., & Bouhoum, K. (1999). The effect of waste water reuse in irrigation on the contamination level of food crops by Giardia cysts and Ascaris eggs. *International Journal of Food Microbiology*, 49(1-2), 19–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10477066>
- Angelakis, a N., Koutsoyiannis, D., & Tchobanoglous, G. (2005). Urban wastewater and stormwater technologies in ancient Greece. *Water Research*, 39(1), 210–20. doi:10.1016/j.watres.2004.08.033
- Anttila, M., Haataja, M., & Kasanen, a. (1980). Pharmacokinetics of naproxen in subjects with normal and impaired renal function. *European journal of clinical pharmacology*, 18(3), 263–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7439246>
- Balinova, A., Mladenova, R., & Shtereva, D. (2007). Solid-phase extraction on sorbents of different retention mechanisms followed by determination by gas chromatography–mass spectrometric and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1150(1-2), 136–44. doi:10.1016/j.chroma.2007.02.002
- Barker, S. a. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD) . *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 151–62. doi:10.1016/j.jbbm.2006.06.005
- Behera, S. K., Kim, H. W., Oh, J.-E., & Park, H.-S. (2011). Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Science of the total environment*, 409(20), 4351–60. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.07.015
- Bendz, D., Paxéus, N. a, Ginn, T. R., & Loge, F. J. (2005). Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden. *Journal of hazardous materials*, 122(3), 195–204. doi:10.1016/j.jhazmat.2005.03.012
- BGS, CNA, LSHTM, & UB. (1998). IMPACT OF WASTEWATER REUSE ON GROUNDWATER IN THE MEZQUITAL VALLEY, HIDALGO STATE, MEXICO. Keyworth, Nottingham.
- Bickoff, E. M., Livingston, A. L., Bailey, G. F., & Thompson, C. R. (1954). Alfalfa Carotenoids, Xanthophylls in Fresh and Dehydrated Alfalfa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2(11), 563–567.
- Bokern, M., & Harms, H. H. (1997). Toxicity and Metabolism of 4- n -Nonylphenol in Cell Suspension Cultures of Different Plant Species. *Environmental science & technology*, 31(7), 1849–1854.
- Bokern, M., Raid, P., & Harms, H. (1998). Toxicity, uptake and metabolism of 4-n-nonylphenol in root cultures and intact plants under septic and aseptic conditions. *Environmental science and pollution research international*, 5(1), 21–7. doi:10.1007/BF02986370
- Bondesson, M., Jönsson, J., Pongratz, I., Olea, N., Cravedi, J.-P., Zalko, D., ... Gustafsson, J.-A. (2009). A CASCADE of effects of bisphenol A. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 28(4), 563–7. doi:10.1016/j.reprotox.2009.06.014
- Boyer, T. H., Singer, P. C., & Aiken, G. R. (2008). Removal of dissolved organic matter by anion exchange: effect of dissolved organic matter properties. *Environmental Science & Technology*, 42(19), 7431–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18939582>
- Brogden, R., Heel, R., & Pakes, G. (1980). Diclofenac sodium: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in rheumatic diseases and pain of varying origin. *Drugs*, 20(1), 24–48. Retrieved from <http://link.springer.com/article/10.2165/00003495-198020010-00002>
- Bromilow, R., & Chamberlain, K. (1995). Principles governing uptake and transport of chemicals. In S. Trapp & J. C. McFarlane (Eds.), *PLANT CONTAMINATION Modeling and Simulation of Organic Chemical Processes* (pp. 37–68). Boca Raton, Florida: CRC Press. Retrieved from

http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=RGIByPeMe2oC&oi=fnd&pg=PA37&dq=Principles+Governing+Uptake+and+Transport+of+Chemicals&ots=vvMPMqD5Jo&sig=poM4AdgWGpnjMw15GtMHXYG_qio

- Brown, S., Devin-Clarke, D., Doubrava, M., & O'Connor, G. (2009). Fate of 4-nonylphenol in a biosolids amended soil. *Chemosphere*, 75(4), 549–54. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.12.001
- Broyde, S. B., & Brody, S. S. (1966). Spectral Studies of a Chlorophyll Pigment with Fluorescence Maximum at 698 mμ. *Biophysical Journal*, 6(3), 353–366. doi:10.1016/S0006-3495(66)86661-4
- Buser, H., Poiger, T., & Müller, M. (1998). Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake. *Environmental science & technology*, 32(22), 3449–3456. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es980301x>
- Calderón, D. (2012). DINÁMICA DE MICROCONTAMINANTES ORGÁNICOS EN AGUAS DE RIEGO AGRÍCOLA Y SU INCORPORACIÓN POTENCIAL EN ESPECIES VEGETALES DE INTERÉS AGRONÓMICO. Universitat Politècnica de Catalunya.
- Calderón-Preciado, D., Jiménez-Cartagena, C., Matamoros, V., & Bayona, J. M. (2011a). Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation waters and their soil loading. *Water research*, 45(1), 221–31. doi:10.1016/j.watres.2010.07.050
- Calderón-Preciado, D., Jiménez-Cartagena, C., Peñuela, G., & Bayona, J. M. (2009). Development of an analytical procedure for the determination of emerging and priority organic pollutants in leafy vegetables by pressurized solvent extraction followed by GC-MS determination. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 394(5), 1319–27. doi:10.1007/s00216-009-2669-0
- Calderón-Preciado, D., Matamoros, V., & Bayona, J. M. (2011b). Occurrence and potential crop uptake of emerging contaminants and related compounds in an agricultural irrigation network. *Science of the total environment*, 412-413, 14–9. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.09.057
- Calderón-Preciado, D., Matamoros, V., Savé, R., Muñoz, P., Biel, C., & Bayona, J. M. (2013). Uptake of microcontaminants by crops irrigated with reclaimed water and groundwater under real field greenhouse conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(6), 3629–38. doi:10.1007/s11356-013-1509-0
- Calderón-Preciado, D., Renault, Q., Matamoros, V., Cañameras, N., & Bayona, J. M. (2012). Uptake of organic emergent contaminants in spath and lettuce: an in vitro experiment. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(8), 2000–7. doi:10.1021/jf2046224
- Camel, V. (2001). Recent extraction techniques for solid matrices—supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: their potential and pitfalls. *The Analyst*, 126(7), 1182–1193. doi:10.1039/b008243k
- Carballa, M., Omil, F., & Lema, J. M. (2005). Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment. *Water Research*, 39(19), 4790–6. doi:10.1016/j.watres.2005.09.018
- Carbonaro, S., Sugihara, M., & Strathmann, T. (2013). Continuous-flow photocatalytic treatment of pharmaceutical micropollutants: activity, inhibition, and deactivation of TiO₂ photocatalysts in wastewater. *Applied Catalysis B: Environmental*, 129, 1–12. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926337312004158>
- Casajuana, N., & Lacorte, S. (2003). Presence and release of phthalic esters and other endocrine disrupting compounds in drinking water. *Chromatographia*, 57(9-10), 649–655. doi:10.1007/BF02491744
- Cayetano Salazar, M. (2012). Transferencia suelo-planta de metales pesados en parcelas regadas con agua residual en el Valle del Mezquital. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias de la Tierra. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Chang, B.-V., Lu, Z.-J., & Yuan, S.-Y. (2009). Anaerobic degradation of nonylphenol in subtropical mangrove sediments. *Journal of hazardous materials*, 165(1-3), 162–7. doi:10.1016/j.jhazmat.2008.09.085
- Chávez, A., Maya, C., Gibson, R., & Jiménez, B. (2011). The removal of microorganisms and organic micropollutants from wastewater during infiltration to aquifers after irrigation of farmland in the Tula Valley, Mexico. *Environmental pollution*, 159(5), 1354–62. doi:10.1016/j.envpol.2011.01.008
- Chefetz, B., Mualem, T., & Ben-Ari, J. (2008). Sorption and mobility of pharmaceutical compounds in soil irrigated with reclaimed wastewater. *Chemosphere*, 73(8), 1335–43. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.06.070
- Chen, F., Ying, G.-G., Kong, L.-X., Wang, L., Zhao, J.-L., Zhou, L.-J., & Zhang, L.-J. (2011). Distribution and accumulation of endocrine-disrupting chemicals and pharmaceuticals in wastewater irrigated soils in Hebei, China. *Environmental Pollution*, 159(6), 1490–1498. doi:10.1016/j.envpol.2011.03.016
- Chen, W., Lu, S., Jiao, W., Wang, M., & Chang, A. C. (2013). Reclaimed water: A safe irrigation water source? *Environmental Development*, 8, 74–83. doi:10.1016/j.envdev.2013.04.003
- Cifuentes, E., Blumenthal, J., Ruiz-Palacios, G., Beneth, S. (1992). Health Impact Evaluation of Wastewater in Mexico. *Public Health Review*, 19, 243-250.
- Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N., & Kroiss, H. (2005). Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water research*, 39(19), 4797–807. doi:10.1016/j.watres.2005.09.015
- Coleman, J., & Martinoia, E. (2000). Cellular transport and compartmentation of xenobiotics. In *Phytoremediation 2000 State of the Art in Europe (An Intercontinental Comparison) - Plant uptake and metabolism of organic pollutants: progress and bottlenecks (Vol. 2)*.

- Coleman, J., Blake-Kalff, M., & Davies, E. (1997). Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in plant science*, 1385(97). Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1360138597010194>
- Collins, C., Fryer, M., & Grosso, A. (2006). Plant uptake of non ionic organic chemicals. *Environmental science & technology*, 40(1), 45–52. doi:10.1021/es0508166
- Comisión Nacional del Agua. (2011). Estadísticas agrícolas de los distritos de riego Año agrícola 2009-2010. (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Ed.) (2011th ed.). México, D.F. Retrieved from [ftp://ftp.conagua.gob.mx/SISI1610100092412/Estadísticas de los Distritos de Riego/2009-2010/Estad%EDsticas Agr%EDcolas DR 2009-2010.pdf](ftp://ftp.conagua.gob.mx/SISI1610100092412/Estadísticas%20de%20los%20Distritos%20de%20Riego/2009-2010/Estad%EDsticas%20Agr%EDcolas%20DR%202009-2010.pdf)
- Cortés, J. M., Larsson, E., & Jönsson, J. Å. (2013). Phytoremediation of pharmaceuticals-preliminary study. *Science of the total environment*, 449, 385–9. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.01.061
- Covaci, A., Geens, T., Roosens, L., & Ali, N. (2012). Human Exposure and Health Risks to Emerging Organic Contaminants. In *The Handbook of Environmental Chemistry Vol. 20* (pp. 243 – 305). doi:10.1007/698
- Crain, D. A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G. A., & Guillette, L. J. (2007). An ecological assessment of bisphenol-A: evidence from comparative biology. *Reproductive toxicology*, 24(2), 225–39. doi:10.1016/j.reprotox.2007.05.008
- Cuthbert, R., Taggart, M. a, Prakash, V., Saini, M., Swarup, D., Upreti, S., ... Green, R. E. (2011). Effectiveness of action in India to reduce exposure of Gyps vultures to the toxic veterinary drug diclofenac. *PLoS one*, 6(5), e19069. doi:10.1371/journal.pone.0019069
- Daubert, T., & Danner, R. (1989). *Physical and thermodynamic properties of pure chemicals: data compilation*. Washington, D.C.: Taylor & Francis.
- Davies, N. M., & Anderson, K. E. (1997a). Clinical pharmacokinetics of naproxen. *Clinical pharmacokinetics*, 32(4), 268–93. doi:10.2165/00003088-199732040-00002
- Davies, N. M., & Anderson, K. E. (1997b). Clinical pharmacokinetics of diclofenac. *Therapeutic insights and pitfalls*. *Clinical pharmacokinetics*, 33(3), 184–213. doi:10.2165/00003088-199733030-00003
- De Feo, G., Mays, L. W., & Angelakis, A. N. (2011). Water and wastewater management technologies in the ancient Greek and Roman civilizations. In P. Wilderer (Ed.), *Treatise on Water Science* (pp. 3–22). Elsevier. doi:10.1016/B978-0-444-53199-5.00071-3
- Dionex Corporation. (2007). Technical Note 210 - Accelerated solvent extraction techniques for in-line selective removal of various interferences.
- Dolar, D., Gros, M., Rodríguez-Mozaz, S., Moreno, J., Comas, J., Rodríguez-Roda, I., & Barceló, D. (2012). Removal of emerging contaminants from municipal wastewater with an integrated membrane system, MBR-RO. *Journal of hazardous materials*, 239-240, 64–9. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.03.029
- Doucette, W. J., Wheeler, B. R., Chard, J. K., Bugbee, B., Naylor, C. G., Carbone, J. P., & Sims, R. C. (2005). Uptake of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates by crested wheatgrass. *Environmental toxicology and chemistry*, 24(11), 2965–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16398135>
- Durán Álvarez, J. C. (2009). CUANTIFICACIÓN DE DOCE CONTAMINANTES EMERGENTES, PROVENIENTES DEL AGUA RESIDUAL EMPLEADA PARA RIEGO, EN SUELOS DEL DISTRITO DE RIEGO 03 “TULA”, HIDALGO. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Durán-Alvarez, J. C., Becerril-Bravo, E., Castro, V. S., Jiménez, B., & Gibson, R. (2009). The analysis of a group of acidic pharmaceuticals, carbamazepine, and potential endocrine disrupting compounds in wastewater irrigated soils by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 78(3), 1159–66. doi:10.1016/j.talanta.2009.01.035
- Durán-Álvarez, J., & Jiménez-Cisneros, B. (2014). Beneficial and Negative Impacts on Soil by the Reuse of Treated/Untreated Municipal Wastewater for Agricultural Irrigation – A Review of the Current Knowledge and Future Perspectives. In M. Hernandez-Soriano (Ed.), *Environmental Risk Assessment of Soil Contamination* (pp. 1–62). InTech. doi:10.5772/57226
- European Commission. (2002). European Union Risk Assessment Report 4-nonylphenol (branched) and nonylphenol. 2nd Priority list, Volume 10. (B. G. Hansen, S. J. Munn, J. De Bruijn, S. Pakalin, M. Luotamo, F. Berthault, ... S. Scheer, Eds.)baua.de. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. Retrieved from http://www.baua.de/cae/servlet/contentblob/671156/publicationFile/47802/RAR_057.pdf
- European Commission. (2003). European Union Risk Assessment Report 4,4'-isopropylidenediphenol (bisphenol-A). 3rd Priority List, Volume 37. (S. J. Munn, R. Allanou, K. Aschberger, F. Berthault, J. de Bruijn, C. Musset, ... S. Vegro, Eds.). Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities.
- European Commission. (2010). European Union Risk Assessment Report - Environment Addendum of April 2008 - 4,4'-ISOPROPYLIDENEDIPHENOL (BISPHENOL-A) - Part 1 Environment. (K. Aschberger, S. Munn, H. Olsson, S. Pakalin, G. Pellegrini, S. Vegro, & A. B. Paya Perez, Eds.). Luxembourg: Publications Office of the European Union. doi:10.2788/40195
- Evaluate Ltd. (n.d.). Naproxen. Retrieved March 10, 2013, from <http://www.evaluategroup.com/Universal/View.aspx?type=Entity&entityType=Product&id=1756&lType=modData&componentID=1002>
- Evaluate, 2013. Naproxen. Evaluate Ltd., n.d. Web. 17 Nov. 2013. <http://www.evaluategroup.com/Universal/View.aspx?type=Entity&entityType=Product&id=1756&lType=modData&componentID=1002>.

