



Universidad de Chile  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Departamento de Química Inorgánica y Analítica  
Laboratorio de Química y Bioquímica de suelos

# DETERMINACIÓN DE TRICLOSÁN EN TEJIDO VEGETAL Y EVALUACIÓN DE SU FRACCIÓN BIOACCESIBLE.

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

**Cristóbal Alejandro Sandoval Páez**

**Patrocinante**

**Dr. Jorge Mendoza C.**

Laboratorio de Química y Bioquímica de suelos  
Departamento de Química Inorgánica y Analítica  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Universidad de Chile

**Directores**

**Dr. Jorge Mendoza C.**

**Dra. Tatiana Garrido R.**

Laboratorio de Química y Bioquímica de suelos  
Departamento de Química Inorgánica y Analítica  
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas  
Universidad de Chile

Santiago de Chile, 2016

#### AGRADECIMIENTOS:

Financiado por Proyectos ENL-4/12 de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Chile y por Proyectos Transversales en Investigación y Desarrollo 2014 de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

## **Agradecimientos**

*Quiero agradecer en primer lugar a mis directores de tesis, profesores Jorge Mendoza y Tatiana Garrido, por permitirme realizar mi memoria de título con ellos, otorgándome su apoyo en todo momento. Me permito decir que no solo conocí a dos grandes profesionales, sino a dos grandes personas que siempre estuvieron disponibles para mí como también para todos los estudiantes que hemos tenido el agrado de haber trabajado en el laboratorio.*

*También agradecer a mis compañeros de laboratorio, que han sido muchos, entre ellos: Cristian, Andrés, Gonzalo, Francisca A y Francisca H, Margaret, Álvaro, de los cuales me llevo el cariño y el apoyo que me otorgaron.*

*Mis compañeros y amigos de universidad, tuve el privilegio de conocer a excelentes estudiantes y por sobre todo a grandes personas durante mi paso por la universidad, entre ellos mis compañeros de carrera: Yipssia, Alex, Diego, Renato, Cesar, Pancho, Matías, Ana, Sebastián, Andrea, Patricio y muchos más, de los cuales siempre recibí buenos gestos.*

*Por último a mi familia, agradezco algo simple, que es la confianza que siempre tuvieron mis padres y hermanas en mí, la confianza que se transforma en libertad, libertad de poder arriesgarme. Agradezco a mi madre y padre que siempre han estado para mí, entregándome su apoyo incondicional y su cariño.*

## Determinación de triclosán en tejido vegetal y evaluación de su fracción bioaccesible

En vista de la toxicidad descrita para triclosán, su uso en diversos productos de higiene personal y los hallazgos descritos en la literatura sobre la presencia de triclosán en aguas residuales, las cuales se usan para regadío en zonas agrícolas, se planteó para este estudio el evaluar la bioaccesibilidad de triclosán en dos hortalizas consumidas frecuentemente en Chile. Se eligió la lechuga (*Lactuca Sativa* L.) como modelo de hortaliza cuya parte comestible no está en contacto con el suelo, y rábano (*Raphanus sativus* L.) cuya parte comestible se desarrolla en contacto directo con el suelo. Para llevar a cabo este objetivo, ambas especies se cultivaron en un medio hidropónico y posteriormente fueron tratadas con solución que contenía triclosán. La bioaccesibilidad del triclosán en el tejido vegetal se estimó mediante una prueba de bioaccesibilidad in vitro basada en la fisiología (PBET). Para el análisis de triclosán se implementó y validó un método por cromatografía de gases con detector de micro captura electrónica (GC- $\mu$ ECD) para determinar su concentración pseudototal en la matriz vegetal y su concentración en los fluidos gastrointestinales sustitutos.

Los resultados señalan que el triclosán puede ser extraído eficientemente desde matrices vegetales mediante un solvente constituido por agua: acetonitrilo 1:1 y ácido metafosfórico al 2% (p/p) con posterior concentración y limpieza en columnas de extracción en fase sólida (C-18). El método optimizado cumplió con los principales parámetros de validación, entre estos se destacan el ser un método selectivo y sensible, con límites de detección y cuantificación de la técnica de 0,32 y 0,97  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente; con un coeficiente de variación de 10,7% en la reproducibilidad y una recuperación de 88,1%.

El triclosán puede ser absorbido por plantas de lechuga y rábano cultivadas hidropónicamente. En el caso de lechuga, el triclosán puede ser translocado significativamente a la parte aérea, en tanto que para el rábano el compuesto se acumula en la raíz reservante de la planta. Mediante una prueba PBET se demuestra que una fracción del triclosán se encuentra en forma bioaccesible en la parte comestible de lechuga y rábano. La concentración bioaccesible en hoja de lechuga de cultivo hidropónico varió en el rango de 0,14-0,45  $\mu\text{g/g}$ , el cual representa una variación en la bioaccesibilidad en el rango de 5,6-16%. En el caso de rábano, los rangos fueron 0,15-0,34  $\mu\text{g/g}$  y 7,9-36,6%, respectivamente.

## Triclosan determination of tissue plant and evaluation of fraction bioaccessible

In view of the toxicity of triclosan, the use of this compound in various personal hygiene products and information published in other countries about the presence of triclosan in wastewater, which are used for irrigation in agricultural areas, was proposed for this study to evaluate the bioaccessibility of triclosan in two vegetables commonly consumed in Chile. Lettuce (*Lactuca sativa* L.) was chosen as a model vegetable whose edible portion is not in contact with the soil, and radish (*Raphanus sativus* L.) whose edible portion is developed in direct contact with the soil. To carry out this goal, both species were grown in a hydroponic medium and subsequently treated with a solution containing triclosan. The bioaccessibility of triclosan in plant tissue was estimated using an in vitro test based on the physiology (PBET). For the analysis of triclosan it was implemented and validated a method by gas chromatography with electron micro capture detector (GC- $\mu$ ECD) to determine the pseudototal concentration in the vegetal matrix and the concentration in the gastrointestinal fluids substitutes.

The results indicate that the triclosan can be extracted efficiently from plant matrices using a solvent consisting of water: acetonitrile 1:1 and metaphosphoric acid 2% (w/w) with subsequent concentration and cleaning in columns of solid phase extraction (C-18). The optimized method complies with the main validation parameters, among them are highlighted a selective and sensitive method with limits of detection and quantification of the technique of 0.32 and 0.97  $\mu\text{g/L}$ , respectively, with a coefficient of variation of 10.7% in reproducibility and with a 88.1% recovery.

Triclosan can be absorbed by lettuce and radish grown hydroponically. In the case of lettuce, triclosan can be translocated to the aerial part significantly, while for radish, compound accumulates in the storage organ of the plant. Through a PBET test it shows that a fraction of triclosan is bioaccessible in the edible part of lettuce and radish. The bioaccessible concentrations in lettuce leaves varied in the range 0.14-0.45  $\mu\text{g/g}$ , which represents a variation in the bioaccessibility in the range 5.6-16%. In the case of radish, the ranges were 0.15-0.34  $\mu\text{g/g}$  and 7.9-36.6%, respectively.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Aguas residuales.....	1
1.2. Contaminantes emergentes.....	1
1.2.1. TCS. ....	3
1.3. Biodisponibilidad y bioaccesibilidad de contaminantes. ....	8
1.4. Análisis de TCS.....	9
1.4.1. Cromatografía .....	10
1.4.2. SPE .....	11
1.5. Validación.....	12
1.6. Planteamiento del problema .....	13
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	14
3. MATERIALES .....	15
4. METODOLOGÍA .....	17
4.1. Cromatografía de gases. ....	17
4.2. Obtención de muestra vegetal.....	17
4.3. Determinación de concentración pseudototal de TCS en matriz vegetal. ....	19
4.4. Bioaccesibilidad mediante solución sustituta de fluido gastrointestinal. ....	21
4.4.1. Bioaccesibilidad mediante método SBET .....	21
4.4.2. Bioaccesibilidad mediante método PBET .....	21
4.5. Contenido de metal total en muestras de vegetales. ....	22
4.6. Validación.....	22
5. RESULTADOS .....	25
5.1. Análisis cromatográfico.....	25
5.2. Extracción de TCS desde la matriz vegetal. ....	28
5.3. SPE.....	29
5.4. Validación.....	32
5.4.1. Selectividad .....	33
5.4.2. Linealidad, sensibilidad y límites .....	33
5.4.3. Recuperación.....	34
5.4.4. Repetibilidad .....	36

5.4.5. Reproducibilidad .....	37
5.5. Obtención de muestras vegetales.....	38
5.5.1. Determinación de TCS pseudototal en ejemplares de lechuga de invernadero....	41
5.5.2. Cultivo hidropónico de lechuga .....	43
5.5.3. Cultivo hidropónico de rábano.....	44
5.6. Determinación de la concentración pseudototal de TCS en muestras vegetales. ....	45
5.7. Determinación de la bioaccesibilidad de TCS en muestras vegetales .....	47
5.8. Contenido de metales en vegetales.....	48
6. DISCUSIÓN.....	50
7. CONCLUSIÓN.....	55
BIBLIOGRAFÍA.....	56
ANEXOS.....	63

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Origen y destinos de PPCPs en el medio ambiente .....	3
Figura 2: Estructura química de TCS .....	4
Figura 3: Sistema integral DSA/TOF .....	11
Figura 4: Cromatograma de estándares de TCS, MTCS, TCC, n-hexano y acetona obtenido con programa optimizado por GC- $\mu$ CD .....	26
Figura 5: Cromatograma de estándares de TCS y estándar interno PCB 28 .....	26
Figura 6: Espectro de estándar de TCS 100ppm/NaOH, DSA-TOF-MS.....	27
Figura 7: Espectro de extracto de Lechuga con TCS + cafeína/NaOH, DSA-TOF-MS.....	27
Figura 8: Espectro de extracto de Lechuga sin TCS/NaOH, DSA-TOF-MS .....	28
Figura 9: Equipo manifold para SPE .....	30
Figura 10: Protocolo para determinar TCS pseudototal en muestras vegetales .....	32
Figura 11: Cromatogramas de solución estándar de TCS obtenidos con distintos programas cromatográficos .....	33
Figura 12: Gráfico concentraciones de TCS vs razón de áreas .....	34
Figura 13: Hojas de lechuga comercial en contacto con solución acuosa de TCS .....	39
Figura 14: Lechugas de invernadero en contacto en SN.....	42
Figura 15: Cultivo hidropónico de lechugas .....	44
Figura 16: Cultivo hidropónico de rábanos.....	45
Figura 17: Anillo de porfirina y visión 3D de clorofila.....	51



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Características físicoquímicas de TCS.....	4
Tabla 2: Concentraciones de TCS (µg/L) en aguas residuales tratadas y no tratadas. ....	6
Tabla 3: Tratamientos y técnicas ocupadas para determinar de TCS en diversas matrices. ....	9
Tabla 4: Condiciones cromatográficas para el análisis de agentes desinfectantes. ....	25
Tabla 5: Análisis de TCS en cartridges C-18 utilizados previamente en determinación de TCS pseudototal y bioaccesible .....	30
Tabla 6: Concentración de TCS en prueba de recuperación.....	35
Tabla 7: Concentración de TCS en prueba de repetibilidad. ....	37
Tabla 8: Concentración de TCS en prueba de reproducibilidad. ....	38
Tabla 9: Determinación de TCS en diversas matrices acuosas (SN, CaCl <sub>2</sub> y H <sub>2</sub> O) a distintas concentraciones. ....	39
Tabla 10: Determinación de TCS en solución nutritiva a distintas concentraciones de TCS. ....	40
Tabla 11: Determinación de TCS en soluciones agua/acetona a distintas proporciones. ....	41
Tabla 12: Concentración de TCS pseudototal en lechugas de invernadero expuestas a diversas concentraciones del compuesto.....	42
Tabla 13: Concentración de TCS pseudototal en lechugas de invernadero expuestas a distintos tiempos de exposición del compuesto.....	43
Tabla 14: Concentración de TCS pseudototal en ejemplares comerciales de lechuga y rábano tratados con TCS.....	46
Tabla 15: Concentración de TCS pseudototal en muestras vegetales obtenidas de cultivo hidropónico tratadas con TCS (20 mg/L).....	46
Tabla 16: Concentración de TCS bioaccesible en ejemplares comerciales de lechuga y rábano utilizando método PBET.....	47
Tabla 17: Concentración de TCS bioaccesible en muestras de lechuga y rábano obtenidas de cultivo hidropónico utilizando método PBET. ....	48
Tabla 18: Concentración de macro y micronutrientes en muestras vegetales de lechuga y rábano obtenidas de cultivo hidropónico. ....	49

## ABREVIATURAS

CG- $\mu$ ECD	Cromatógrafo de gases con detector de microcaptura de electrones.
DSA-TOF-MS	Análisis directo de muestra-tiempo de vuelo-espectrometría de masas.
$K_d$	Constante de distribución
$K_{o/w}$	Constante de reparto octanol-agua
MPA	Ácido metafosfórico.
MSPD	Dispersión de matriz en fase sólida.
MTCS	Metiltriclosán.
PPCPs	Productos farmacéuticos y de cuidado personal.
SN	Solución nutritiva
SPE	Extracción en fase sólida.
$T^{\circ}$	Temperatura.
TCC	Triclocarban.
TCS	Triclosán.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Aguas residuales.

El agua es un recurso natural indispensable para la vida humana y para el desarrollo y mantenimiento del medio ambiente. El uso inadecuado de este recurso como medio de eliminación de diversos tipos de compuestos químicos, generados por actividades de origen antrópico, ha producido un importante deterioro de su calidad. El agua que recibe descargas de desechos de alguna actividad humana (industrial o doméstica) se denomina agua residual, la cual requiere en la mayoría de los casos un tratamiento previo a ser reutilizada o vertida al medio ambiente. Las aguas residuales poseen diversos orígenes, entre los cuales están las aguas *residuales domésticas* (aguas negras), las que contienen una gran cantidad de materia orgánica, residuos de jabones, detergentes y microorganismos. Las aguas *blancas*, compuestas por aguas de procedencia atmosférica (lluvia, nieve o hielo), aguas de riego y de limpieza de lugares públicos (calles y parques). Las aguas *residuales industriales*, éstas se originan de los procesos realizados por fábricas e industrias y contienen aceites, detergentes, antibióticos, ácidos, grasas, además de productos y subproductos de origen mineral, químico, vegetal y animal. Finalmente, las aguas *residuales agrícolas*, las que se originan de las actividades agrícolas en zonas rurales (Epigares y col., 1985).

Entre los contaminantes presentes en las aguas residuales se encuentra un variado grupo de compuestos que se han llamado contaminantes emergentes, los cuales han sido de interés de las autoridades sanitarias mundiales en las últimas décadas (Gil y col., 2012).

## 1.2. Contaminantes emergentes

Los contaminantes emergentes son compuestos de distinto origen y naturaleza química, de los cuales se tiene escasa información de su presencia e impacto en el ambiente y en el ser humano. Entre las características que presentan éstos compuestos están:

- Persistencia: Resistencia a la degradación fotoquímica, biológica y química.
- Bioconcentración: Sustancias con mayor afinidad por tejidos orgánicos.
- Bioacumulación: Aumento de la concentración en algún tejido en función del tiempo.
- Toxicología: Efectos en la salud humana y animal.

- Movilidad ambiental: Capacidad de cambiar de medio.
- Transformaciones en el ambiente: Ciertos compuestos pueden transformarse en metabolitos con mayor toxicidad que el compuesto inicial.