- Fent, G., Hein, W. J., Moendel, M. J., & Kubiak, R. (2003). Fate of 14C-bisphenol A in soils. *Chemosphere*, 51(8), 735–46. doi:10.1016/S0045-6535(03)00100-0
- Fent, K., Weston, A. a, & Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic toxicology*, 76(2), 122–59. doi:10.1016/j.aquatox.2005.09.009
- Ferrara, G., Loffredo, E., & Senesi, N. (2006). Phytotoxic, clastogenic and bioaccumulation effects of the environmental endocrine disruptor bisphenol A in various crops grown hydroponically. *Planta*, 223(5), 910–6. doi:10.1007/s00425-005-0147-2
- Font, R., Gomez-Rico, M. F., & Fullana, A. (2008). Thermal degradation of organic pollutants in sewage sludge. In D. Prats Rico, C. A. Brebbia, & Y. Villacampa Esteve (Eds.), *Water Pollution IX* (Vol. 111, pp. 405–414). Southampton, UK: WIT Press. doi:10.2495/WP080391
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, & World Health Organization. (2010). Summary report of the seventy-third meeting of JECFA. In Seventy-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (pp. 1–17). Geneva. Retrieved from <http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/summary73.pdf>
- Friedel, J. K., Langer, T., Siebe, C., & Stahr, K. (2000). Effects of long-term waste water irrigation on soil organic matter, soil microbial biomass and its activities in central Mexico. *Biology and Fertility of Soils*, 31(5), 414–421. doi:10.1007/s003749900188
- Fürhacker, M., Scharf, S., & Weber, H. (2000). Bisphenol A: emissions from point sources. *Chemosphere*, 41(5), 751–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10834378>
- Gattullo, C. E., Traversa, A., Senesi, N., & Loffredo, E. (2012). Phytodecontamination of the Endocrine Disruptor 4-Nonylphenol in Water Also in the Presence of Two Natural Organic Fractions. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(9), 6035–6044. doi:10.1007/s11270-012-1337-8
- Geens, T., Aerts, D., Berthot, C., Bourguignon, J.-P., Goeyens, L., Lecomte, P., ... Covaci, A. (2012). A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 50(10), 3725–40. doi:10.1016/j.fct.2012.07.059
- Geens, T., Goeyens, L., & Covaci, A. (2011). Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked? *International journal of hygiene and environmental health*, 214(5), 339–47. doi:10.1016/j.ijheh.2011.04.005
- Gibson, R., Becerril-Bravo, E., Silva-Castro, V., & Jiménez, B. (2007). Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography. A*, 1169(1-2), 31–9. doi:10.1016/j.chroma.2007.08.056
- Gibson, R., Durán-Álvarez, J. C., Estrada, K. L., Chávez, A., & Jiménez Cisneros, B. (2010). Accumulation and leaching potential of some pharmaceuticals and potential endocrine disruptors in soils irrigated with wastewater in the Tula Valley, Mexico. *Chemosphere*, 81(11), 1437–45. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.09.006
- Girardi, C. (2011). Comparison of the biodegradation of pharmaceuticals and biocides in water and soil systems. RWTH Aachen University.
- Gong, F., Liang, Y.-Z., Fung, Y.-S., & Chau, F.-T. (2004). Correction of retention time shifts for chromatographic fingerprints of herbal medicines. *Journal of Chromatography A*, 1029(1-2), 173–183. doi:10.1016/j.chroma.2003.12.049
- González-Naranjo, V., Boltes, K., & Biel, M. (2013). Mobility of ibuprofen, a persistent active drug, in soils irrigated with reclaimed water. *Plant, Soil and Environment*, 59(2), 68–73. Retrieved from <http://agriculturejournals.cz/publicFiles/82690.pdf>
- González-Rodríguez, R. M., Rial-Otero, R., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2008). Determination of 23 pesticide residues in leafy vegetables using gas chromatography-ion trap mass spectrometry and analyte protectants. *Journal of Chromatography. A*, 1196-1197, 100–9. doi:10.1016/j.chroma.2008.02.087
- Grenni, P., Patrolecco, L., Ademollo, N., Tolomei, A., & Barra Caracciolo, A. (2013). Degradation of Gemfibrozil and Naproxen in a river water ecosystem. *Microchemical Journal*, 107, 158–164. doi:10.1016/j.microc.2012.06.008
- Gröning, J., Held, C., & Garten, C. (2007). Transformation of diclofenac by the indigenous microflora of river sediments and identification of a major intermediate. *Chemosphere*, 69, 509–516. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653507004080>
- Gupta, N., Khan, D. K., & Santra, S. C. (2009). Prevalence of intestinal helminth eggs on vegetables grown in wastewater-irrigated areas of Titagarh, West Bengal, India. *Food Control*, 20(10), 942–945. doi:10.1016/j.foodcont.2009.02.003
- Hajslová, J., & Zrostlíková, J. (2003). Matrix effects in (ultra)trace analysis of pesticide residues in food and biotic matrices. *Journal of Chromatography. A*, 1000(1-2), 181–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12877171>
- Hamilton, A. J., Stagnitti, F., Xiong, X., Kreidl, S. L., Benke, K. K., & Maher, P. (2007). Wastewater Irrigation: The State of Play. *Vadose Zone Journal*, 6(4), 823. doi:10.2136/vzj2007.0026
- Harms, H. (1996). Bioaccumulation and metabolic fate of sewage sludge derived organic xenobiotics in plants. *Science of the total environment*, 185, 83–92. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969796050449>
- Harrington, P., & Lodewijk, E. (1997). Twenty years of naproxen technology. *Organic Process Research & Development*, 6160(96), 2–6. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/op960009e>

- Herklotz, P. a, Guring, P., Vanden Heuvel, B., & Kinney, C. a. (2010). Uptake of human pharmaceuticals by plants grown under hydroponic conditions. *Chemosphere*, 78(11), 1416–21. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.12.048
- Hesselsøe, M., Jensen, D., Skals, K., Olesen, T., Moldrup, P., Roslev, P., ... Henriksen, K. (2001). Degradation of 4-nonylphenol in homogeneous and nonhomogeneous mixtures of soil and sewage sludge. *Environmental science & technology*, 35(18), 3695–700. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11783647>
- Hielscher Ultrasonics GmbH. (n.d.). Ultrasonic Extraction and Preservation. Retrieved from http://www.hielscher.com/extraction_01.htm
- Ho, S.-M., Tang, W.-Y., Belmonte de Frausto, J., & Prins, G. S. (2006). Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer research*, 66(11), 5624–32. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-0516
- Hseu, Z.-Y. (2006). Response of microbial activities in two contrasting soils to 4-nonylphenol treated with biosolids. *Chemosphere*, 64(10), 1769–76. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.12.042
- Hu, X., Peng, J., Liu, J., Jiang, G., & Jönsson, J. A. (2006). Evaluating the impacts of some environmentally relevant factors on the availability of bisphenol A with negligible-depletion SPME. *Chemosphere*, 65(11), 1935–41. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.07.028
- Huang, G.-L., Hou, S.-G., Wang, L., & Sun, H.-W. (2007). Distribution and fate of nonylphenol in an aquatic microcosm. *Water research*, 41(20), 4630–8. doi:10.1016/j.watres.2007.06.034
- Imai, S., Shiraiishi, A., Gamo, K., Watanabe, I., Okuhata, H., Miyasaka, H., ... Hirata, K. (2007). Removal of phenolic endocrine disruptors by *Portulaca oleracea*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 103(5), 420–6. doi:10.1263/jbb.103.420
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (n.d.). Mapa de climas del estado de Hidalgo. Aguascalientes.
- Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A., Previtiera, L., & Rubino, M. (2005). Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *Science of the total environment*, 348(1-3), 93–101. doi:10.1016/j.scitotenv.2004.12.068
- Jacobsen, A. M., Halling-Sørensen, B., Ingerslev, F., & Honoré Hansen, S. (2004). Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurised liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1038(1-2), 157–170. doi:10.1016/j.chroma.2004.03.034
- Jimenez-Cisneros, B. (1995). Wastewater reuse to increase soil productivity. *Water Science and Technology*, 32(12), 173–180. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0273122396001527>
- Jimenez, B., & Asano, T. (2008). Water reclamation and reuse around the world. In B. Jiménez & T. Asano (Eds.), *Water Reuse – An international Survey of Current Practice, Issues and Needs* (pp. 3–27). London: IWA Publishing. Retrieved from <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=zYcTnBmZelcC&oi=fnd&pg=PA3&dq=Water+Reclamation+and+Reuse+Around+the+World&ots=Xx6X6bhkRa&sig=kq4RqUwf0g20zg4hLcs4QGYFLd0>
- Jiménez, B., Chávez, A., & Silva, V. (2002). Riego agrícola con agua residual y sus implicaciones en la salud. Caso práctico. In *Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental* (pp. 1–8). Cancún, México. Retrieved from <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IisScript=iah/iah.xis&src=google&base=REPDISCA&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=6065&indexSearch=ID>
- Jjemba, P. K. (2002). The potential impact of veterinary and human therapeutic agents in manure and biosolids on plants grown on arable land: a review. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 93(1-3), 267–278. doi:10.1016/S0167-8809(01)00350-4
- Johnson, K. J., Wright, B. W., Jarman, K. H., & Synovec, R. E. (2003). High-speed peak matching algorithm for retention time alignment of gas chromatographic data for chemometric analysis. *Journal of Chromatography. A*, 996(1-2), 141–55. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12830915>
- Jones, O. A. H., Voulvoulis, N., & Lester, J. N. (2006). Partitioning behavior of five pharmaceutical compounds to activated sludge and river sediment. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 50(3), 297–305. doi:10.1007/s00244-005-1095-3
- Joss, A., Zabczynski, S., Göbel, A., Hoffmann, B., Löffler, D., McArdell, C. S., ... Siegrist, H. (2006). Biological degradation of pharmaceuticals in municipal wastewater treatment: proposing a classification scheme. *Water research*, 40(8), 1686–96. doi:10.1016/j.watres.2006.02.014
- Kang, J.-H., & Kondo, F. (2002). Effects of bacterial counts and temperature on the biodegradation of bisphenol A in river water. *Chemosphere*, 49(5), 493–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12363322>
- Karnjanapiboonwong, A., Suski, J. G., Shah, A. a., Cai, Q., Morse, A. N., & Anderson, T. a. (2011). Occurrence of PPCPs at a Wastewater Treatment Plant and in Soil and Groundwater at a Land Application Site. *Water, Air, & Soil Pollution*, 216(1-4), 257–273. doi:10.1007/s11270-010-0532-8
- Kashem, M. A., & Singh, B. R. (2004). Transformations in Solid Phase Species of Metals as Affected by Flooding and Organic Matter. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 35(9-10), 1435–1456. doi:10.1081/CSS-120037556
- Keri, R. a, Ho, S.-M., Hunt, P. a, Knudsen, K. E., Soto, A. M., & Prins, G. S. (2007). An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A. *Reproductive toxicology* (Elmsford, N.Y.), 24(2), 240–52. doi:10.1016/j.reprotox.2007.06.008

- Kimura, K., Hara, H., & Watanabe, Y. (2007). Elimination of selected acidic pharmaceuticals from municipal wastewater by an activated sludge system and membrane bioreactors. *Environmental science & technology*, 41(10), 3708–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17547201>
- Kirchheiner, J., Meineke, I., Steinbach, N., Meisel, C., Roots, I., & Brockmöller, J. (2003). Pharmacokinetics of diclofenac and inhibition of cyclooxygenases 1 and 2: no relationship to the CYP2C9 genetic polymorphism in humans. *British journal of clinical pharmacology*, 55(1), 51–61. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1884192&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Koh, M., Clark, M., & Howe, K. (2005). Filtration of lake natural organic matter: Adsorption capacity of a polypropylene microfilter. *Journal of Membrane Science*, 256, 169–175. doi:10.1016/j.memsci.2005.02.016
- Korte, F., Kvesitadze, G., Ugrekhelidze, D., Gordeziani, M., Khatishashvili, G., Buadze, O., ... Coulston, F. (2000). Organic toxicants and plants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 47(1), 1–26. doi:10.1006/eesa.2000.1929
- Kosjek, T., Heath, E., Pérez, S., Petrović, M., & Barceló, D. (2009). Metabolism studies of diclofenac and clofibrac acid in activated sludge bioreactors using liquid chromatography with quadrupole – time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Hydrology*, 372(1-4), 109–117. doi:10.1016/j.jhydrol.2009.04.006
- Kosma, C. I., Lambropoulou, D. a, & Albanis, T. a. (2014). Investigation of PPCPs in wastewater treatment plants in Greece: occurrence, removal and environmental risk assessment. *Science of the total environment*, 466–467, 421–38. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.07.044
- Kotyza, J., Soudek, P., Kafka, Z., & Vaněk, T. (2010). Phytoremediation of pharmaceuticals-preliminary study. *International journal of phytoremediation*, 12(3), 306–16. doi:10.1080/15226510903563900
- Kümmerer, K. (2011). Emerging Contaminants. In P. Wilderer (Ed.), *Treatise on Water Science Vol. 3* (pp. 69–87).