Estos compuestos se encuentran en bajas concentraciones (generalmente en partes por millón o partes por trillón) y muchos no se encuentran regulados o reglamentados por la mayoría de los países (Kuster y col., 2008; Henríquez, 2010). Es por esto que el estudio de los nuevos contaminantes se encuentra entre las líneas de investigación de los principales organismos dedicados a la protección de la salud pública y medioambiental, entre los cuales se encuentra la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA) y la Comisión Europea. Entre la diversidad de compuestos que se pueden encontrar denominados como contaminantes emergentes están (Gómez y col., 2006; Parsons y col., 2008; Tauxe-Wuersch y col., 2005; Colman y col., 2011; Henríquez, 2010; Jobling y col., 1995; Birbaum y col., 2004; Terzić y col., 2008; Richardson, 2003):

- Pesticidas
- Fármacos: analgésicos y antiinflamatorios, antihipertensivos, antibióticos y hormonas esteroideas (estrógenos y andrógenos naturales y sintéticos).
- Productos de cuidado personal: perfumes, fragancias, agentes de protección solar, repelentes de insectos, desinfectantes.
- Surfactantes.
- Productos para tratamientos de aguas.
- Aditivos industriales y subproductos: disolventes clorados, hidrocarburos de petróleo, hidrocarburos poliaromáticos, plastificantes.
- Retardantes de llama/fuego
- Aditivos alimentarios.

Los productos farmacéuticos y de cuidado personal (PPCPs) han comenzado a surgir como un grupo de interés medioambiental. Algunos estudios han demostrado que los PPCPs no se eliminan por completo durante el tratamiento de aguas residuales y son descargados en los medios acuáticos, también indican que los PPCPs se pueden encontrar en efluentes, arroyos, biosólidos, y en sedimentos en el rango de partes por trillón y partes por millón (Daughton y col., 1999; Karnjanapiboonwong y col., 2011).

Otra de las características representativas de dichos compuestos, es que a pesar de ser removidos en un alto porcentaje desde las aguas residuales por las plantas de tratamiento, la elevada tasa de producción y alto consumo que poseen por parte de la población (Gil y col., 2012) generan una continua introducción de estos compuestos al medio acuático; adicionalmente, debido a sus propiedades físico-químicas (hidrofilia y lipofilia) son capaces de llegar a cualquier medio natural (bioconcentración) y representar un grave riesgo medioambiental. La figura 1 presenta un esquema del origen y destino de los PPCPs en el ambiente.

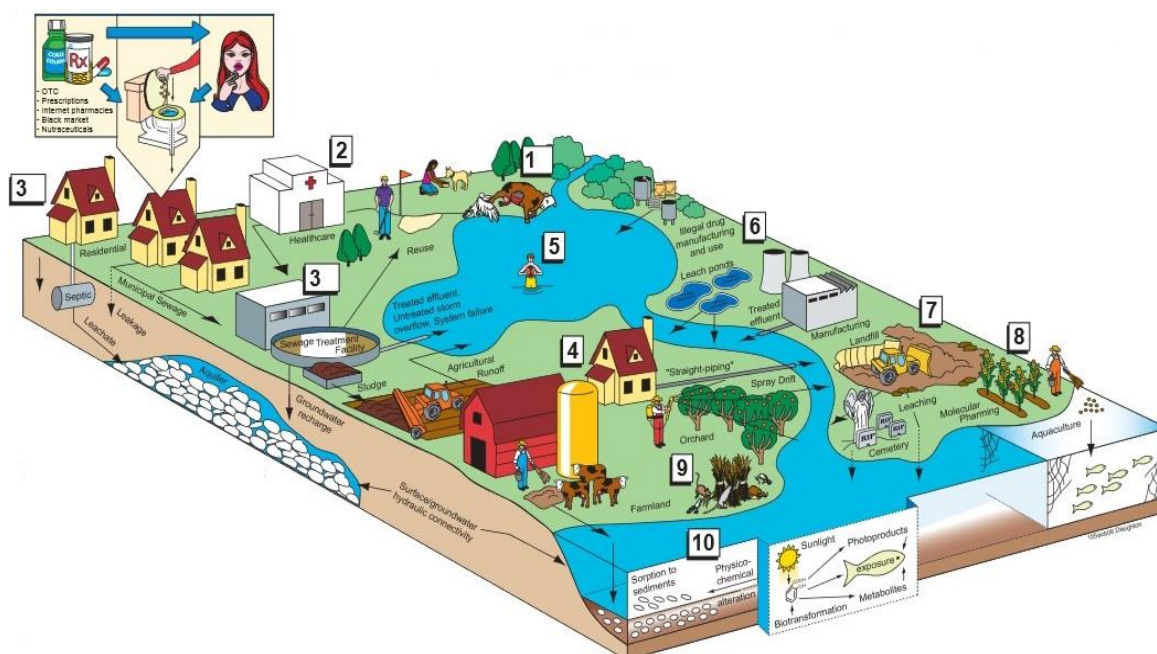


Figura 1: Origen y destinos de PPCPs en el medio ambiente. 1. Uso individual y en animales 2. Desechos hospitalarios 3. Fosas sépticas privadas 4. Aplicación directa de biosólidos de aguas residuales a suelos 5. Introducción por actividades recreacionales 6. Descargas industriales 7. Lixiviación desde vertederos 8. Liberaciones derivadas de la acuicultura 9. Descargas de compuestos usados en el control de plagas 10. Destino final derivado del transporte, transformación y degradación de los PPCPs. (fuente Varano, 2014).

### 1.2.1. Triclosán.

El TCS, catalogado como contaminante emergente, corresponde a un fenoxifenol triclorado [5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi) fenol] (figura 2), comercializado bajo el nombre de Irgacare MP o Irgasan DP 300. Entre sus características fisicoquímicas están su baja

solubilidad en agua, estabilidad hidrolítica y baja volatilidad. La tabla 1 presenta sus principales características (Samsøe-Petersen y col. 2003; Reiss y col., 2002).

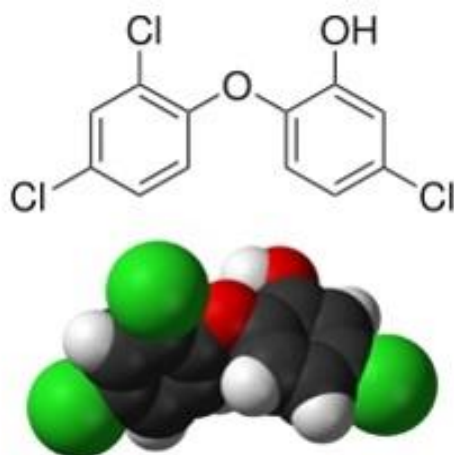


Figura 2: Estructura química de TCS.

Tabla 1: Características físicoquímicas de TCS.

Característica	Valor	Referencia
Peso Molecular	289,6 g/mol	Reiss y col., 2002 Samsøe-Petersen y col., 2003
Solubilidad en agua	10-12 mg/L	Reiss y col., 2002 Samsøe-Petersen y col., 2003
$K_d$	8,14 a 20°C	Reiss y col., 2002
Presión de vapor	0,0007 Pa a 25°C	Reiss y col., 2002
$\log K_{ow}$	4,8	Reiss y col., 2002 Samsøe-Petersen y col., 2003

El TCS es ocupado como desinfectante ya que posee un amplio espectro bactericida contra bacterias Gram +, Gram -, hongos y levaduras. Su mecanismo de acción es inhibir la proteína transportadora enoil-acil reductasa (ENR), la cual participa en la biosíntesis de ácidos grasos necesarios para la formación de paredes celulares y en la reproducción de bacterias. Este compuesto se encuentra presente en variados productos relacionados con la desinfección (jabones, desodorantes, limpiadores, champús y cosméticos) en un rango que va desde 0,1 a 0,3 %, (McAvoy y col., 2002; Boyd y col., 2004).

Con respecto a la toxicología, el TCS es un compuesto de baja toxicidad aguda. Estudios sobre su uso en productos de cuidado personal indican que a las concentraciones utilizadas en tales productos (0,3 %) no es tóxico ni irritante de ojos y piel (Real decreto 1599/1997. España). Las vías de ingreso de TCS al cuerpo humano son por contacto con la piel, las mucosas y a través del tracto gastrointestinal (McAvoy y col., 2002). La exposición a TCS en el ser humano es limitada, debido a que este compuesto es rápidamente metabolizado y excretado a través de la orina, lo que se traduce en una baja probabilidad de generar efectos tóxicos de tipo genotóxicos, teratogénicos, mutagénicos o carcinogénicos al utilizar productos que contengan TCS. No obstante, el TCS presenta similitud estructural con hormonas tiroideas y con disruptores androgénicos y estrogénicos (bifenilos y los difenil éteres halogenados) lo cual se traduce en la posibilidad de generar efectos endocrinos. Algunos trabajos en animales reportaron que el TCS puede interactuar con los receptores de las hormonas tiroideas generando una disminución de los niveles de tiroxina en el plasma (Crofton y col., 2007). Adicionalmente, en algunos trabajos realizados in vitro se observó la unión de TCS a receptores estrogénicos y androgénicos, donde este analito presentaría una actividad antiestrogénica o antiandrogénica (Witorsch, 2010).

A nivel medioambiental, específicamente en aguas, el primer eslabón en la pirámide alimenticia son las algas, un efecto sobre éstos organismos tendría el potencial de generar un efecto en toda la cadena. Las algas unicelulares, específicamente las algas verdes y las cianobacterias, son 30 a 80 veces más sensibles a la exposición a TCS que otros organismos acuáticos (Orvos y col., 2004). El crecimiento de estas algas puede ser inhibido a concentraciones de TCS entre 1,3 y 13 ng/mL con un tiempo de exposición de 4 días. En los vertebrados, la toxicidad del TCS ha sido estudiada en peces. En un estudio el grupo científico de Orvos y col., (2004) descubrió que las crías de la trucha arco-iris presentaban una disminución de su supervivencia cuando eran expuestas durante periodos de 1 a 2 meses a niveles de TCS de 71,3 ng/mL y para las truchas perca (*Leponis macrochirus*), en torno a los 260-440 ng/mL. Para el caso de los anfibios, se evaluó la toxicidad de TCS para la rana leopardo (*Rana pipiens*), y se observó que a concentraciones de 230 ng/mL se provocaron alteraciones del sistema nervioso (Fraker y col., 2004).

En el caso del ser humano, algunos trabajos han evaluado la presencia de TCS en leche materna, en plasma y orina de individuos que usaban productos de cuidado personal que contenían en su formulación TCS. Las concentraciones de TCS en la leche materna

encontradas fueron entre 0,022 y 9 ng/g (Adolfsson-Erici y col., 2002), en el caso de plasma, los niveles encontrados fluctuaron entre 0.4 y 38 ng/g (Allmyra y col., 2006) y en orina fueron de 127 ng/mL (Ye y col., 2005).

Diferentes estudios indican la presencia de TCS en distintas matrices medioambientales, tales como aguas residuales y superficiales, sedimentos, lodos (Thompson y col., 2005; Boyd y col., 2004). En el caso de las aguas, su concentración varía entre aguas residuales y superficiales, pero también en distintas zonas del planeta. En función de las concentraciones de TCS en aguas de distintas partes del planeta es que se estima que en las plantas de tratamiento, los tratamientos primarios eliminan entre un 7 y un 48 % del compuesto (Sabaliunas y col., 2003), mientras que en el tratamiento secundario, se elimina entre un 92 y un 99% del compuesto (Petrović y col., 2003; Paul, 2005). La tabla 2 presenta niveles de TCS en aguas tratadas y en aguas afluentes.

Tabla 2: Concentraciones de TCS ( $\mu\text{g/L}$ ) en aguas residuales tratadas y no tratadas.

Localización	Agua residual no tratada ( $\mu\text{g/L}$ )	Agua residual tratada ( $\mu\text{g/L}$ )	Referencia
Reino Unido	5,9-21,9	0,34-13,35	Saballunas y col., 2003
Noruega	0,043-2,8	0,16-0,48	Weigel y col., 2004
Estados Unidos	1,6-6,1	0,02-0,035	Halden y Paul., 2005
	3,8-16,6	3,4-8,0	Mc Avoy y col., 2002
	3-14	0,16-0,46	Shelver y col., 2007
México	0,66-2,04	nd	Gibson y col., 2007
Canadá	0,87-1,83	nd	Lee y col., 2005
Japón	0,3-0,8	0,1	Nakada y col., 2006
China	0,022-0,0213	nd	Wu y col., 2007
Australia	nd	0,023-0,434	Ying y Kookana, 2007

Fuente: Canosa, 2008. nd: no detectado.

En este sentido es importante conocer los procesos que determinan la estabilidad del TCS en aguas superficiales, debido a que algunos pueden contribuir a aumentar la estabilidad del compuesto o favorecer su metabolización, pudiendo aumentar la toxicidad de TCS a través de sus metabolitos. Entre las condiciones que afectan a triclosán se encuentran:



- El pH y la concentración de sólidos en suspensión: El TCS es un compuesto ionizable (ácido débil) y la variación en el pH modifica su distribución en el medio acuático, por otra parte, una alta cantidad de material particulado puede generar un aumento del TCS adsorbido en su superficie (Singer y col., 2002).
- Fotólisis: El TCS es susceptible de sufrir transformaciones fotolíticas en aguas superficiales, por acción de la luz solar (Ferrer y col., 2004).
- Biodegradación: El TCS puede ser biodegradado por los organismos presentes en el agua. Este proceso está influenciado por la temperatura y la profundidad del medio. Es el caso la bacteria *Achromobacter Xylooxidasa* y el alga *Scenedesmus Subspicatus* que degradan el TCS en la superficie de las partículas en suspensión (Orvos y col., 2004).
- Cloración: El TCS en presencia de cloro libre puede sufrir la halogenación de su anillo fenólico, generando el tetra y al penta closano, y a dos productos de ruptura de su molécula (Canosa, 2008).

Si bien el TCS está presente en matrices acuosas desde las cuales puede ser absorbido (Thompson y col., 2005; Boyd y col., 2004), siendo detectado en diferentes organismos acuáticos, no se ha relacionado la presencia de este compuesto en aguas residuales tratadas con la presencia del compuesto en humanos ni tampoco con sus efectos tóxicos (Dan y Hontela, 2011). Sin embargo, es posible que se genere acumulación de TCS en los suelos sometidos a regadío permanente con aguas residuales tratadas, siendo más probable el contacto de humanos, sobretodo de población infantil, con suelo contaminado con TCS.

Existen estudios para determinar TCS en diversas matrices, pero muy pocos trabajos realizados sobre vegetales o plantas, los cuales podrían brindar información de suma importancia sobre la posible cantidad de TCS bioacumulable y posiblemente biodisponible para el hombre en el caso de vegetales de consumo. Un estudio realizado por el equipo de Zarate y col, (2012), indicó la presencia de TCS y TCC en plantas de *Typha latifolia*, *Pontederia cordata* y *Sagittaria gramínea*, tanto en raíz como parte aérea, encontrando mayor bioacumulación en la raíz, este trabajo fue desarrollado para evaluar la capacidad de dichas plantas para absorber contaminantes y así disminuir su concentración en humedales artificiales en Estados Unidos.

### **1.3. Biodisponibilidad y bioaccesibilidad de contaminantes.**

La biodisponibilidad hace relación a la fracción de una sustancia que alcanza la circulación sistémica a partir del tracto gastrointestinal y que queda disponible para ejercer su acción (terapéutica o tóxica) en el organismo, sin embargo, ésta puede ser afectada por el alimento y su composición, así también las condiciones del tracto gastrointestinal y las condiciones fisiológicas del consumidor. En este sentido sólo una fracción pequeña de una sustancia potencialmente contaminante desde una matriz es biodisponible (ISO/DIS 17402, 2006).

Entre las desventajas que presentan las pruebas de biodisponibilidad *in vivo* es su alto costo por necesidad de trabajar con animales y asociado a esto, la aceptación social que conlleva. Una forma alternativa de abordar este tipo de estudios ha sido el desarrollo de pruebas de bioaccesibilidad *in vitro*, las cuales son de un costo inferior (Marquez y col., 2011). La fracción bioaccesible representa la máxima fracción de una sustancia que puede liberarse en el tracto gastrointestinal desde la matriz que la contiene. En el caso del ser humano, la liberación de esta fracción ocurre en el tracto gastrointestinal, en el proceso de la digestión, quedando potencialmente disponible para la absorción intestinal. Para un contaminante, esta fracción representa la cantidad máxima disponible para la absorción intestinal (Quilodrán, 2015).

La bioaccesibilidad ha sido ampliamente evaluada para metales, donde existen variados estudios (Poggio y col., 2009; Ljung y col., 2007; Saikat y col., 2007; Sialelli y col., 2011), los que poseen en común el proceso de simulación de fluidos gastrointestinales. Como fluido estomacal se ha usado ácido clorhídrico (pH 1,5), sumado a algunos aminoácidos, ácidos orgánicos, enzimas y sales, mientras que para los fluidos intestinales se ha utilizado la misma solución, pero ajustando el pH a 7 y la adición de sales biliares y enzimas excretadas al intestino delgado y al duodeno. Además de la composición del fluido, es relevante la temperatura, tiempo de digestión y composición de la fase gaseosa, las cuales deben ser controladas. En el caso de TCS, no existen estudios donde se haya evaluado la bioaccesibilidad a partir de matrices vegetales.

#### 1.4. Análisis de TCS.

Las metodologías ocupadas en los estudios actuales para determinar TCS en aguas residuales, vegetales, plantas y matrices de origen humano (leche materna, sangre) son diversas en cuanto al tratamiento de la muestra (extracción sólido-líquido, líquido-líquido, extracción en fase solida (SPE), dispersión de matriz en fase solida (MSPD) como también en los instrumentos para la identificación y cuantificación del compuesto. Principalmente se utiliza cromatografía de gases o de líquidos, en la mayoría de los casos acoplados a espectrómetros de masas, los cuales aportan selectividad y especificidad a los resultados. En relación a la extracción del compuesto desde la matriz, los tratamientos más usados en la actualidad se basan en SPE para matrices líquidas, dado la facilidad en su manejo y su tiempo de trabajo (minutos) a diferencia de las convencionales extracciones sólido-líquido como líquido-líquido, las cuales tienden a necesitar un tiempo más prolongado de trabajo (horas) (Ferrer y col., 2004) (Karnjanapiboonwong y col., 2011). Las características fisicoquímicas que posee el TCS lo convierten en un compuesto posible de analizar tanto por cromatografía líquida como gaseosa, pero en nuestro caso al ser un compuesto halogenado, permitió su análisis a través de cromatografía de gases con detector de microcaptura de electrones. La tabla 3 presenta algunos ejemplos de metodologías usadas para el análisis de TCS.

Tabla 3: Tratamientos y técnicas ocupadas para determinar de TCS en diversas matrices.

Técnica de análisis	Tipo de matriz	Tratamiento de muestra	Fuente
HPLC/UV	Sólida: Plantas	Extracción sólido-líquido SPE	Karnjanapiboonwong y col., 2011
GC/ECNI-MS	Líquida: Plasma y leche materna	Hidrólisis Extracción líquido-líquido	Allmyra y col., 2006
GC/MSD	Líquida: Agua de río	SPE) Derivatización	Sabaliunas y col., 2003
LC/TOF-MS	Líquida: Aguas residuales	SPE	Ferrer y col., 2004
GC/MS	Sólida: Peces y alimentos	Dispersión matriz en fase sólida (MSPE) Derivatización (MTBSTFA)	Canosa y col., 2008
GC/MS	Líquida: Aguas residuales	SPE	Thompson y col., 2005
GC/MS	Líquida: Leche materna	Extracción líquido-líquido (sonicación)	Adolfsson y col., 2002
LC/ESI-MS	Sólida: Plantas	Extracción sólido-líquido Derivatización	Zarate y col., 2012

### 1.4.1. Cromatografía

La cromatografía gaseosa con detector de captura electrónica (GC-ECD), es una técnica que permite cuantificar moléculas con grupos electronegativos (compuestos halógenos), gracias a que su detector de captura electrónica es selectivo y sensible para este tipo de moléculas. El uso de un detector de micro-captura electrónica ( $\mu$ ECD) permite una mayor sensibilidad, por efecto del menor tamaño de celda que posee, lo que optimiza la interacción de los compuestos con los electrones. Así también, es necesario previo al análisis cromatográfico llevar a cabo procesos o etapas de limpieza de la muestra que permitan la eliminación de interferentes, como la clorofila en el caso de los vegetales, cuya presencia generaría errores en la cuantificación de los analitos, afectando tanto la sensibilidad como la repetibilidad del método además de la probabilidad de generar dificultades técnicas a nivel de los equipos ocupados (interacción con la columna cromatográfica).

En la actualidad las técnicas de medición han avanzado no solo en el sistema de detección (más sensibles y específicos), sino también en simplificar los tratamientos previos requeridos para poder analizar una sustancia en una muestra en particular ocupando una técnica de medición específica (absorción atómica, absorción molecular, espectrofotometría, cromatografía, entre otras). En función de ésta última necesidad (tratamiento de muestra) se puede mencionar una nueva técnica de análisis en el área de la cromatografía, específicamente en detección de compuestos es el sistema de análisis directo de muestra (DSA/TOF) (figura 3), esta técnica permite la rápida detección de varias clases de compuesto, entre ellas las drogas ilícitas, drogas de abuso, hormonas de crecimiento y sus metabolitos en la orina además de permitir el análisis de muestras sólidas y líquidas. Éste sistema posee como ventaja que no ocupa tiempos prolongados de análisis, como si ocurre en las técnicas de cromatografía (tratamiento de muestra-inyección de muestra) y prácticamente no requiere de la preparación de las muestras. Esto resulta en la disminución de los tiempos de análisis y de no necesitar de reactivos o insumos que incrementan los costos de las investigaciones (Perkin Elmer, 2015).



Figura 3: Sistema integral DSA/TOF.

#### 1.4.2. SPE

En la actualidad la técnica de SPE aparece como una de las mejores opciones para el tratamiento de la muestra previo al análisis cromatográfico, dado principalmente por el menor tiempo de trabajo y facilidad en su uso. Ésta es una técnica desarrollada en los años 70 como alternativa a la extracción líquido-líquido convencional. Se basa en la adsorción de los analitos sobre una fase sólida y en su posterior elución con un disolvente adecuado; así se logra su concentración, su purificación e incluso su separación, si se realiza una elución fraccionada con distintos disolventes (Canosa, 2008; Bonifazi y col., 1997). Las etapas de la extracción en fase sólida son:

1. **Acondicionamiento de la fase estacionaria:** Consiste en pasar uno o varios solventes adecuados con el objetivo de solvatar los grupos funcionales y facilitar su posterior contacto con los componentes de la matriz. Entre los solventes más empleados están el metanol (que interacciona tanto con los grupos silanoles polares como con los grupos funcionales ligados apolares), el acetonitrilo, el isopropanol, el tetrahidrofurano y la acetona.
2. **Paso de la muestra:** Se hace pasar la muestra a través del adsorbente, generalmente aplicando presión positiva o negativa para acelerar el proceso.
3. **Lavado:** En algunos casos se pasa un disolvente que permite eliminar algunas interferencias sin llegar a eluir los analitos.
4. **Elución de los analitos:** En esta última etapa, los analitos son recuperados del adsorbente mediante una fase líquida que interacciona más fuertemente con ellos que las partículas de fase sólida.

## **1.5. Validación**

La validación es el proceso por el cual se demuestra por estudios de laboratorio que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada, justificado por aspectos éticos, económicos, de aseguramiento de calidad y regulatorios (ISP, 2010). Entre los principales parámetros que se establecen en una validación de métodos están:

### ***Selectividad***

La selectividad es la capacidad de un método de identificar y cuantificar un analito en presencia de interferentes, siendo estos, constituyentes de la matriz que contiene al analito de interés.

### ***Linealidad***

La linealidad es la capacidad de un método de análisis de generar un resultado linealmente proporcional a la cantidad del analito en una muestra, dentro de un determinado rango.

### ***Recuperación***

La recuperación permite ver el rendimiento de un método analítico en cuanto al proceso de extracción y la cantidad del analito existente en la muestra original.

### ***Repetibilidad***

Es la precisión de las respuestas obtenidas bajo el mismo método de análisis (mismo laboratorio, mismo operador utilizando el mismo equipamiento) dentro de intervalos cortos de tiempo.

### ***Reproducibilidad***

Es la precisión bajo distintas condiciones de trabajo (laboratorio, operadores, equipos, entre otros), utilizando el mismo método.

## 1.6. Planteamiento del problema.

En vista de la toxicidad descrita para TCS y su uso en diversos productos de higiene personal y los hallazgos descritos en la literatura sobre la presencia de este analito en aguas residuales, se plantea para este estudio evaluar la bioaccesibilidad de TCS determinando la fracción del compuesto potencialmente biodisponible y cómo se relaciona ésta con el sitio de absorción en el tracto gastrointestinal. Para ello se validará un método por GC- $\mu$ ECD para determinar la concentración pseudototal del analito en una matriz vegetal. La implementación de la metodología permitirá evaluar la incorporación de TCS a una matriz vegetal de hortalizas y posteriormente su bioaccesibilidad in vitro mediante el análisis de soluciones extractantes sustitutas de fluidos gastrointestinales.

Nos enfocaremos en el posible contacto indirecto entre el ser humano adulto y TCS, el cual se puede dar por el consumo de vegetales contaminados con este desinfectante, ya sea por aguas de regadío o suelos contaminados, escenario que puede darse en zonas agrícolas donde se cultivan hortalizas, cercanas a plantas de tratamiento de aguas servidas domésticas, las cuales ocupan como agua de riego los efluentes de estas plantas.

Como hortalizas más representativas de las zonas agrícolas cercanas a la ciudad de Santiago se ha elegido para este estudio la lechuga (*Lactuca Sativa* L.) y el rábano (*Raphanus sativus* L.). En el caso de la lechuga su parte comestible es la hoja, por lo que el estudio dependerá de la cantidad de contaminante translocado a la parte aérea. En el caso de rábano su parte comestible es la raíz, la cual está en contacto más cercano con el medio que contiene el contaminante (agua o suelo).

## 2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis

Para este estudio se plantean las siguientes hipótesis:

- El TCS puede ser analizado eficazmente en matrices vegetales de hoja y raíz mediante un método que involucra extracción sólido-líquido, SPE y GC- $\mu$ ECD.
- El TCS presente en la solución nutritiva de un cultivo hidropónico puede ser absorbido por hortalizas de consumo frecuente (lechuga, rábano) y moverse a las partes comestibles de la planta quedando en una forma bioaccesible para el ser humano.

### Objetivo general.

Desarrollar una metodología para el análisis de TCS pseudototal y bioaccesible, basada en la extracción del analito desde la matriz vegetal ocupando una solución extractante, SPE y la posterior cuantificación mediante GC- $\mu$ ECD.

### Objetivos específicos.

1. Desarrollar un programa cromatográfico para la determinación de TCS, MTCS con la técnica de GC- $\mu$ ECD.
2. Desarrollar un proceso de extracción de los analitos desde las matrices de agua y tejido vegetal incluyendo la técnica de extracción sólido-líquido y SPE.
3. Validar la metodología implementada para el análisis de TCS en la matriz de tejido vegetal.
4. Determinar el TCS pseudototal en tejido vegetal de lechuga y rábano.
5. Determinar el TCS bioaccesible en la hoja de lechuga y en la raíz reservante de rábano, ambas especies cultivadas hidropónicamente.



### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### Materiales

- Cámara de vacío para extracción en fase sólida, Manifold.
- Bidones de plástico de distintos volúmenes.
- Material de vidrio.
- Cartridges C-18, Sep-Pak, Waters.
- Membrana de nitrato de celulosa con un tamaño de poro de 0,45  $\mu\text{m}$ , Sartorius Stedim.

#### Reactivos

- n-hexano, solvente para GC con detector ECD y FID, Merck.
- Metanol, Emsure, P.A., Merck.
- Acetona, Emsure, P.A., Merck.
- Acetonitrilo, Emsure, P.A., Merck.
- Estándar de PCB, P.A., Dr. Ehrenstorfer. 28 (99,5 %), 101 (99 %).
- Agua milliQ.
- Agua destilada.
- Carbonato de sodio anhidro, extra pure, Scharlau Chemie.
- Irgasan DP 300, C-BASF.
- Ácido metafosfórico, P.A., Merck.
- Ácido láctico, Merck.
- Extracto biliar porcino, Sigma.
- DL-Ácido málico, Sigma.
- Citrato de sodio dihidratado, P.A, Sigma.
- Pepsina de mucosa gástrica porcina, Sigma.
- Pancreatina de páncreas porcino, según USP, Sigma.
- N-ter-butil-dimetilsilil-N-metiltri-fluoroacetamida, P.S, Merck.
- TCS metil eter, Dr Ehrenstorfer GmbH.
- 3,4,4-triclorocarbanilida, P.A, Aldrich.

- Bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida, P. GC, Merck.
- Nitrato de calcio tetrahidratado, P.A., Merck.
- Nitrato de amonio, P.A., Merck.
- Nitrato de magnesio hexahidratado, P.A., Merck.
- Sulfato de potasio, P.A., Merck.
- Nitrato de potasio, P.A., Merck.
- Cloruro de sodio, P.A., Merck.
- FeEDTA, P.A., Merck.
- Fosfato de potasio, P.A., Merck.
- Ácido Bórico, P.A., Merck.
- Sulfato de manganeso hidratado, P.A., Merck.
- Sulfato de Zinc heptahidratado, P.A., Merck.
- Sulfato de cobre pentahidratado, P.A., Fluka.
- Manganato de sodio dihidratado, P.A., Merck.
- Multiestándar ICP masa, PA, Merck.

## Equipos

- Equipo medidor de pH, PMX 3000, WTW.
- Estufa 300°C, WTC, Binder.
- Estufa al vacío, VTR 5036, Heraeus.
- Centrífuga, Z 383 K, HermLe.
- Agitador, Gel Rocker 50, Bhanu.
- Balanza granataria, precisa 160M, Swiss Quality.
- Balanza granataria, precisa 6000M, Swiss Quality.
- Balanza analítica, precisa 125A, Swiss Quality.
- Placa calefactora, Sahara 310, Rocker.
- Espectrofotómetro de Absorción Atómica, 3110 con llama, Perkin Elmer.
- Microondas Milestone MLS 1200 Mega.
- Cromatógrafo de Gases, 7890A, Agilent, con detector -  $\mu$ ECD y FID.
- Molino marca IKA A11 basic.
- Equipo AxION-DSA-TOF-MS, Perkin Elmer.