- Kvesitadze, E., Sadunishvili, T., & Kvesitadze, G. (2009). Mechanisms of organic contaminants uptake and degradation in plants. *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 31, 454–464. Retrieved from <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.193.3024&rep=rep1&type=pdf>
- La Guardia, M. J., Hale, R. C., Harvey, E., & Mainor, T. M. (2000). Endocrine disruptors (octylphenol, nonylphenol, nonylphenol ethoxylates and polybrominated diphenyl ethers) in land applied sewage sludge “ biosolids.” *NATIONAL MEETING- AMERICAN CHEMICAL SOCIETY DIVISION OF ENVIRONMENTAL CHEMISTRY*, 40(2), 97–99. Retrieved from <http://envirofac.org/Pre-prints/Vol 40 No 2/General/Sec F/p260.PDF>
- Le, H. H., Carlson, E. M., Chua, J. P., & Belcher, S. M. (2008). Bisphenol A is released from polycarbonate drinking bottles and mimics the neurotoxic actions of estrogen in developing cerebellar neurons. *Toxicology letters*, 176(2), 149–56. doi:10.1016/j.toxlet.2007.11.001
- Levantesi, C., La Mantia, R., Masciopinto, C., Böckelmann, U., Ayuso-Gabella, M. N., Salgot, M., ... Grohmann, E. (2010). Quantification of pathogenic microorganisms and microbial indicators in three wastewater reclamation and managed aquifer recharge facilities in Europe. *Science of the total environment*, 408(21), 4923–30. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.07.042
- Li, X., Ying, G.-G., Su, H.-C., Yang, X.-B., & Wang, L. (2010). Simultaneous determination and assessment of 4-nonylphenol, bisphenol A and triclosan in tap water, bottled water and baby bottles. *Environment International*, 36(6), 557–62. doi:10.1016/j.envint.2010.04.009
- Li, Y., Zhou, Q., Wang, Y., & Xie, X. (2011). Fate of tetrabromobisphenol A and hexabromocyclododecane brominated flame retardants in soil and uptake by plants. *Chemosphere*, 82(2), 204–9. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.10.021
- Lin, A., & Reinhard, M. (2005). Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(6), 1303–1309. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/04-236R.1/full>
- Lin, H., Pan, Z., Jin, H., Zou, X., & Lin, C. (n.d.). Thermal Stability of Bisphenol A in Sub-critical Ethanol and Methanol. [Isasf.net](http://www.isasf.net). Retrieved from <http://www.isasf.net/fileadmin/files/Docs/Arcachon/posters/p142-CO38 Kikic.pdf>
- Lin, K., & Gan, J. (2011). Sorption and degradation of wastewater-associated non-steroidal anti-inflammatory drugs and antibiotics in soils. *Chemosphere*, 83(3), 240–6. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.12.083
- Lindqvist, N., Tuhkanen, T., & Kronberg, L. (2005). Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters. *Water research*, 39(11), 2219–28. doi:10.1016/j.watres.2005.04.003
- Ling, Y. C., & Huang, I. P. (1995). Multi-residue matrix solid-phase dispersion method for the determination of six synthetic pyrethroids in vegetables followed by gas chromatography with electron capture detection. *Journal of Chromatography. A*, 695(1), 75–82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7735459>
- Liu, Q., Ji, R., Hommes, G., Schäffer, A., & Corvini, P. F.-X. (2008). Fate of a branched nonylphenol isomer in submerged paddy soils amended with nitrate. *Water research*, 42(19), 4802–8. doi:10.1016/j.watres.2008.08.026
- Löffler, D., Römbke, J., Meller, M., & Ternes, T. A. (2005). Environmental fate of pharmaceuticals in water/sediment systems. *Environmental science & technology*, 39(14), 5209–18. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16082949>
- Loffredo, E., & Senesi, N. (2006). Fate of anthropogenic organic pollutants in soils with emphasis on adsorption/desorption processes of endocrine disruptor compounds. *Pure and Applied Chemistry*, 78(5), 947–961. doi:10.1351/pac200678050947
- Loffredo, E., Eliana Gattullo, C., Traversa, A., & Senesi, N. (2010). Potential of various herbaceous species to remove the endocrine disruptor bisphenol A from aqueous media. *Chemosphere*, 80(11), 1274–80. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.06.054

- Lopez-Espinosa, M. J., Freire, C., Arrebola, J. P., Navea, N., Taoufiki, J., Fernandez, M. F., ... Olea, N. (2009). Nonylphenol and octylphenol in adipose tissue of women in Southern Spain. *Chemosphere*, 76(6), 847–52. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.03.063
- Lu, J., Wu, J., Stoffella, P. J., & Wilson, P. C. (2013). Analysis of bisphenol A, nonylphenol, and natural estrogens in vegetables and fruits using gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(1), 84–9. doi:10.1021/jf304971k
- Lucho-Constantino, C. a., Prieto-García, F., Del Razo, L. M., Rodríguez-Vázquez, R., & Poggi-Valardo, H. M. (2005). Chemical fractionation of boron and heavy metals in soils irrigated with wastewater in central Mexico. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 108(1), 57–71. doi:10.1016/j.agee.2004.12.013
- Mapanda, F., Mangwayana, E. N., Nyamangara, J., & Giller, K. E. (2005). The effect of long-term irrigation using wastewater on heavy metal contents of soils under vegetables in Harare, Zimbabwe. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 107(2-3), 151–165. doi:10.1016/j.agee.2004.11.005
- Markert, B. (1995). Sample preparation (cleaning, drying, homogenization) for trace element analysis in plant matrices. *The Science of The Total Environment*, 176(1-3), 45–61. doi:10.1016/0048-9697(95)04829-4
- Massó González, E. L., Patrignani, P., Tacconelli, S., & García Rodríguez, L. a. (2010). Variability among nonsteroidal antiinflammatory drugs in risk of upper gastrointestinal bleeding. *Arthritis and rheumatism*, 62(6), 1592–601. doi:10.1002/art.27412
- Matamoros, V., Calderón-Preciado, D., Domínguez, C., & Bayona, J. M. (2012). Analytical procedures for the determination of emerging organic contaminants in plant material: A review. *Analytica Chimica Acta*, 722, 8–20. doi:10.1016/j.aca.2012.02.004
- McGettigan, P., & Henry, D. (2013). Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs that elevate cardiovascular risk: an examination of sales and essential medicines lists in low-, middle-, and high-income countries. *PLoS medicine*, 10(2), e1001388. doi:10.1371/journal.pmed.1001388
- Meli, S., Porto, M., Belligno, A., Bufo, S. a, Mazzatura, A., & Scopa, A. (2002). Influence of irrigation with lagooned urban wastewater on chemical and microbiological soil parameters in a citrus orchard under Mediterranean condition. *Science of the Total Environment*, 285(1-3), 69–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11874049>
- Menkissoglu-Spiroudi, U., & Fotopoulou, A. (2004). Matrix effect in gas chromatographic determination of insecticides and fungicides in vegetables. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 84(1-3), 15–27. doi:10.1080/03067310310001593684
- Mireles, a., Solís, C., Andrade, E., Lagunas-Solar, M., Piña, C., & Flocchini, R. G. (2004). Heavy metal accumulation in plants and soil irrigated with wastewater from Mexico city. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 219-220, 187–190. doi:10.1016/j.nimb.2004.01.051
- Monteiro, S. C., & Boxall, A. B. A. (2009). Factors affecting the degradation of pharmaceuticals in agricultural soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(12), 2546–2554. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/08-657.1/full>
- Mortensen, G. K., & Kure, L. K. (2003). Degradation of nonylphenol in spiked soils and in soils treated with organic waste products. *Environmental toxicology and chemistry*, 22(4), 718–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12685703>
- Muñoz, I., & Gómez-Ramos, M. (2009). Chemical evaluation of contaminants in wastewater effluents and the environmental risk of reusing effluents in agriculture. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(6), 676–694. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993609000685>
- Munoz, I., Tomas, N., & Mas, J. (2010). Potential chemical and microbiological risks on human health from urban wastewater reuse in agriculture. Case study of wastewater effluents in Spain. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 45, 300–309. Retrieved from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03601231003704648>
- Murillo-Torres, R., Durán-Álvarez, J. C., Prado, B., & Jiménez-Cisneros, B. E. (2012). Sorption and mobility of two micropollutants in three agricultural soils: A comparative analysis of their behavior in batch and column experiments. *Geoderma*, 189-190, 462–468. doi:10.1016/j.geoderma.2012.05.019
- Nakada, N., Tanishima, T., Shinohara, H., Kiri, K., & Takada, H. (2006). Pharmaceutical chemicals and endocrine disruptors in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water research*, 40(17), 3297–303. doi:10.1016/j.watres.2006.06.039
- Nakajima, N., Ohshima, Y., Serizawa, S., Kouda, T., Edmonds, J. S., Shiraishi, F., ... Morita, M. (2002). Processing of bisphenol A by plant tissues: glucosylation by cultured BY-2 cells and glucosylation/translocation by plants of *Nicotiana tabacum*. *Plant & cell physiology*, 43(9), 1036–42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12354921>
- Nikolaou, A., Meric, S., & Fatta, D. (2007). Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 387(4), 1225–34. doi:10.1007/s00216-006-1035-8
- Oaks, J. L., Gilbert, M., Virani, M. Z., Watson, R. T., Meteyer, C. U., Rideout, B. a, ... Khan, A. A. (2004). Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature*, 427(6975), 630–3. doi:10.1038/nature02317
- Ogada, D. L., Keesing, F., & Virani, M. Z. (2012). Dropping dead: causes and consequences of vulture population declines worldwide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1249, 57–71. doi:10.1111/j.1749-6632.2011.06293.x

- Okuhata, H., Ikeda, K., Miyasaka, H., Takahashi, S., Matsui, T., Nakayama, H., ... Hirata, K. (2010). Floricultural *Salvia* plants have a high ability to eliminate bisphenol A. *Journal of bioscience and bioengineering*, 110(1), 99–101. doi:10.1016/j.jbiosc.2009.12.014
- Orita, N. (2012). Root uptake of organic contaminants into plants : Species differences. Utah State University. Retrieved from <http://digitalcommons.usu.edu/etd/1287/>
- Ortega-Larrocea, M. P., Siebe, C., Bécard, G., Méndez, I., & Webster, R. (2001). Impact of a century of wastewater irrigation on the abundance of arbuscular mycorrhizal spores in the soil of the Mezquital Valley of Mexico. *Applied Soil Ecology*, 16(2), 149–157. doi:10.1016/S0929-1393(00)00105-0
- OW/ORD Emerging Contaminants Workgroup - U.S. EPA. WHITE PAPER: AQUATIC LIFE CRITERIA FOR CONTAMINANTS OF EMERGING CONCERN (2008).