## **4. METODOLOGÍA.**

### **4.1. Cromatografía de gases.**

Se desarrolló un programa cromatográfico para identificar y cuantificar los analitos TCS, MTCS y TCC. Se utilizó un equipo GC- $\mu$ ECD y una columna DB-XLB, de muy baja polaridad de 30 metros de largo, 0,32  $\mu$ m de diámetro interno y con 0,25  $\mu$ m de grosor de fase estacionaria. Para desarrollar el programa se tomó como base un programa desarrollado y ocupado previamente en el mismo equipo para el análisis de PCBs (Varela, 2014).

Las soluciones de los analitos fueron preparadas mediante pesada, la cual consiste en masar los volúmenes de solución de TCS como también de solvente para realizar las diluciones respectivas, de esta forma se minimizan las diferencias entre los valores nominales y efectivos de las concentraciones ( $\mu$ g/L) de los compuestos a estudiar (Varela, 2014).

Para confirmar la presencia de TCS en las muestras vegetales se utilizó la técnica DSA-TOF-MS. Las condiciones de trabajo fueron: corriente de corona de 30  $\mu$ A, temperatura del calefactor de 300°C, flujo gas auxiliar ( $N_2$ ) de 4L/min, presión gas nebulizador ( $N_2$ ) 552 kPa, flujo gas de secado ( $N_2$ ) 3 L/min, y la temperatura del gas de secado ( $N_2$ ) de 25°C (Garrido, 2016).

Para el análisis mediante esta técnica, se utilizaron soluciones estándar de TCS de 100, 500 y 1000 ppm y muestras vegetales con y sin TCS. Para las muestras vegetales, se realizaron extracciones sólido-líquido, utilizando metanol como solvente extractante. A los extractos obtenidos se les adicionó cafeína como estándar interno a una concentración de 1 ppm.

### **4.2. Obtención de muestra vegetal**

Para la etapa de validación de la metodología fue necesario contar con material vegetal que contuviera TCS, para ello se trabajó con ejemplares comerciales de lechuga y rábano, los cuales fueron expuestos a TCS a través de soluciones acuosas saturadas del compuesto (20 mg/L).

El TCS fue incorporado a la planta de la siguiente forma:

- Absorción foliar: La hoja de la planta fresca (lechuga) obtenida del comercio se puso en contacto con solución saturada en TCS por 24 hrs.
- Contacto directo con raíz reservante de rábano: ejemplares de rábano se pusieron en contacto con solución saturada de TCS por 24 hrs.

Con el fin de evaluar las mejores condiciones para el tratamiento con TCS de las plantas cultivadas hidropónicamente (lechuga y rábano), se realizaron pruebas para determinar la concentración de TCS en las posibles soluciones utilizadas como medio de contacto entre contaminante y vegetal (SN, H<sub>2</sub>O y CaCl<sub>2</sub> 0,01 mol/L), siendo evaluadas a un mismo nivel de concentración (10 mg/L). Adicionalmente en el caso de solución nutritiva, se usaron dos concentraciones de TCS (1 y 5 mg/L).

Otro set de pruebas fue realizado para determinar la concentración efectiva de TCS en solución acuosa, para lo cual se adicionaron diferentes porciones de acetona a matraces aforados, aforando con agua MilliQ, esto fue realizado para favorecer la solubilidad de TCS en la solución acuosa. Las distintas proporciones de acetona/agua fueron de 10:90, 50:50 y 75:25. Adicionalmente, en la etapa de SPE se recolectaron los volúmenes de muestra previo a la elución, éstos junto a los eluidos se evaporaron con corriente de N<sub>2</sub>.

En forma previa al cultivo hidropónico, se utilizaron ejemplares de lechuga variedad Batavia de 25 días aproximados de desarrollo, obtenidos de un invernadero dedicado al cultivo comercial de lechuga hidropónica. Los ejemplares fueron colocados en solución nutritiva durante 24 hrs para atenuar el estrés producido por el traslado desde el invernadero hacia el laboratorio. Posteriormente se realizaron dos set de pruebas: uno para establecer la concentración de TCS más adecuada para el cultivo hidropónico (A), y el otro para establecer el tiempo de cultivo en que se pueda observar presencia de TCS en la raíz o parte aérea (B):

- A. Se trataron tres ejemplares adultos de lechuga en duplicado por cada nivel de concentración de TCS en solución nutritiva (5; 10 y 20 mg/L), durante un tiempo de exposición de 24 hrs.

- B. Se trataron tres ejemplares adultos de lechuga por cada tiempo de exposición (2,3 y 4 días), todos con el mismo nivel de concentración (20 mg/L).

Con las condiciones de tratamiento ya establecidas, se procedió con el cultivo hidropónico de lechuga y rábano según el siguiente procedimiento:

- Las plantas se obtuvieron a partir de semillas, las cuales se cultivaron en arena de río en una incubadora a una temperatura controlada de 25°C y ausencia de luz, siendo éstas regadas periódicamente. Después de 10 días de crecimiento de las plántulas, se eligieron 6 de tamaño y aspecto similar y se trasladaron a un recipiente plástico de 1 L de capacidad que contiene solución nutritiva (Riveros, 2007). Los contenedores con las plántulas se mantuvieron durante todo el experimento en una cámara climática bajo condiciones controladas de luz y temperatura: fotoperiodo de 16 horas con radiación de 480  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$  y temperatura en el rango de 20 a 30°C a humedad ambiente. Luego de 21 días de crecimiento en solución nutritiva se aplicó TCS. Transcurrido el tiempo de exposición al analito, se sacaron las plantas de los recipientes, se lavó la raíz con agua MilliQ, se secaron con papel absorbente, la planta fue separada en parte aérea y raíz, ambas se secaron en una estufa a 50°C por 48 horas determinándose posteriormente su peso seco. El material vegetal fue molido en un molino marca IKA A11 basic y almacenado en frascos de polietileno, para su análisis posterior.

Los tiempos de exposición para lechuga fueron de 1 y 3 días y para los ejemplares de rábano 1 y 2 días, la concentración de TCS ocupada fue de 20 mg/L en SN.

#### **4.3. Determinación de concentración pseudototal de TCS en matriz vegetal.**

Debido a que no es posible conocer el contenido total de TCS en forma exacta, ni extraer dicha cantidad desde la matriz vegetal, en este estudio nos referiremos al TCS pseudototal como una estimación del TCS total presente en el vegetal.

Se evaluó el método desarrollado por Canosa y col., (2008), el cual consiste en realizar la extracción del analito desde la matriz utilizando la técnica de MSPD. Se procedió

a realizar la prueba bajo las mismas condiciones descritas disminuyendo las cantidades a la mitad por el tamaño del cartridge disponible (6 cc), los pasos de ésta prueba se indican a continuación:

1. Dispersar 0,25 g de muestra en 0,75 g de sílica neutra en mortero.
2. Transferir la mezcla al cartridge con 1,5 g de sílica impregnada con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10% p/p
3. Eluir con 10 mL de diclorometano
4. Evaporar el solvente con corriente de N<sub>2</sub>.
5. Reconstituir con 5 ml de n-hexano/PCB 28.

Como método alternativo al proceso MSPD se realizó una extracción sólido-líquido ocupando una solución extractante compuesta por agua/acetonitrilo en una relación 1:1, esta mezcla contenía ácido metafosfórico (MPA) al 2% (p/p). Adicionalmente, se analizaron diversas proporciones de la solución extractante (agua/acetonitrilo), como también distintos porcentajes de MPA, con el fin de obtener la mayor cantidad de analito, como también la mayor precipitación de interferentes y obtención de una solución más limpia para su análisis (Briggs, 1940; Mendoza y col., 2009)

El proceso de extracción se realizó de la siguiente forma:

6. Pesar 500 mg de material vegetal en tubo de centrifuga de 50 mL.
7. Adicionar 20 mL de una mezcla agua/acetonitrilo 1:1 con una concentración de MPA del 2 % (p/p).
8. Agitar la mezcla durante 3 horas en agitador horizontal.
9. Centrifugar 10.000 rpm por 10 min a T° ambiente.
10. Separar la solución sobrenadante para análisis.

La solución fue sometida al proceso de SPE con el fin de eliminar componentes de la matriz vegetal, como también efectuar una concentración de la muestra.

A partir de los valores de TCS pseudototal en raíz como parte aérea o raíz reservante se calcularán los factores de translocación (FT) para cada caso según la siguiente formula (Rezvani y col., 2011):

$$FT = \frac{Cs}{Cr}$$

Donde:

FT: Factor de translocación

Cs: Concentración compuesto parte aérea o raíz reservante (mg/kg).

Cr: Concentración compuesto en raíz (mg/kg).

La SPE se aplicó a los extractos resultantes de las extracciones sólido-líquido para pruebas de determinación de TCS pseudototal y a las soluciones provenientes de las pruebas de bioaccesibilidad gástrica e intestinal de TCS, según el siguiente protocolo:

1. Acondicionar la columna con 7 mL de agua a pH 2 (con HCl), esperar 5 min.
2. Agregar 6 mL de metanol y esperar por 5 min.
3. Cargar cartridge C-18 con 10 mL de muestra.
4. Realizar lavado de la columna con 2 porciones de 3 mL de agua Mili Q.
5. Realizar elución con acetona, con 2 porciones de 2,5 mL recolectando la solución en vial de 8 mL.

Luego, las muestras fueron sometidas a una filtración (filtro de membrana de nitrato de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$ ), evaporadas con corriente de  $\text{N}_2$  y reconstituidas con 5 ml de n-hexano/PCB 28. Con la solución obtenida se procedió a la medición en el equipo cromatográfico.

#### **4.4. Bioaccesibilidad mediante solución sustituta de fluido gastrointestinal.**

Se seleccionaron dos de las pruebas más usadas para evaluar la bioaccesibilidad de metales en diferentes matrices (Saikat y col., 2007; Sialelli y col., 2011), una fue el método basado en la fisiología (PBET) descrito por (Intawongse y col., 2008) y la otra fue el método simplificado (SBET) descrito por (Xin y col., 2011). Estas pruebas fueron aplicadas tanto a plantas de lechuga cultivada como a hojas de lechuga tratadas con solución saturada de TCS.

#### **4.4.1. Bioaccesibilidad mediante método SBET**

Extractantes:

- Fase gástrica: Simula la extracción de compuestos por la acción de los jugos gástricos en el estómago. Se usa una solución de glicina 0,4 mol/L, ajustada a pH  $1,5 \pm 0,5$  en agitación durante 1 hora.

#### **4.4.2. Bioaccesibilidad mediante método PBET**

Extractantes:

- Fase gástrica: Corresponde a la primera etapa del proceso de extracción. Se requiere una solución ajustada a pH 1,5 (HCl), compuesta por pepsina, ácido DL-málico, citrato de sodio dihidratado y ácido láctico, en las concentraciones 1250 mg/L, 500 mg/L, 570 mg/L y 420  $\mu$ L/L, respectivamente.
- Fase intestinal 1: Se obtiene por acción de la solución de la fase gástrica pero ajustado el pH a  $7,0 \pm 0,5$  con bicarbonato (12% m/v) y agregando sales biliares (175 mg por cada 100 mL) y pancreatina (50 mg cada 100 mL). El tiempo de agitación es de dos horas.
- Fase intestinal 2: Se obtiene aplicando la misma solución de la Fase intestinal 1 por 1,5 horas y manteniendo el pH en 7.

#### **4.5. Contenido de metal total en muestras de vegetales.**

Se pesaron 300 mg ( $\pm 0,1$  mg) de muestra seca y se trasladaron a vasos de teflón para microondas. Luego se agregó 4 mL de HNO<sub>3</sub> al 69% y 2 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30%. Para acelerar la mineralización, las muestras fueron digeridas en horno microondas Milestone MLS 1200 Mega, utilizando un programa con las siguientes características: 5 min a 250 W, 5 min a 400 W y 10 min a 500 W. Posteriormente los vasos fueron enfriados por medio de baño de agua. Luego, se vertieron las soluciones en matraces aforados de 20 mL con agua MilliQ. La cuantificación de metales totales fue realizada mediante espectrometría de absorción atómica (EAA) con llama.



#### **4.6. Validación.**

Para la validación de la metodología de extracción sólido-líquido, SPE y medición por GC-  $\mu$ ECD se llevaron a cabo diferentes pruebas tomando como referencia la guía de validación del Instituto de Salud Pública (ISP, 2010). Las pruebas seleccionadas fueron: linealidad (límites de detección, cuantificación y rango lineal), repetibilidad, recuperación y reproducibilidad intralaboratorio.

##### **Selectividad**

Se analizaron muestras blanco, TCS en matriz vegetal y de solución estándar utilizando dos programas cromatográficos, comparando las señales obtenidas para cada caso.

##### **Linealidad**

Se construyó una curva de calibración para TCS usando como estándar interno el PCB 28, donde se graficaron los puntos concentración versus razones de área (área TCS/PCB28), de la cual se obtuvo la ecuación de la recta

$$Y = S C + Y_b$$

A partir de la curva de calibración, donde C es la concentración de TCS y S e  $Y_b$  la pendiente y ordenada en el origen de la recta respectivamente, se obtuvieron los valores estadísticos y coeficiente de correlación.

##### **Recuperación (R)**

Se realizaron mediciones de 9 muestras fortificadas con TCS, el proceso se realizó de la siguiente forma:

Se adicionó 1 mL de un estándar de TCS en n-hexano de concentración conocida 520  $\mu$ g/L a 250 mg de material vegetal sin TCS en un tubo plástico de 50 mL tipo Falcon. Posteriormente se evaporó el volumen del solvente adicionado a temperatura ambiente, obteniendo la muestra seca, se procedió a realizar extracción sólido-líquido, SPE y se

cuantificó el TCS por GC- $\mu$ ECD. Los porcentajes de recuperación se determinaron utilizando la siguiente formula:

$$R = \frac{C_e - C_o}{C_a}$$

Donde:

R: Recuperación.

Ce: Concentración del analito en la muestra enriquecida (mg/kg).

Ca: Concentración del analito adicionado a la muestra (mg/kg).

Co: Concentración de la muestra blanco (sin analito) (mg/kg).

### **Repetibilidad**

Se determinó registrando 5 mediciones a distintos intervalos de tiempo bajo las mismas condiciones (mismo día, operador, equipo, técnicas analíticas), según la siguiente forma:

Se pesó 250 mg de material vegetal con TCS y se adicionó 10 mL de una mezcla de acetonitrilo/agua 1:1 con ácido metafosfórico al 2%. Una vez obtenido el extracto se realizó el tratamiento de la muestra mediante SPE y se cuantificó el TCS por GC- $\mu$ ECD). Se calcularon la desviación estándar (DS) y el porcentaje de coeficiente de variación (Cvr%).

### **Reproducibilidad**

Se determinó realizando 3 mediciones de una muestra vegetal con analito (TCS), la cual fue analizada una vez por cada semana, según la siguiente forma:

Se pesaron 250 mg de muestra y se adicionó 10 mL de una mezcla de acetonitrilo/agua 1:1 con ácido metafosfórico al 2%. Una vez obtenido el extracto se realizó el tratamiento de la muestra mediante SPE y se cuantificó el TCS por GC- $\mu$ ECD). Se calculó Desviación Estándar (DS) y el porcentaje de coeficiente de variación (Cvr%).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Análisis cromatográfico

Se elaboró un set de muestras de TCS en el rango de concentración de 2-20 µg/L. Para las pruebas se inyectó manualmente 1 µL de cada solución. Se optimizó un programa cromatográfico con un tiempo de registro a 12,33 min., el cual permite analizar tanto TCS, MTCS y TCC. Las características del programa cromatográfico se indican en la tabla 4:

Tabla 4: Condiciones cromatográficas para el análisis de agentes desinfectantes.

	Isoterma 1	Rampa 1	Isoterma 2	Rampa 2	Isoterma 3	Rampa 3	Isoterma 4
Temperatura (°C)	50	50-200	200	200-230	230	230-280	280
Velocidad (°C/min)	0	75	0	30	0	15	0
Tiempo (min)	2	2	1	1	1	3,33	2
Tiempo total (min)	2	4	5	6	7	10,3	12,3

Temperatura inyector: 280 °C, temperatura detector: 300°C, Flujo gas carrier: 2,3 mL/min N<sub>2</sub>. Con el programa optimizado, los tiempos de retención para TCS, MTCS y TCC fueron 7,80, 7,90 y 4,73 min, respectivamente (figura 4).

Como las muestras se inyectaron en forma manual, fue necesario la inclusión de un SI para disminuir el error asociado a la manipulación manual, para esto se probaron dos compuestos, PCB 28 y PCB 101, optando por el PCB 28, que posee un tiempo de retención de 6,62 min (figura 5), debido a que su señal aparece en una zona del cromatograma donde no interfiere con las señales de TCS, MTCS o TCC. La concentración de SI usada para todas las muestras fue de 27,80 µg/L.

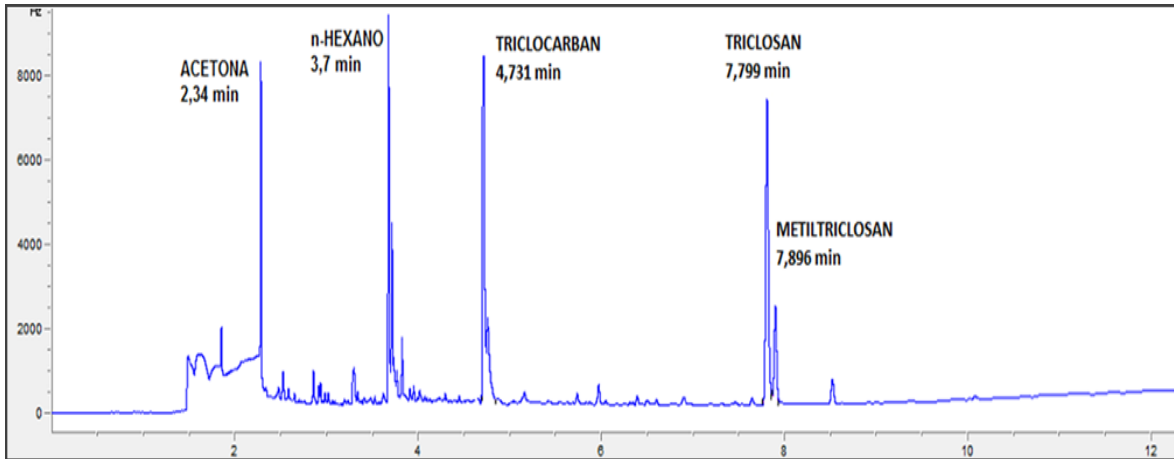


Figura 4: Cromatograma de estándares de TCS, MTCS, TCC, (52, 24 y 188 µg/L), n-hexano y acetona obtenido con programa optimizado por GC-µCD.

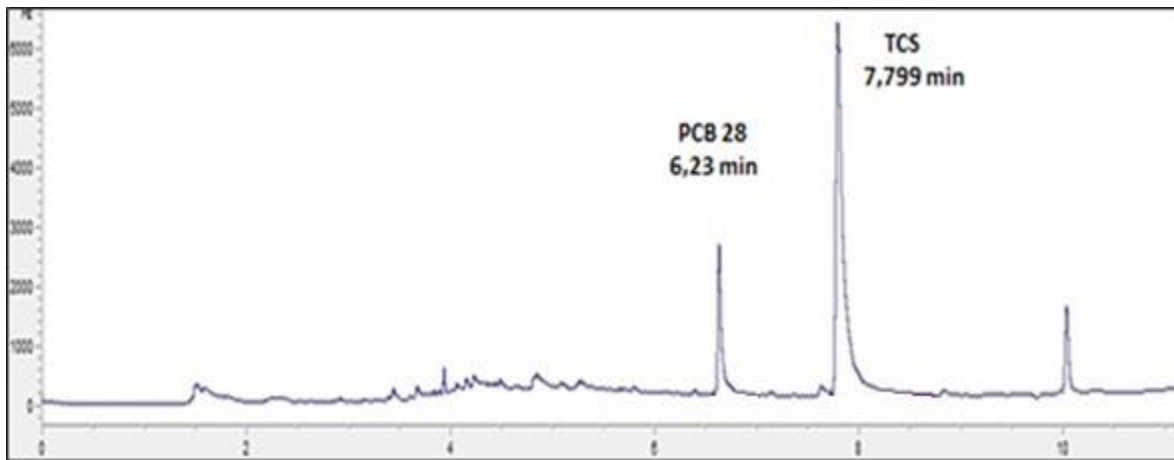


Figura 5: Cromatograma de estándares de TCS y PCB 28.

Mediante el análisis por DSA-TOF-MS, a partir de una concentración estándar de TCS de 100 ppm se observó la presencia del compuesto en la muestra con un valor masa/carga de 291,234 como se observa en la figura 6:

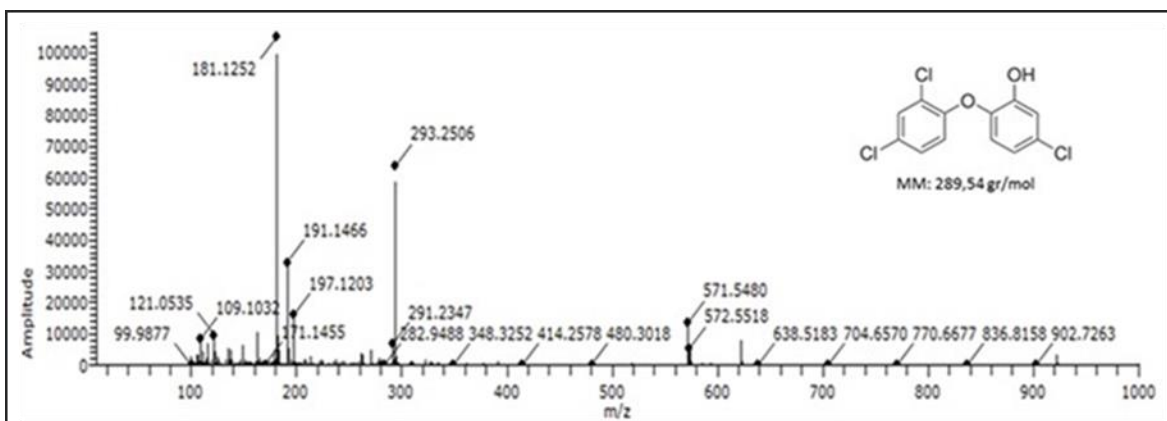


Figura 6: Espectro de estándar de TCS ( $m/z=291,234$ ), 100 ppm/NaOH, DSA-TOF-MS.

Una vez obtenidos los valores de los iones generados, se analizaron muestras vegetales con y sin TCS (blanco), los resultados obtenidos en el caso de la muestra con TCS, indican la presencia del ión molecular generado a partir de la muestra con un valor masa/carga ( $m/z$ ) de 291,234. En la figura 7 se observa la presencia de TCS en una muestra de lechuga que fue puesta en contacto a través de sus hojas con una solución saturada de TCS y en la figura 8 una muestra blanco (lechuga sin TCS), confirmando los resultados obtenidos mediante GC- $\mu$ ECD (presencia y ausencia de TCS en las muestras respectivamente).

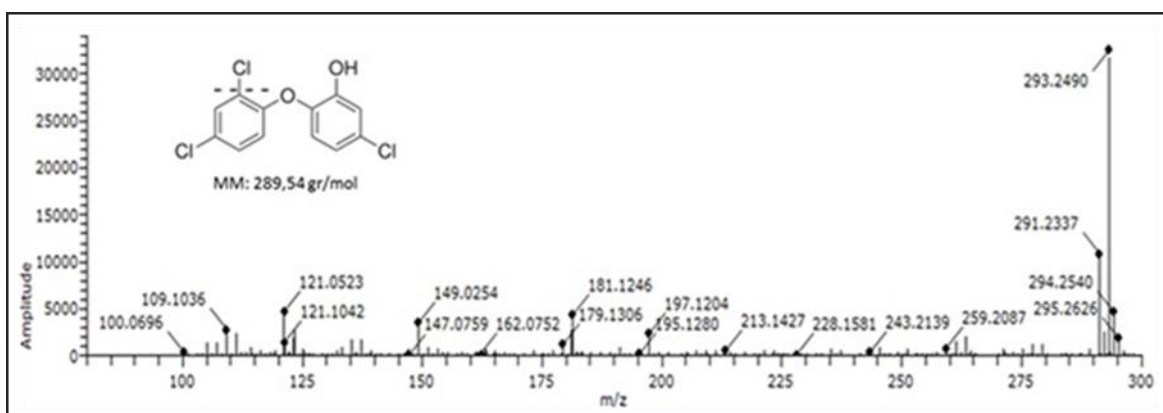


Figura 7: Espectro de extracto de Lechuga con TCS + cafeína/NaOH, DSA-TOF-MS.

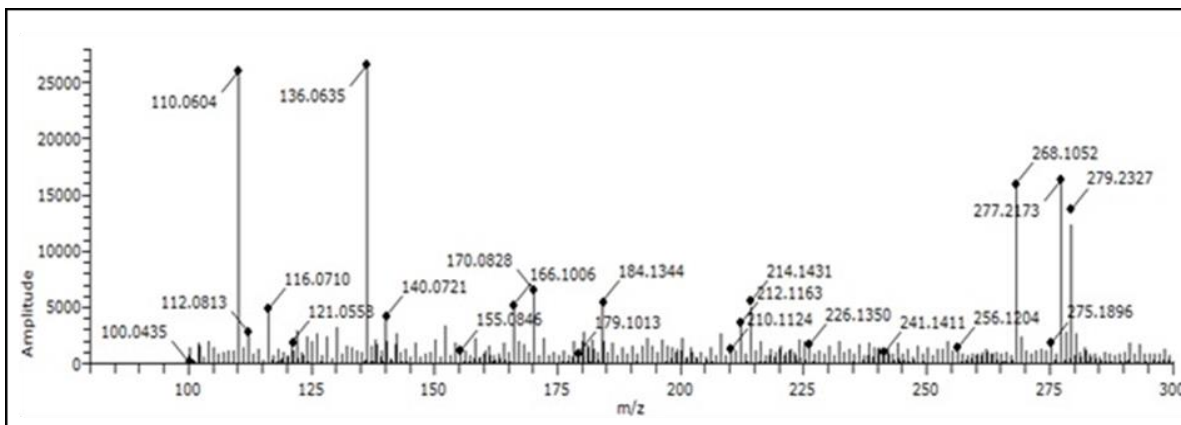


Figura 8: Espectro de extracto de Lechuga sin TCS/NaOH, DSA-TOF-MS.

## 5.2. Extracción de TCS desde la matriz vegetal.

Con el fin de determinar el TCS pseudototal se buscó extraer la mayor cantidad posible del compuesto incorporado a la matriz vegetal. Debido a la baja solubilidad de TCS en agua fue necesario el uso de solventes orgánicos para su extracción; sin embargo, la hoja de lechuga es una matriz compleja que posee una estructura celulósica con alto contenido de pigmentos, entre ellos la clorofila, la cual es soluble en la mayoría de los solventes orgánicos, siendo de esta forma un interferente en el método de análisis. En el caso del rábano, cuya parte comestible es su raíz reservante, resulta una matriz menos compleja de tratar debido a la ausencia de clorofila.

Los resultados obtenidos de la aplicación del método de extracción MSPD (Canosa y col., 2008), indican la presencia de TCS en el material vegetal con una concentración de  $(86 \pm 3 \text{ mg/kg})$ , también se observó que el procedimiento no logró retener componentes de la matriz que podrían causar inconvenientes en la etapa cromatográfica, específicamente clorofila, ya que la solución obtenida posterior a la elución poseía una coloración verdosa intensa, para intentar eliminar ésta coloración se procedió a realizar una filtración con filtro de nitrato de celulosa con tamaño de poro de  $0,45 \mu\text{m}$  y una dilución posterior sin obtener mejores resultados (línea base muy alta), por lo que se procedió a elaborar otro proceso de extracción, el cual permitiera eliminar más eficientemente la clorofila y obtener muestras con menor coloración y cromatogramas con una línea base más baja.

Considerando los aspectos descritos en los párrafos anteriores, la técnica usada para extraer el TCS desde la matriz vegetal en este estudio fue la extracción sólido-líquido. Como solvente extractante se escogió acetonitrilo, en base al estudio de Delgado y col, (2012), donde se señala que el acetonitrilo es uno de los solvente más afines por TCS a temperatura ambiente, además de ser miscible en agua y presentar una menor volatilidad que acetona, lo cual minimiza la pérdida de solvente por evaporación durante el proceso. Teniendo en cuenta que el ácido metafosfórico (MPA) es un compuesto usado frecuentemente como agente precipitante de proteínas (Mendoza y col., 2009) se probó incorporar este compuesto al extractante con el fin de disminuir la interferencia de la clorofila. Debido a la mayor solubilidad del MPA en agua, se probaron distintas proporciones de acetonitrilo: agua. Las proporciones de acetonitrilo/agua fueron: 1:1, 2:1 y 4:1, obteniendo concentraciones de TCS de 18,06, 17,42 y 11,48 mg/Kg de vegetal respectivamente. Para el caso del MPA se evidenció un aumento de la cantidad pesada de TCS conforme al aumento del agente precipitante en la solución acuosa, al usar MPA al 0,5, 1 y 2 % p/p, las concentraciones de TCS fueron 3,65; 3,50; 5,49 mg/Kg respectivamente. Además se observó una notoria disminución de la coloración del sobrenadante, sin embargo, ésta se mantuvo similar en los tres niveles del ácido, lo cual podría indicar un límite en la capacidad precipitante del agente. En base a los resultados obtenidos la solución extractante elegida fue una mezcla de acetonitrilo y agua en una proporción 1:1 con MPA en concentración de 2% p/p.

### **5.3. SPE**

Una de las resinas descritas frecuentemente en el proceso de SPE aplicado al estudio de contaminantes ambientales es la resina C-18, compuesta por un grupo apolar (octadecilo) unido a sílica, que le permite retener compuestos de tipo apolar (Varela, 2014; Ferrer y col 2004; Karnjanapiboonwong y col., 2011). El uso de cartridges C-18 se asocia al uso de un manifold de vacío, el cual permite el trabajo simultaneo hasta con 12 columnas de SPE. El sistema usado en esta tesis se aprecia en la figura 9. Uno de los factores que puede influenciar el rendimiento de la extracción es el manejo manual que se realiza del equipo, principalmente del vacío que se requiere para regular la velocidad de elución como también el tiempo de secado.



Figura 9: Equipo manifold para SPE.

Durante las pruebas preliminares donde se usó resina C-18, se detectó una baja recuperación de los analitos en el proceso de SPE, por tal motivo se volvieron a eluir las columnas ya utilizadas, determinándose que el TCS aún se encontraba retenido en la resina (tabla 5). Por lo cual se modificó el protocolo de SPE.

Tabla 5: Análisis de TCS en cartridges C-18 utilizados previamente en determinación de TCS pseudototal y bioaccesible.