- Packer, J. L., Werner, J. J., Latch, D. E., McNeill, K., & Arnold, W. a. (2003). Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: Naproxen, diclofenac, clofibrac acid, and ibuprofen. *Aquatic Sciences*, 65(4), 342–351. doi:10.1007/s00027-003-0671-8
- Pang, G.-F., Liu, Y.-M., Fan, C.-L., Zhang, J.-J., Cao, Y.-Z., Li, X.-M., ... Guo, T.-T. (2006). Simultaneous determination of 405 pesticide residues in grain by accelerated solvent extraction then gas chromatography-mass spectrometry or liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384(6), 1366–408. doi:10.1007/s00216-005-0237-9
- Petersen, S. O., Henriksen, K., Mortensen, G. K., Krogh, P. H., Brandt, K. K., Sørensen, J., ... Grøn, C. (2003). Recycling of sewage sludge and household compost to arable land: fate and effects of organic contaminants, and impact on soil fertility. *Soil and Tillage Research*, 72(2), 139–152. doi:10.1016/S0167-1987(03)00084-9
- Petrovic, M., Radjenovic, J., Postigo, C., Kuster, M., Farre, M., López de Alda, M., & Barceló, D. (2008). Emerging contaminants in waste waters: sources and occurrence. In *Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste - The Handbook of Environmental Chemistry* (Vol. 5, pp. 1–35). doi:10.1007/698
- Petterson, S., Ashbolt, N., & Sharma, A. (2001). Microbial risks from wastewater irrigation of salad crops: a screening-level risk assessment. *Water Environment Research*, 73(6), 667–672. Retrieved from <http://www.jstor.org/stable/25045556>
- Poiger, T., Buser, H. R., & Müller, M. D. (2001). Photodegradation of the pharmaceutical drug diclofenac in a lake: pathway, field measurements, and mathematical modeling. *Environmental toxicology and chemistry*, 20(2), 256–63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11351424>
- Qadir, M., Wichelns, D., Raschid-Sally, L., McCornick, P. G., Drechsel, P., Bahri, a., & Minhas, P. S. (2010). The challenges of wastewater irrigation in developing countries. *Agricultural Water Management*, 97(4), 561–568. doi:10.1016/j.agwat.2008.11.004
- Quintana, J. B., Weiss, S., & Reemtsma, T. (2005). Pathways and metabolites of microbial degradation of selected acidic pharmaceutical and their occurrence in municipal wastewater treated by a membrane bioreactor. *Water research*, 39(12), 2654–64. doi:10.1016/j.watres.2005.04.068
- Rainsford, K. D. (2011). Fifty years since the discovery of ibuprofen. *Inflammopharmacology*, 19(6), 293–7. doi:10.1007/s10787-011-0103-7
- Ramirez-Fuentes, E., Lucho-Constantino, C., Escamilla-Silva, E., & Dendooven, L. (2002). Characteristics, and carbon and nitrogen dynamics in soil irrigated with wastewater for different lengths of time. *Bioresource Technology*, 85(2), 179–87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12227543>
- Redshaw, C. H., Wootton, V. G., & Rowland, S. J. (2008). Uptake of the pharmaceutical Fluoxetine Hydrochloride from growth medium by Brassicaceae. *Phytochemistry*, 69(13), 2510–6. doi:10.1016/j.phytochem.2008.06.018
- Roberts, P., Roberts, J. P., & Jones, D. L. (2006). Behaviour of the endocrine disrupting chemical nonylphenol in soil: Assessing the risk associated with spreading contaminated waste to land. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(7), 1812–1822. doi:10.1016/j.soilbio.2005.12.006
- Rodríguez Evangelista, F. (2014). Transferencia de dos antibióticos del suelo a plantas. Tesis de maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Romanik, G., Gilgenast, E., Przyjazny, a, & Kamiński, M. (2007). Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 253–61. doi:10.1016/j.jbbm.2006.09.012
- Rubin, B. S. (2011). Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 127(1-2), 27–34. doi:10.1016/j.jsbmb.2011.05.002
- Sabourin, L., Duenk, P., Bonte-Gelok, S., Payne, M., Lapen, D. R., & Topp, E. (2012). Uptake of pharmaceuticals, hormones and parabens into vegetables grown in soil fertilized with municipal biosolids. *Science of the total environment*, 431, 233–6. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.05.017
- Saiyood, S., Vangnai, a S., Thiravetyan, P., & Inthorn, D. (2010). Bisphenol A removal by the *Dracaena* plant and the role of plant-associating bacteria. *Journal of hazardous materials*, 178(1-3), 777–85. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.02.008
- Sánchez González, A., Méndez González, B., & Siebe, C. (2012). USO AGRÍCOLA DEL AGUA RESIDUAL URBANA: EL CASO DE MÉXICO Y CHINA. In Seminario Internacional “América Latina y el Caribe y China: condiciones y retos en el siglo XXI.” Ciudad de México. Retrieved from <http://www.redalc-china.org/PP Seminario ALC-CHINA/Eje C/C2/Christina Siebe.pdf>

- Schenck, F., Lehotay, S., & Vega, V. (2002). Comparison of solid-phase extraction sorbents for cleanup in pesticide residue analysis of fresh fruits and vegetables. *Journal of Separation Science*, 25, 883–890. Retrieved from <http://ddr.nal.usda.gov/handle/10113/553>
- Schmidt, B., & Schuphan, I. (2002). Metabolism of the environmental estrogen bisphenol A by plant cell suspension cultures. *Chemosphere*, 49(1), 51–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12243330>
- Scott-Fordsmand, J. J., & Krogh, P. H. (2004). The influence of application form on the toxicity of nonylphenol to *Folsomia fimetaria* (Collembola: Isotomidae). *Ecotoxicology and environmental safety*, 58(3), 294–9. doi:10.1016/S0147-6513(03)00023-X
- Segura, J., Ventura, R., & Jurado, C. (1998). Derivatization procedures for gas chromatographic-mass spectrometric determination of xenobiotics in biological samples, with special attention to drugs of abuse and doping agents. *Journal of Chromatography. B*, 713(1), 61–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9700553>
- Shevah, Y. (2004). Wastewater Treatment and Reuse for Irrigation. In *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), ENVIRONMENTAL AND ECOLOGICAL CHEMISTRY (Vol. III)*. Retrieved from <http://www.eolss.net/Sample-Chapters/C06/E6-13-06-05.pdf>
- Siebe, C. (1994). Acumulación y disponibilidad de metales pesados en suelos regados con aguas residuales en el distrito de riego 03, Tula, Hidalgo, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 10, 15–21.