Muestra	Área	Tiempo (min)
N-1	5280	7,802
N-2	7460	7,817
N-3	2400	7,803
N-4	3729	7,790
N-5	2940	7,803

Se evaluó mejorar la etapa de elución en la SPE, para esto se realizaron pruebas para determinar el solvente, puro o en combinación, para elución óptima del analito (metanol/acetonitrilo 1:1 v/s acetona), esto basado en el trabajo de Delgado y col, (2012), en el cual se indican los solventes más afines a TCS a temperatura ambiente (acetona > acetato de etilo > acetonitrilo > metanol > hidrocarburos), además de cambiar la cantidad



de eluciones de 2 a 3 porciones (2,5mL-2,5mL-2,5mL). Las áreas de TCS eluído indican que el mejor eluyente es acetona por sobre la mezcla evaluada (área de 2772 y 2464 respectivamente). Adicionalmente, con la primera porción de acetona eluye una gran cantidad de analito (>96 %).

Con los resultados obtenidos, se concluyó que el solvente acetona es el mejor eluyente de TCS en SPE y que solo son necesarias dos porciones de éste para eluir el compuesto desde la columna. De acuerdo a esto, se formuló el siguiente protocolo de SPE, que fue usado para determinar TCS bioaccesible y pseudototal a partir de una muestra vegetal:

1. Acondicionar la columna con 7 mL de agua a pH 1,5 (con HCl), esperar 5 min.
2. Agregar 6 mL de metanol y esperar por 5 min.
3. Cargar la columna con 10 mL de muestra.
4. Realizar lavado de la columna con 2 porciones de 3 mL de agua Mili Q.
5. Realizar elución con acetona, con 2 porciones de 2,5 mL recolectando la solución en vial de 8 mL.
6. Filtración por filtro de nitrato de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.
7. Evaporación con corriente de  $\text{N}_2$
8. Reconstitución con 5 ml n-hexano/PCB28

La figura 10 ilustra el protocolo (extracción sólido-líquido, SPE y medición en GC- $\mu\text{ECD}$ ) para determinar TCS pseudototal en muestras vegetales.

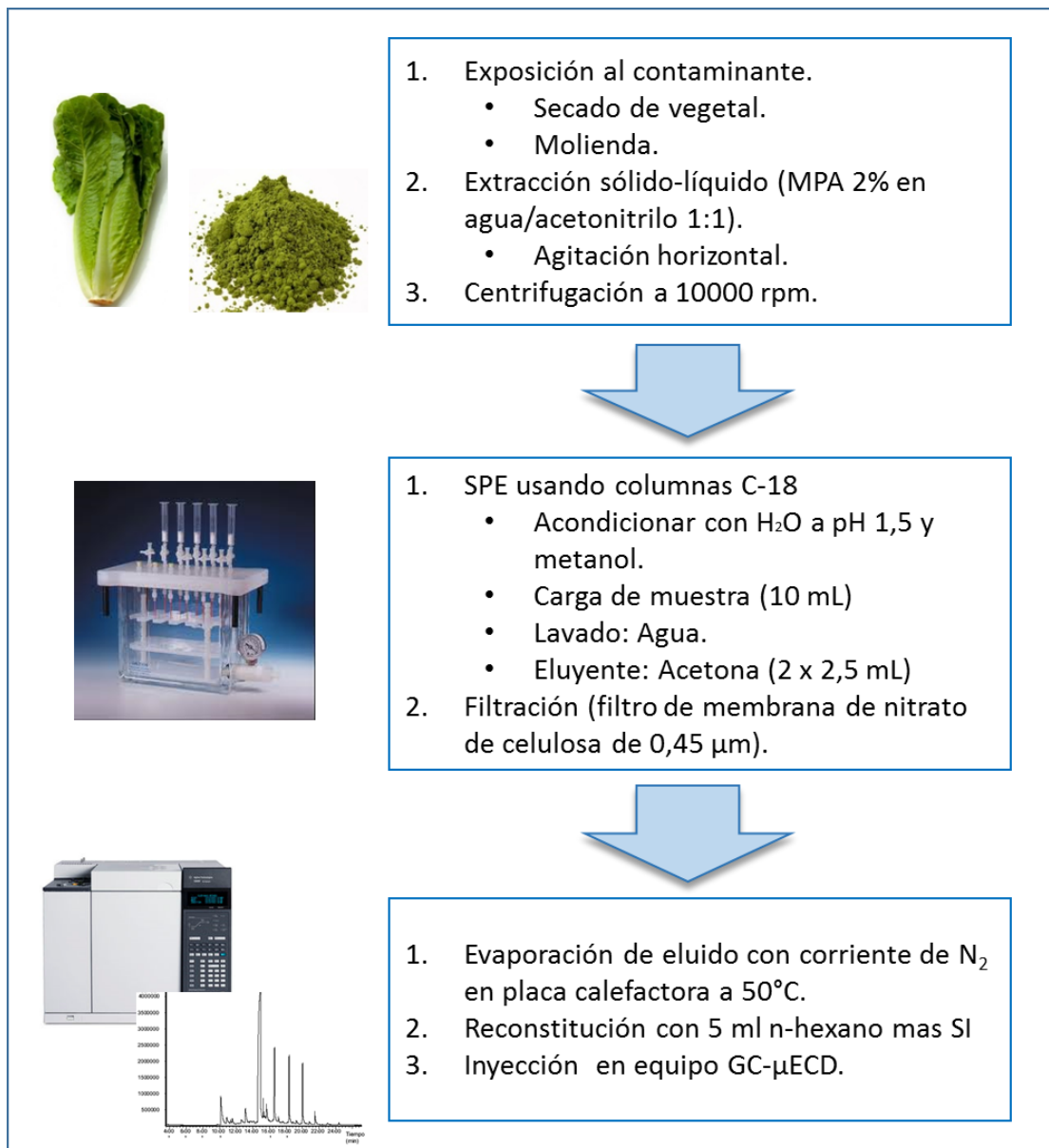


Figura 10: Protocolo para determinar TCS pseudototal en muestras vegetales.

#### 5.4. Validación.

Para la validación del método se determinaron los principales parámetros requeridos para un método cuantitativo de análisis según la guía del ISP (2010), entre estos, selectividad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, repetibilidad, recuperación y reproducibilidad intralaboratorio.

### 5.4.1. Selectividad

Para establecer la selectividad del método se comparó el aspecto del pico cromatográfico del analito de interés, registrado mediante dos programas que diferían en la rampa de temperatura aplicada en la zona de elución. Para ambos programas se inyectaron muestras estándar de TCS a distintos niveles de concentración y muestras vegetales con y sin TCS. El primer programa (figura 11, superior), se registró con rampa de 10°C/min donde TCS eluye a un tiempo de 9,022 min, en tanto que el segundo programa (figura 11, inferior) se registró con rampa de 15°C/min donde TCS eluye a un tiempo de 7,799 min. En ambos casos se observó picos cromatográficos puros, sin hombros o solapamiento de señales, lo cual revela la ausencia de interferentes. En base a los resultados obtenidos podemos indicar que la técnica cromatográfica es selectiva para el análisis de TCS.

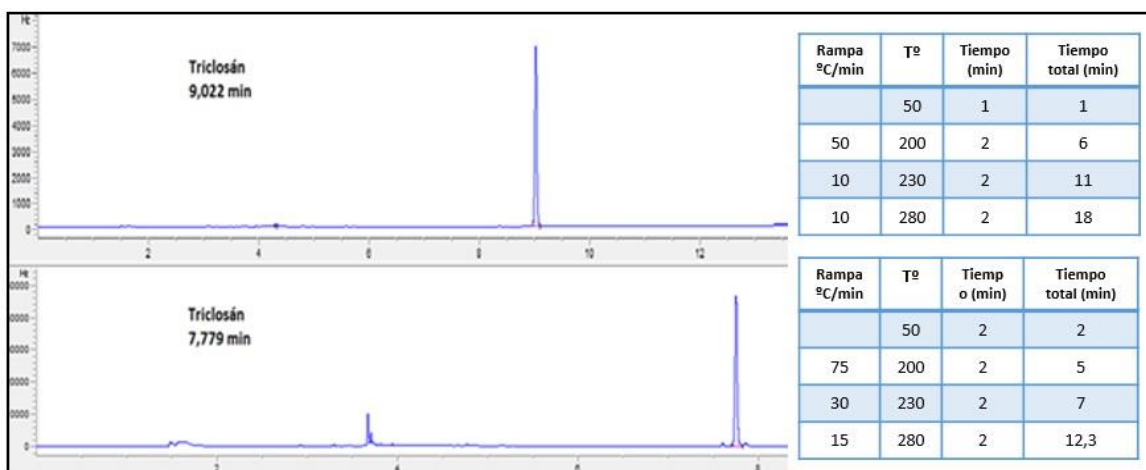


Figura 11: Cromatogramas de solución estándar de TCS obtenidos con distintos programas cromatográficos.

### 5.4.2. Linealidad.

Para esta prueba se construyó una curva de calibración entre 0,88 y 93,7 µg/L de TCS usando como SI el PCB 28 a una concentración de 27,8 µg/L. Las soluciones estándar fueron inyectadas manualmente (1µL) y analizadas de acuerdo al programa cromatográfico establecido previamente. Los resultados se presentan en la siguiente figura 12.

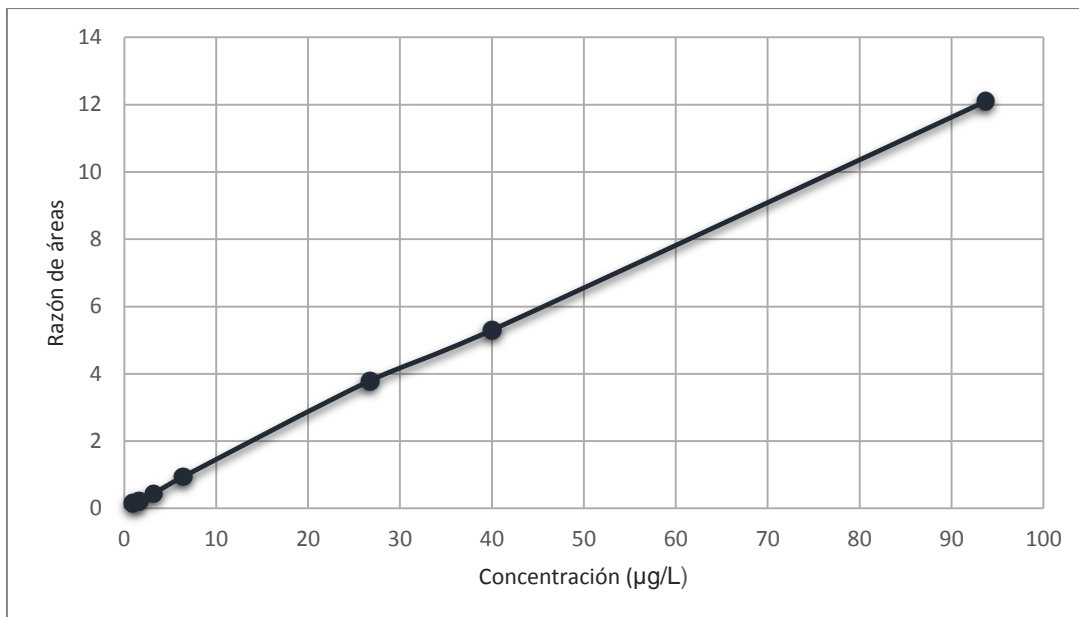


Figura 12: Gráfico concentraciones de TCS vs razón de áreas.

Obteniéndose la ecuación de la recta  $R = 0,1339 \cdot C (\mu\text{g/L}) + 0,0521$

Donde:

Pendiente = 0,1339                      Intercepción = 0,0521                       $r = 0,999$

Para obtener los límites de cuantificación se realizaron 5 mediciones de una solución estándar de TCS con una concentración de 2,01 µg/L, obteniéndose una desviación estándar de 0,098, con éste valor podemos calcular los límites de cuantificación según las siguientes ecuaciones:

$$LD = 3,29 * DS \quad LC = 10 * DS$$

Obteniendo valores de 0,32 y 0,97 µg/L para el límite de detección y cuantificación respectivamente.

#### 5.4.3. Recuperación (R)

Se realizó la adición de 1 mL de solución de TCS con una concentración de 520 µg/L a 250 mg de material vegetal (seco, molido y tamizado), se evaporó el solvente y posteriormente se realizó el proceso para determinar la cantidad pseudototal de TCS

(extracción sólido-líquido, SPE, filtrado, evaporación solvente, reconstitución con SI), obteniéndose las concentraciones de TCS en material vegetal (tabla 6).

Tabla 6: Concentración de TCS en prueba de recuperación.

Muestra	C <sub>o</sub> (mg/kg)	C <sub>e</sub> (mg/kg)	C <sub>a</sub> (mg/kg)	R (%)
1	nd	1,70	2,08	81,8
2	nd	1,83	2,08	88,2
3	nd	1,88	2,08	90,5
4	nd	2,00	2,08	96,2
5	nd	1,97	2,08	94,8
6	nd	1,76	2,08	84,6
7	nd	1,79	2,08	86,1
8	nd	1,83	2,08	87,8
9	nd	1,72	2,08	82,5

Promedio	88,1
DS	4,75

$$R = \frac{C_e - C_o}{C_a}$$

Donde:

R: Recuperación.

C<sub>e</sub>: Concentración del analito determinada en la muestra enriquecida (mg/kg).

C<sub>a</sub>: Concentración del analito adicionado a la muestra (mg/kg).

C<sub>o</sub>: Concentración de la muestra blanco (sin analito) (mg/kg).

El porcentaje promedio de recuperación fue de 88,1 %, se realizó la prueba t para analizar si los resultados eran consistentes. La prueba consiste en comparar el valor de T de student calculado con un valor T crítico (teórico). Si el t calculado es menor al T crítico los valores se aceptan como consistentes, de lo contrario se debe repetir el proceso. Si el resultado de la recuperación es aceptado, entonces se pueden hacer comparaciones con los datos de la tabla de la AOAC (ISP. 2010).

$$T_{calc} = \frac{[100 - \%R]}{DSx\sqrt{n}}$$

Donde:

T calc= t observado o calculado

R = recuperación

DS = desviación estándar de las lecturas del porcentaje de recuperación

n = número de lecturas o valores observados

T calc = 0,79 < T crítico = 2,306.

Por lo cual no hay diferencias significativas y los valores calculados no necesitan ser corregidos. Tomando los rangos de concentración a los cuales se trabajó (1-10 ppm) el Codex Alimentarius estima rangos de porcentajes de recuperación entre 80 -110 %, por lo cual el valor obtenido experimentalmente se encuentra dentro del rango permitido.

#### **5.4.4. Repetibilidad**

Para aceptar los valores obtenidos de forma experimental es necesario determinar el coeficiente de variación de Horwitz, el cual se obtiene según la siguiente ecuación:

$$CVh = 2^{(1-0,5\log C)}$$

Donde:

CVh= Coeficiente de variación de Horwitz.

C= concentración del analito expresado en potencia de 10.

El coeficiente de variación (CVh) esta expresado en potencia de 2.

Tabla 7: Concentración de TCS en prueba de repetibilidad.

Muestra	TCS (µg/L)
1	7,8
2	6,8
3	6,9
4	7,9
5	8,1
<b>Promedio</b>	7,5
<b>DS</b>	0,6
<b>CVr %</b>	8,17

En nuestro caso, al no conocer el valor real de TCS en la muestra obtendríamos un valor de CVh con un error implícito, lo cual éticamente no es permitido, ante esta situación Horwitz describió distintos valores de CVh en función de los niveles de concentración trabajados, los valores de concentración trabajados se sitúan entre 0,001 y 0,01 mg/L, que según los valores estimados de Horwitz el CVh debe ser menor a 16,0, al compararlo con el valor obtenido experimental (8,17) (tabla 7), se cumple que  $CVr < CVh$ , por lo cual el método es replicable bajo el criterio de Horwitz.

#### **5.4.5. Reproducibilidad**

Al igual que en el caso de la repetibilidad, no se puede calcular la CVh al no poseer el valor real de TCS en las muestras, por lo que se procedió a comparar el valor descrito por Horwitz para el nivel de concentración al cual se trabajó (0,001 y 0,01 mg/L). EL CVh para esta concentración es de 21,3, al compararlo con el encontrado experimentalmente (10,7) (tabla 8) se logró evidenciar el cumplimiento de  $CVr < CVh$ , por lo cual el método es repetible bajo el criterio de Horwitz.

Tabla 8: Concentración de TCS en prueba de reproducibilidad.

Muestra	Concentración TCS ( $\mu\text{g/L}$ )
1	8,7
2	7,8
3	8,3
1.1	8,7
2.1	7,8
3.1	8,3
1.2	7,6
2.2	6,6
3.2	6,4
<b>promedio</b>	7,8
<b>DS</b>	0,8
<b>CVr %</b>	10,7

Consideraciones: 1; 1,1; 1,2: misma muestra analizada en distintos días.

### 5.5. Obtención de muestras vegetales.

Las muestras con las cuales se trabajó (ejemplares comerciales, de invernadero y de cultivo hidropónico) fueron tratadas y analizadas en base seca.

Previo a la aplicación de la solución saturada de TCS sobre las hojas de lechuga comercial, ésta fue filtrada por membrana de nitrato de celulosa de  $0,45 \mu\text{m}$ , debido a la presencia de partículas de TCS en la superficie del líquido, lo cual podría generar errores en mediciones posteriores. Finalizado el tiempo de contacto con el material vegetal, se realizó un lavado de las hojas para eliminar cualquier residuo de contaminante, posteriormente las hojas fueron secadas y molidas, obteniéndose un polvo fino que no requirió tamizado. Las cantidades de material vegetal (MV) seco, con y sin TCS (blanco) fueron de 26 y 30 gramos, respectivamente (figura 13).



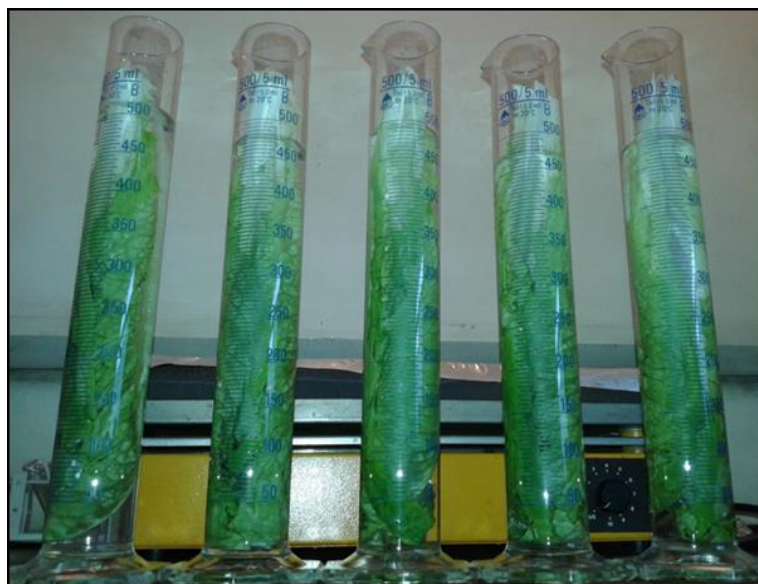


Figura 13: Hojas de lechuga comercial en contacto con solución acuosa de TCS.

Para las pruebas finales fue necesario probar diferentes matrices acuosas en las cuales aplicar el TCS a plantas previamente desarrolladas. La matrices usadas fueron: solución nutritiva, agua y solución de  $\text{CaCl}_2$  (0,01 mol/L). El TCS se usó con diferentes concentraciones iniciales. Los resultados de concentración encontrada se presentan en la tabla 9:

Tabla 9: Determinación de TCS en diversas matrices acuosas (SN,  $\text{CaCl}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$ ) a distintas concentraciones.

Matriz	Concentración nominal ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentración efectiva ( $\mu\text{g/L}$ )	Recuperación (%)
Agua	10400	1642,7	15,8
Agua	10300	1984,0	19,3
$\text{CaCl}_2$	10100	1680,6	16,6
$\text{CaCl}_2$	10400	1777,4	17,3
SN	10100	1869,6	18,5
SN	10300	1809,0	17,4
SN	5200	1433,8	27,6
SN	1100	278,3	25,3

Los porcentajes obtenidos fueron bajos, en torno a un 20% de la concentración nominal (10 mg/L), adicionalmente, los componentes de las matrices de la solución nutritiva y solución de CaCl<sub>2</sub> no serían un interferente sobre la solubilidad o la capacidad de retención de TCS por la resina de la columna C-18, ya que los porcentajes se mantienen independientemente de la composición de la solución. Para descartar factores asociados a la precipitación de TCS se realizó nuevamente la misma prueba solo en solución nutritiva, ocupando concentraciones más bajas (100 y 10 µg/L) en SN (tabla 10).

Tabla 10: Determinación de TCS en solución nutritiva a distintas concentraciones de TCS.

Muestra	Concentración nominal (µg/L)	Concentración efectiva (µg/L)	Recuperación (%)
M-1	100	13,88	13,9
M-2	100	12,89	12,9
M-3	100	13,52	13,5
M-4	10	1,98	19,8
M-5	10	1,69	16,9
M-6	10	2,08	20,9

Los porcentajes recuperados continuaron siendo bajos, por lo que se procedió a evaluar el factor pH. Se procedió a preparar SN con TCS (10 µg/L), acidificando las muestras a un pH 1,5 antes de ser pasada por las columnas C-18. Los porcentajes de recuperación para las muestras acidificadas fluctuaron entre un 30 y 46 % respecto de la concentración de TCS nominal en la solución, si bien hay un aumento en la cantidad de TCS, éste sigue siendo menor al 50% de la cantidad nominal.

Para verificar si el TCS se encuentra en el recipiente de preparación en forma adsorbida se probó con distintas proporciones de acetona/agua. Los valores obtenidos de estas pruebas (tabla 11) indican que el TCS se encuentra presente en la solución acuosa, pero no se encontraría solubilizado o posiblemente adsorbido en las paredes del recipiente que contiene la solución. Estos resultados pueden apoyarse en el trabajo realizado por Koc

y col., (2014), los que indican que el TCS es afectado por un proceso de adsorción hacia el material de plástico cuando el compuesto se encuentra en bajas concentraciones. Esta sería una posible causa en la baja cantidad de TCS medible en la solución acuosa, no así en soluciones con mezclas de solventes, como la ocupada para la determinación del TCS pseudototal.

Tabla 11: Determinación de TCS en soluciones agua/acetona a distintas proporciones.

Muestra (agua/acetona)	Concentración nominal ( $\mu\text{g/L}$ )	Concentración efectiva ( $\mu\text{g/L}$ )	Recuperación (%)
50/50 eluído	5000	3906	78,1
25/75 eluído	5000	2776	55,5
10/90 eluído	5000	81,72	1,6
50/50 recuperado	5000	13,33	0,2
25/75 recuperado	5000	2263	45,2
10/90 recuperado	5000	3720	74,4

Podemos mencionar que con los resultados obtenidos la concentración efectiva de TCS en solución acuosa es de alrededor de 1,8 mg/L a partir de una concentración nominal de 10 mg/L elaborada en el laboratorio.

#### 5.5.1. Determinación de TCS pseudototal en ejemplares de lechuga de invernadero.

Posterior a las determinaciones relacionadas con TCS en solución acuosa, nutritiva,  $\text{CaCl}_2$  0,01 mol/L y solución de agua/acetona en distintas proporciones, se realizaron pruebas con una cantidad reducida de ejemplares comerciales de lechuga, los cuales fueron utilizados para analizar distintos niveles de concentración y tiempos de exposición a TCS (figura 14).



Figura 14: Lechugas de invernadero en contacto en SN.

Los resultados obtenidos para determinar TCS pseudototal en ejemplares de lechugas de invernadero expuestos a distintas concentraciones y tiempos de exposición se indican en las tablas 12 y 13 respectivamente. Adicionalmente, el detalle de los resultados se indica en las tablas 1 y 2 (anexos). Estos muestran un aumento en la cantidad absorbida por la raíz que es proporcional a la concentración de TCS en la SN, por otro lado se observa un bajo movimiento del compuesto desde la raíz hacia la parte aérea, que no es proporcional a la de TCS en la raíz.

Tabla 12: Concentración de TCS pseudototal en lechugas de invernadero expuestas a diferentes concentraciones del compuesto.

Muestra	Nivel de TCS (mg/L)	Masa (g)	TCS (mg/kg)
Raíz	5	0,98	25,3 <sup>a</sup> ± 0,5 <sup>b</sup>
	10	0,93	150 ± 5,0
	20	0,66	429 ± 8,0
Parte aérea	5	9,72	0,72 ± 0,06
	10	9,14	0,94 ± 0,05
	20	5,91	1,08 ± 0,05

<sup>a</sup>: Concentración, <sup>b</sup>: Desviación estándar

En esta prueba se observó que el TCS es acumulado por la raíz y un bajo porcentaje es movilizado hacia la parte aérea. Una posible explicación de éste resultado sería el tiempo

de exposición al contaminante, que para este caso fue de 2 días, lo cual limitaría la capacidad del vegetal para movilizar a compuestos lipofílicos como el TCS hacia la parte superior. Por otro lado, la disponibilidad de TCS en SN podría ser influyente en la cantidad de compuesto absorbido hacia la raíz ya que éste compuesto posee una baja solubilidad en agua (0,0001 g/100 g H<sub>2</sub>O a 20°C).

Tabla 13: Concentraciones de TCS pseudototal en lechugas de invernadero a distintos tiempos de exposición del compuesto.

Matríz	Tiempo de exposición (días)	Masa (g)	TCS mg/kg
Raíz	4 (blanco)	0,68	nd
	2	0,82	120 <sup>a</sup> ± 3 <sup>b</sup>
	3	0,85	245 ± 7
	4	0,76	172,3 ± 0,7
Lechuga	4 (blanco)	4,85	nd
	2	4,44	1,2 ± 0,1
	3	4,85	0,9 ± 0,1
	4	4,64	1,5 ± 0,2

<sup>a</sup>: Concentración, <sup>b</sup>: Desviación estándar

### 5.5.2. Cultivo hidropónico de lechuga.

Considerando las pruebas preliminares se eligió un periodo de tratamiento con TCS de 1, 3 días y con concentraciones de 0 y 20 mg/L. El cultivo fue realizado de la siguiente forma:

Etapa 1: Germinación de semillas y crecimiento de plántulas sobre arena. Duración: 10 -12 días.

Etapa 2: Cultivo hidropónico de lechuga en potes de 1 L con 6 plántulas cada uno. Las SN fueron cambiadas cada 3-4 días, para disminuir la variación en las concentraciones de cada nutriente en el tiempo. Duración: 3 semanas (figura 15).

Etapa 3: Aplicación de los tratamientos con TCS (20 mg/L). Duración: 1 y 3 días.

Etapa 4: Finalización del cultivo de lechuga y obtención de las muestras. Se separó la parte aérea de la raíz, ambas partes fueron secadas para determinar la biomasa seca,

metales y nutrientes. También se prepararon muestras compuestas con material seco, uno de parte aérea y otro de raíz de cada tratamiento para determinar TCS pseudototal y bioaccesible.

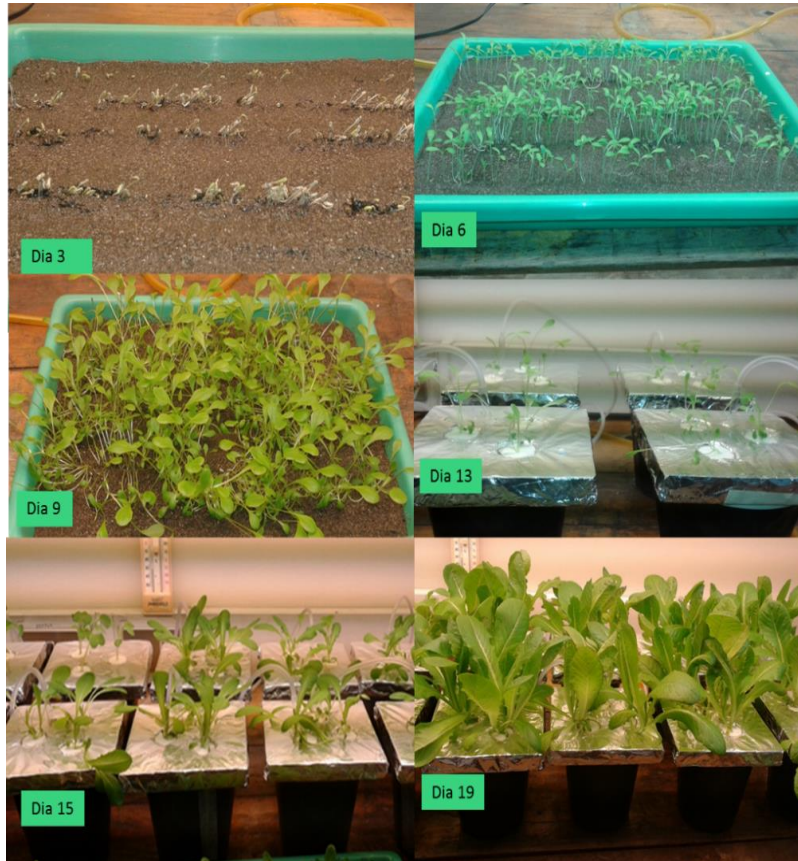


Figura 15: Cultivo hidropónico de lechugas.

### 5.5.3. Cultivo hidropónico de rábano

Para el caso del cultivo de rábano (*Raphanus sativus* L.), éste se realizó bajo las mismas condiciones que para lechugas. Sin embargo, de acuerdo al procedimiento señalado por Wang y col, (2015), se incrementó la concentración de algunos nutrientes de la SN. En la figura 16 se presenta el desarrollo de las plantas a diferente tiempo.