- Siebe, C. (1998). Nutrient inputs to soils and their uptake by alfalfa through long-term irrigation with untreated sewage effluent in Mexico. *Soil Use and Management*, 14, 119–122. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1475-2743.1998.tb00628.x/abstract>
- Sigma-Aldrich Co. (1997). Bulletin 909A - Guide to Derivatization Reagents for GC. Retrieved from <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Supelco/Bulletin/t196909.pdf>
- Sigma-Aldrich Co. (1998). Bulletin 910 - Guide to Solid Phase Extraction. Retrieved from <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
- Sigma-Aldrich Co. Estructuras de analitos de interés:
 - Estructura Nonilfenol. Imagen digital. Web. Accesado enero 14, 2014. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure8/007/a_____290858.eps/_jcr_content/renditions/large.png>.
 - Estructura Bisfenol-A. Imagen digital. Web. Accesado enero 14, 2014. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure9/054/mfcd00002366.eps/_jcr_content/renditions/large.png>.
 - Estructura Naproxeno. Imagen digital. Web. Accesado enero 14, 2014. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure4/191/mfcd00010500.eps/_jcr_content/renditions/large.png>.
 - Estructura Ibuprofeno. Imagen digital. Web. Accesado enero 14, 2014. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure2/151/mfcd00010393.eps/_jcr_content/renditions/large.png>.
 - Estructura Diclofenaco. Imagen digital. Web. Accesado enero 14, 2014. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/structure6/042/mfcd00082251.eps/_jcr_content/renditions/large.png>.
- Sinclair, H. (2000). Over-the-counter ibuprofen: how and why is it used? *The International Journal of Pharmacy Practice*, 8(June), 121–127. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2042-7174.2000.tb00996.x/abstract>
- Sjöström, A. E., Collins, C. D., Smith, S. R., & Shaw, G. (2008). Degradation and plant uptake of nonylphenol (NP) and nonylphenol-12-ethoxylate (NP12EO) in four contrasting agricultural soils. *Environmental pollution*, 156(3), 1284–9. doi:10.1016/j.envpol.2008.03.005
- So, H. B. (2005). Slaking, Dispersion, and Crust Formation. In R. Lal (Ed.), *Encyclopedia of Soil Science (Second Ed., pp. 1579–1582)*. CRC Press. doi:10.1201/NOE0849338304.ch331
- Soares, a, Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., & Lester, J. N. (2008). Nonylphenol in the environment: a critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment international*, 34(7), 1033–49. doi:10.1016/j.envint.2008.01.004
- Sovizi, M. R. (2010). Thermal behavior of drugs. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 102(1), 285–289. doi:10.1007/s10973-009-0668-1
- Stanier, R., & Smith, J. (1960). The chlorophylls of green bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 41, 478–484. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006300260900457>
- Strain, H., Sherma, J., & Grandolfo, M. (1967). Alteration of chloroplast pigments by chromatography with siliceous adsorbents. *Analytical Chemistry*, 141(490). Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60252a001>
- Suárez, S., Carballa, M., Omil, F., & Lema, J. M. (2008). How are pharmaceutical and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters? *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7(2), 125–138. doi:10.1007/s11157-008-9130-2
- Tanaka, T., Hori, T., Asada, T., Oikawa, K., & Kawata, K. (2007). Simple one-step extraction and cleanup by pressurized liquid extraction for gas chromatographic-mass spectrometric determination of pesticides in green leafy vegetables. *Journal of Chromatography. A*, 1175(2), 181–6. doi:10.1016/j.chroma.2007.10.060

- Tanoue, R., Sato, Y., Motoyama, M., Nakagawa, S., Shinohara, R., & Nomiya, K. (2012). Plant uptake of pharmaceutical chemicals detected in recycled organic manure and reclaimed wastewater. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(41), 10203–11. doi:10.1021/jf303142t
- Ternes, T. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water research*, 32(11), 3245–3260. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135498000992>
- Terzić, S., Senta, I., Ahel, M., Gros, M., Petrović, M., Barcelo, D., ... Jabucar, D. (2008). Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. *Science of the total environment*, 399(1-3), 66–77. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.03.003
- Tita, B., Fulias, A., Stefanescu, M., Marian, E., & Tita, D. (2011). Kinetic study of decomposition of ibuprofen under isothermal conditions. *Revista de Chimie*, 62(2), 216–221. Retrieved from http://www.revistadechimie.ro/pdf/TITA_B.pdf
- Tixier, C., Singer, H. P., Oellers, S., & Müller, S. R. (2003). Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters. *Environmental science & Technology*, 37(6), 1061–1068. Retrieved from <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es025834r>
- Topp, E., Hendel, J. G., Lapen, D. R., & Chapman, R. (2008). Fate of the nonsteroidal anti-inflammatory drug naproxen in agricultural soil receiving liquid municipal biosolids. *Environmental toxicology and chemistry*, 27(10), 2005–10. doi:10.1897/07-644.1
- Trapp, S. (2000). Modelling uptake into roots and subsequent translocation of neutral and ionisable organic compounds. *Pest Management Science*, 56(March), 767–778. Retrieved from [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1526-4998\(200009\)56:9%3C767::AID-PS198%3E3.0.CO;2-Q/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1526-4998(200009)56:9%3C767::AID-PS198%3E3.0.CO;2-Q/full)
- Trapp, S. (2009). Bioaccumulation of Polar and Ionizable Compounds in Plants. In J. Devillers (Ed.), *Ecotoxicology Modeling - Emerging Topics in Ecotoxicology* (Vol. 2, pp. 299–353). Boston, MA: Springer US. doi:10.1007/978-1-4419-0197-2
- Tsai, M.-S., Chang, C.-H., Tsai, Y.-A., Liao, K.-W., Mao, I.-F., Wang, T.-H., ... Chen, M.-L. (2013). Neonatal outcomes of intrauterine nonylphenol exposure-A longitudinal cohort study in Taiwan. *Science of the total environment*, 458-460C, 367–373. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.04.039
- Tudja, P. T., Han, M. Z. I. K., & Es, E. M. (2001). Thermal Behaviour of Diclofenac Sodium: Decomposition and Melting. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 49(October), 1245–1250.
- USEPA. (2013). Estimation Programs Interface (EPI) Suite™ for Microsoft® Windows, v4.11. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA.
- Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., & Welshons, W. V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive toxicology* (Elmsford, N.Y.), 24(2), 139–77. doi:10.1016/j.reprotox.2007.07.010
- Vazquez-Duhalt, R., Marquez-Rocha, F., Ponce, E., Licea, A. F., & Viana, M. T. (2005). Nonylphenol, an integrated vision of a pollutant. *Applied Ecology and Environmental Research*, 4(1), 1–25. Retrieved from http://www.ecology.kee.hu/pdf/0401_001025.pdf
- Viana, E., Moltó, J. C., & Font, G. (1996). Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the analysis of pesticide residues in vegetables. *Journal of Chromatography. A*, 754(1-2), 437–44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8997735>
- Villagrasa, M., Guillamón, M., Labandeira, A., Taberner, A., Eljarrat, E., & Barceló, D. (2006). Benzoxazinoid allelochemicals in wheat: distribution among foliage, roots, and seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(4), 1009–15. doi:10.1021/jf050898h
- Vom Saal, F. S., & Hughes, C. (2005). An Extensive New Literature Concerning Low-Dose Effects of Bisphenol A Shows the Need for a New Risk Assessment. *Environmental Health Perspectives*, 113(8), 926–933. doi:10.1289/ehp.7713
- Webster, G. (2006). Soxhlet and Ultrasonic Extraction of Organics in Solids. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, Online. John Wiley & Sons, Ltd. doi:10.1002/9780470027318.a0864
- Weigel, S., Berger, U., Jensen, E., Kallenborn, R., Thoresen, H., & Hühnerfuss, H. (2004). Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and seawater from Tromsø/Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. *Chemosphere*, 56(6), 583–92. doi:10.1016/j.chemosphere.2004.04.015
- Widarto, T. H., Holmstrup, M., & Forbes, V. E. (2004). The influence of nonylphenol on life-history of the earthworm *Dendrobaena octaedra* Savigny: linking effects from the individual- to the population-level. *Ecotoxicology and environmental safety*, 58(2), 147–59. doi:10.1016/j.ecoenv.2004.03.006
- Winker, M., Clemens, J., Reich, M., Gulyas, H., & Otterpohl, R. (2010). Ryegrass uptake of carbamazepine and ibuprofen applied by urine fertilization. *Science of the Total Environment*, 408(8), 1902–8. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.01.028
- World Health Organization. (1996). Trace elements in human nutrition and health (p. 361). World Health Organization. Retrieved from http://whqlibdoc.who.int/publications/1996/9241561734_eng.pdf?ua=1
- Wu, X., Conkle, J., & Gan, J. (2012). Multi-residue determination of pharmaceutical and personal care products in vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1254, 78–86. doi:10.1016/j.chroma.2012.07.041
- Wu, X., Ernst, F., Conkle, J. L., & Gan, J. (2013). Comparative uptake and translocation of pharmaceutical and personal care products (PPCPs) by common vegetables. *Environment international*, 60, 15–22. doi:10.1016/j.envint.2013.07.015
- Xie, Z., & Ebinghaus, R. (2008). Analytical methods for the determination of emerging organic contaminants in the atmosphere. *Analytica chimica acta*, 610(2), 156–78. doi:10.1016/j.aca.2008.01.055

- Xu, J., Chen, W., Wu, L., Green, R., & Chang, A. C. (2009d). Leachability of some emerging contaminants in reclaimed municipal wastewater-irrigated turf grass fields. *Environmental toxicology and chemistry*, 28(9), 1842–50. doi:10.1897/08-471.1
- Xu, J., Wu, L., & Chang, A. C. (2009). Degradation and adsorption of selected pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in agricultural soils. *Chemosphere*, 77(10), 1299–305. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.09.063
- Xu, J., Wu, L., Chang, A. C., & Zhang, Y. (2010a). Impact of long-term reclaimed wastewater irrigation on agricultural soils: a preliminary assessment. *Journal of hazardous materials*, 183(1-3), 780–6. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.07.094
- Xu, J., Wu, L., Chen, W., & Chang, A. C. (2009b). Leaching potential of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in soils. *Environmental toxicology and chemistry*, 29(4), 800–807. doi:10.1002/etc.107
- Xu, J., Wu, L., Chen, W., Jiang, P., & Chang, A. C.-S. (2009c). Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs), and Endocrine Disrupting Compounds (EDCs) in Runoff from a Potato Field Irrigated with Treated Wastewater in Southern California. *Journal of Health Science*, 55(2), 306–310. doi:10.1248/jhs.55.306
- Yamamoto, H., Nakamura, Y., Moriguchi, S., Nakamura, Y., Honda, Y., Tamura, I., ... Sekizawa, J. (2009). Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: laboratory photolysis, biodegradation, and sorption experiments. *Water research*, 43(2), 351–62. doi:10.1016/j.watres.2008.10.039
- Yamamoto, T., Yasuhara, A., & Shiraishi, H. (2001). Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates. *Chemosphere*, 42(March 2000), 1999–2002. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653500000795>
- Yamamoto, T., Yasuhara, A., & Shiraishi, H. (2001). Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates. *Chemosphere*, 42, 415–418. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653500000795>
- Yang, C., Meng, X.-Z., Chen, L., & Xia, S. (2011). Polybrominated diphenyl ethers in sewage sludge from Shanghai, China: possible ecological risk applied to agricultural land. *Chemosphere*, 85(3), 418–23. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.07.068
- Ying, G.-G., & Kookana, R. S. (2005). Sorption and degradation of estrogen-like-endocrine disrupting chemicals in soil. *Environmental toxicology and chemistry*, 24(10), 2640–5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16268167>
- Ying, G.-G., Williams, B., & Kookana, R. (2002). Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates--a review. *Environment international*, 28(3), 215–26. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12222618>
- Yuan, S. Y., Yu, C. H., & Chang, B. V. (2004). Biodegradation of nonylphenol in river sediment. *Environmental Pollution*, 127(3), 425–430. doi:10.1016/j.envpol.2003.08.010
- Zayed, M. a., Hawash, M. F., Fahmey, M. a., & El-Gizouli, A. M. M. (2012). Investigation of ibuprofen drug using mass spectrometry, thermal analyses, and semi-empirical molecular orbital calculation. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 108(1), 315–322. doi:10.1007/s10973-011-1876-z
- Zeng, G., Zhang, C., Huang, G., Yu, J., Wang, Q., Li, J., ... Liu, H. (2006). Adsorption behavior of bisphenol A on sediments in Xiangjiang River, Central-south China. *Chemosphere*, 65(9), 1490–9. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.04.013
- Zhang, Y., Geissen, S.-U., & Gal, C. (2008). Carbamazepine and diclofenac: removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere*, 73(8), 1151–61. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.07.086
- Zhao, J., Li, Y., Zhang, C., Zeng, Q., & Zhou, Q. (2008). Sorption and degradation of bisphenol A by aerobic activated sludge. *Journal of hazardous materials*, 155(1-2), 305–11. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.11.075
- Zheng, S., & Zhang, M. (2011). Effect of moisture regime on the redistribution of heavy metals in paddy soil. *Journal of Environmental Sciences*, 23(3), 434–443. doi:10.1016/S1001-0742(10)60428-7
- Zhu, F.-D., Choo, K.-H., Chang, H.-S., & Lee, B. (2012). Interaction of bisphenol A with dissolved organic matter in extractive and adsorptive removal processes. *Chemosphere*, 87(8), 857–64. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.01.026
- Zwiener, C., & Frimmel, F. H. (2003). Short-term tests with a pilot sewage plant and biofilm reactors for the biological degradation of the pharmaceutical compounds clofibrac acid, ibuprofen, and diclofenac. *The Science of the total environment*, 309(1-3), 201–11. doi:10.1016/S0048-9697(03)00002-0
- Zwiener, C., Glauner, T., & Frimmel, F. H. (2000). Biodegradation of pharmaceutical residues investigated by SPE-GC/ITD-MS and on-line derivatization. *Journal of High Resolution Chromatography*, 23(7/8), 474–478. Retrieved from [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1521-4168\(20000801\)23:7/8%3C474::AID-JHRC474%3E3.0.CO;2-B/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1521-4168(20000801)23:7/8%3C474::AID-JHRC474%3E3.0.CO;2-B/abstract)
- Żwir-Ferenc, A., & Biziuk, M. (2006). Solid Phase Extraction Technique-Trends, Opportunities and Applications. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(5), 677–690.