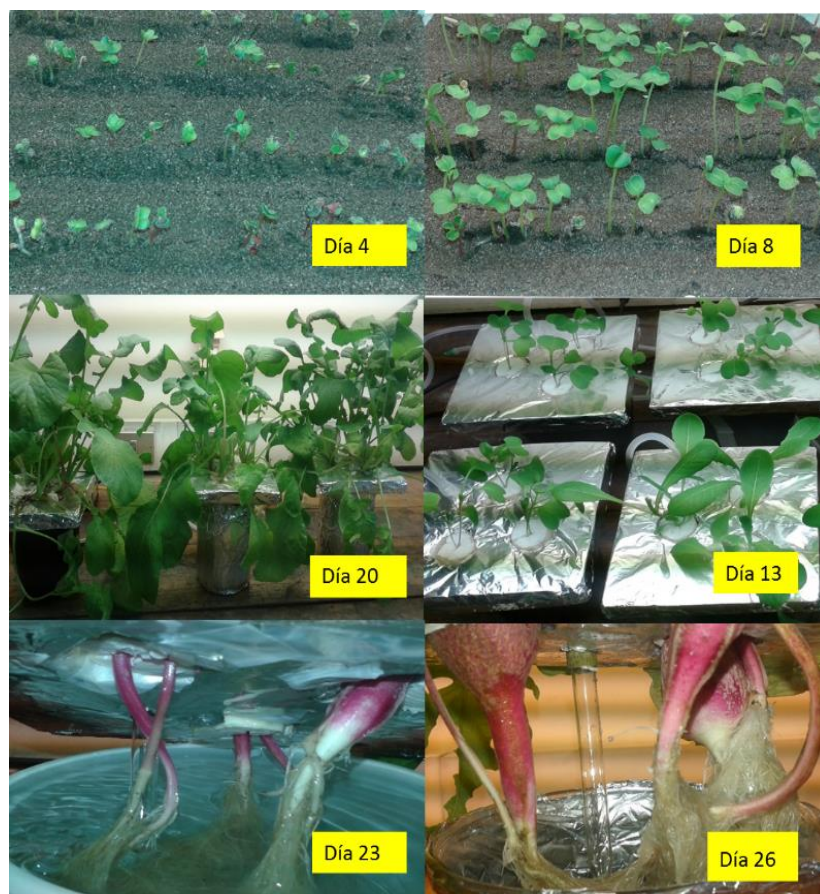


Figura 16: Cultivo hidropónico de rábanos.

### 5.6. Determinación de la concentración pseudototal de TCS en muestras vegetales.

La concentración pseudototal de TCS en lechuga se determinó en ejemplares comerciales, obtenidos de invernadero y de cultivo hidropónico. En el caso de rábano, se determinó en ejemplares comerciales y obtenidos en cultivo hidropónico.

En este estudio, para el caso de lechuga se necesitaba que TCS estuviera presente en cantidad detectable en las hojas y en el caso de rábano, en la raíz comestible. Considerando que no había certeza de la absorción de TCS y su movilización a la parte aérea (lechuga) o presencia en el rábano comestible, se preparó material vegetal sometiendo hojas de lechuga y rábanos a una solución saturada de TCS. Con esto se obtuvo material suficiente para desarrollar la parte de tratamiento de la muestra en ambas matrices y para validar el método. En la tabla 14 se indican las concentraciones de TCS en ejemplares comerciales de lechuga y rábano tratados con TCS.

Tabla 14: Concentración de TCS pseudototal en ejemplares comerciales de lechuga y rábano tratados con TCS.

Muestra	Masa (g)	TCS (mg/kg)
<i>Lechuga</i>		
Blanco	14,32	nd
Hoja	25,44	99 <sup>a</sup> ± 2 <sup>b</sup>
<i>Rábano</i>		
Blanco	14,32	nd
Raíz reservante	0,760	142 ± 5

<sup>a</sup>: Concentración, <sup>b</sup>: Desviación estándar

Para las muestras de cultivo hidropónico, las cantidades obtenidas de raíz fueron bajas (menor a 1 gramo), lo cual determino que se realizaran los procesos de tratamiento de muestra en duplicado, no así en el caso de la parte comestible (hojas y raíz reservante) donde las cantidades de material seco fueron suficientes para realizar el tratamiento en triplicado (tabla 15), el detalle de los resultados puede ser revisado en tablas 4 y 6 (anexos).

Tabla 15: Concentración de TCS pseudototal en muestras vegetales obtenidas de cultivo hidropónico tratadas con TCS (20 mg/L).hidropónico tratadas con TCS (20 mg/L).

Matríz	Raíz		Parte comestible		
	masa (g)	pseudototal (mg/kg)	masa (g)	pseudototal (mg/kg)	FT
<i>Lechuga</i>					
Blanco	1,23	nd	3,93	nd	-
1 día	0,6	309 <sup>a</sup> ± 84 <sup>b</sup>	2,83	2,8 ± 0,7	0,009
3 días	1,0	959 ± 57	3,90	2,6 ± 0,2	0,003
<i>Rábano</i>					
Blanco	0,83	nd	0,94	nd	-
1 día	0,76	321 ± 81	1,25	0,9 ± 0,3	0,003
2 días	0,55	1166 ± 112	0,55	1,9 ± 0,3	0,002

Parte comestible: raíz reservante (rábano), parte aérea (lechuga); <sup>a</sup>: Concentración, <sup>b</sup>: Desviación estándar; No detectado (nd).



Los factores de translocación para los ejemplares de rábano y lechuga en cultivo hidropónico fueron muy bajos, lo que indica una escasa capacidad de movilización de TCS por la planta, pudiendo deberse a las características fisicoquímicas del analito (lipofilia).

### 5.7. Determinación de la bioaccesibilidad de TCS en muestras vegetales.

Se determinó la bioaccesibilidad para hojas de lechuga y rábanos comerciales sometidos a una solución saturada de TCS (20 mg/L) durante 24 hrs, estas pruebas fueron realizadas para conocer las eventuales consideraciones a tener en cuenta para el tratamiento de los cultivos definitivos, especialmente en la neutralización de la fase gástrica y la generación de espuma. Los resultados promedio se indican en la tabla 16 y el detalle en la tabla 3 (anexos):

Tabla 16: Concentración de TCS bioaccesible en ejemplares comerciales de lechuga y rábano utilizando método PBET.

Muestra	Material seco (g)	Fase Gástrica mg/kg	Fase Intestinal mg/kg	Bioaccesibilidad gástrica %	Bioaccesibilidad intestinal %
<i>Lechuga</i>					
blanco	4,85	nd	nd	nd	nd
Hoja	25,4	3,2 <sup>a</sup> ± 0,5 <sup>b</sup>	8,3 ± 0,2	3,23	8,38
<i>Rábano</i>					
blanco	8,91	nd	nd	nd	nd
Raíz reservante	14,8	3 ± 2	6,8 ± 0,4	2,11	4,79

<sup>a</sup>: Concentración, <sup>b</sup>: Desviación estándar

Se determinó la bioaccesibilidad para los ejemplares de invernadero sometidos a 4 días de exposición a una concentración de TCS de 20 mg/L, ya que estos ejemplares contenían mayor concentración de TCS disponible, no encontrándose resultados positivos, el TCS no fue detectado ni cuantificado en ninguna fase (gástrica e intestinal).

En el caso de ejemplares de lechuga y rábano obtenidos del cultivo hidropónico, TCS fue identificado y cuantificado en todas las fases (gástrica e intestinal). Las concentraciones obtenidas se resumen en la tabla 17. Adicionalmente el detalle para cada muestra se indica en tablas 5 y 7 (anexos).

Tabla 17: Concentración de TCS bioaccesible en muestras de lechuga y rábano obtenidas de cultivo hidropónico utilizando método PBET.

Muestra	Material seco (g)	Fase gástrica mg/kg	Fase intestinal mg/kg	Bioaccesibilidad gástrica %	Bioaccesibilidad intestinal %
<i>Lechuga</i>					
blanco	3,93	nd	nd	nd	nd
1 día	2,83	0,235 <sup>a</sup> ± 0,007	0,45 ± 0,05 <sup>b</sup>	8,39	16,1
3 días	3,90	0,145 ± 0,007	0,425 ± 0,007	5,58	16,4
<i>Rábano</i>					
blanco	0,94	nd	Nd	nd	Nd
1 día	1,25	0,155 ± 0,007	0,34 ± 0,01	16,7	36,6
2 días	0,55	0,15 ± 0,03	0,33 ± 0,01	7,85	17,3

Consideraciones: Bioaccesibilidad parte aérea de lechuga y raíz reservante de rábano; porcentajes bioaccesibilidad respecto a TCS pseudototal; <sup>a</sup>: Concentración, <sup>b</sup>: Desviación estándar

Un bajo porcentaje del analito presente en la matriz queda disponible en las soluciones gástricas e intestinal (5-8% y 16-17% respectivamente), pudiendo deberse a la baja solubilidad que presenta el compuesto en agua. A su vez, la composición de las fases influye sobre la solubilidad de TCS en la solución, debido al aumento en la concentración del compuesto en todas las muestras (lechuga y rábano) en la fase intestinal.

## 5.8. Contenido de metales en vegetales

Se analizó el contenido de elementos macronutrientes P, Ca, Mg y K y micronutrientes, Cu, Fe, Mn y Zn en ejemplares de lechuga (parte aérea) y rábano (raíz reservante). Los resultados se presentan en la tabla 18. El análisis de macro y micronutrientes en el tejido vegetal de lechuga y rábano (tabla 18) señala que, independiente del tiempo de tratamiento con TCS, estos elementos se encuentran en niveles de suficiencia para el desarrollo vegetal (Correndo, 2012), por lo cual la aplicación de TCS en dosis de 20 mg/L a la solución nutritiva, no produjo cambios significativos en los niveles de nutrientes al menos por 3 días en el caso de lechuga y dos días en el caso de rábano.

Tabla 18: Concentración de macro y micronutrientes en muestras vegetales de lechuga y rábano obtenidas de cultivo hidropónico.

	P <sup>a</sup> %	Cu mg/kg	Fe mg/kg	Mn mg/kg	Ca %	Mg %	Zn mg/kg	K %
<i>Lechuga</i>								
Blanco <sup>b</sup>	5,67 <sup>c</sup> ± 0,05	10 ± 1,0	148 ± 54	101 ± 33	20 ± 3	1,75 ± 0,03	37 ± 1	50 ± 2
1 día	5,3 ± 0,1	9,0 ± 1,0	409 ± 62	172 ± 37	23 ± 4	2,1 ± 0,4	55 ± 3	59,0 ± 13
3 día	4,6 ± 0,7	7,6 ± 0,6	241 ± 12	123 ± 4	20 ± 9	2,50 ± 0,05	46 ± 4	67,0 ± 19
<i>Rábano</i>								
Blanco	5,98	3,5	34,5	13,6	17	2,29	38,3	85,7
1 día	4,3 <sup>d</sup> ± 0,9	4,8 ± 0,3	56,3 ± 0,6	10,7 ± 0,4	21 ± 5	3,2 ± 0,6	21,8 ± 0,7	71 ± 6
2 días	5,70 ± 0,02	3,2 ± 0,2	39 ± 3	11,8 ± 0,1	14 ± 2	2,4 ± 0,1	17 ± 1	75,4 ± 0,9

<sup>a</sup> Concentración ± desviación estándar; <sup>b</sup> blanco =sin TCS; <sup>c</sup> lechuga en triplicado; <sup>d</sup> rábano en duplicado

## 6. DISCUSIÓN

El TCS es un compuesto halogenado (clorado), esta característica permitió su análisis a través de la técnica de cromatografía de gases, ocupando un detector de microcaptura de electrones ( $\mu$ ECD), existen pocos estudios sobre análisis de TCS con éste tipo de detector, debido al uso generalizado de técnicas tales como HPLC-MS y GC-MS (Karnjanapiboonwong y col., 2011; Zarate y col., 2012; Ferrer y col., 2004; Canosa y col., 2008). Las mediciones se realizaron utilizando un programa cromatográfico optimizado, a través del cual se establecieron los tiempos de retención para TCS, TCC y MTCS.

Entre los estudios publicados sobre análisis de TCS en diversas matrices, el trabajo de Canosa y col, (2008) utilizó MSPD para tratar muestras vegetales. En este estudio, el procedimiento MSPD fue aplicado bajo las mismas condiciones descritas por los autores. Los resultados evidenciaron la presencia de TCS en el material vegetal con una concentración de  $86 \pm 3$  mg/kg, sin embargo ésta técnica no logró retener componentes de la matriz que causaban interferencias en la etapa cromatográfica, la solución obtenida posterior a la SPE poseía una coloración verde intensa debido a la presencia de clorofila. Debido a esto se evaluó otro método de extracción del analito desde la matriz vegetal. La técnica usada fue extracción sólido-líquido, eligiendo acetonitrilo como solvente extractante, basados en el estudio de Delgado y col (2012) donde se evaluaron las solubilidades TCS y TCC en distintos solventes orgánicos. En este estudio, el acetonitrilo aparece como el segundo mejor solvente, después de acetona, para solubilizar TCS a temperatura ambiente, además es miscible en agua y presenta un punto de ebullición más alto que acetona con lo cual se evita la pérdida de solvente por evaporación durante la preparación de soluciones. Para disminuir la interferencia de clorofila se incorporó el agente precipitante MPA en la solución extractante. En el trabajo de Mendoza y col (2009), el MPA fue utilizado como agente precipitante de la clorofila y otros componentes de la matriz vegetal en el análisis de glutatión, cabe mencionar que el MPA es un agente precipitante de proteínas hidrosolubles (Briggs, 1940) y la clorofila es un pigmento compuesto por un núcleo de porfirina y una cola de tipo lipofílica (figura 17), la cual posee como función mantenerla unida a la membrana de células que contengan cloroplastos y cianobacterias (García, 2000), pero su estructura presenta grupos aminos, específicamente en el anillo de porfirina, los cuales serían el sitio de unión con el MPA según el estudio de Briggs, (1940). En el caso de las proteínas el MPA se une a los grupos positivos (grupos aminos) formando interacciones de tipo iónico de baja

capacidad de ionización, siendo ésta una interacción de tipo reversible en función del pH (Briggs, 1940). En nuestro estudio, el uso de MPA requirió la incorporación de agua a la solución extractante para facilitar su disolución. Al evaluar distintas proporciones de MPA, de 0 a 2% (p/p) se observó un aumento en la cantidad de TCS pesquisado, lo cual se debería a la menor cantidad de clorofila presente en las soluciones en la etapa de SPE. El uso de la solución de MPA debe ser *in situ*, ya que puede ocurrir la hidrólisis de éste a ácido ortofosfórico, que no posee propiedades precipitantes (Briggs, 1940).

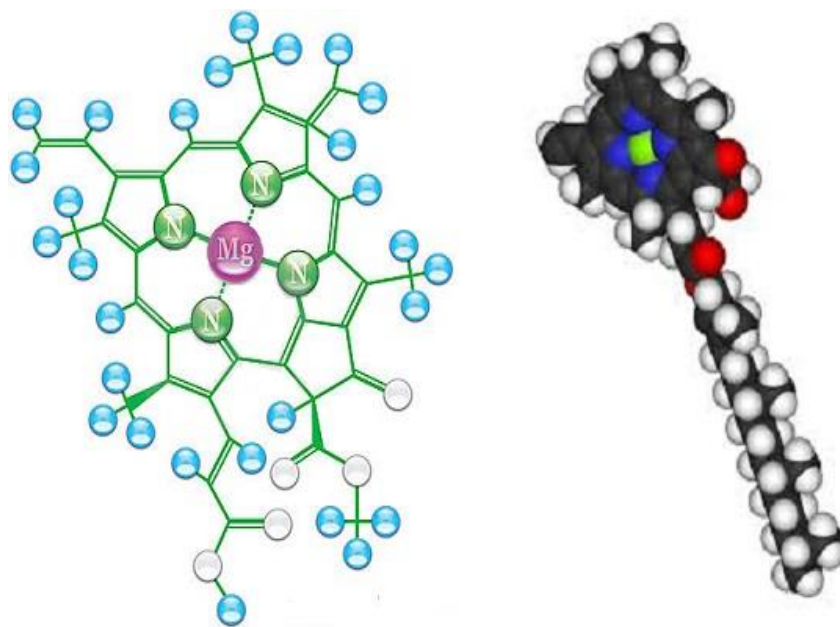


Figura 17: Anillo de porfirina y visión 3D de clorofila.

La extracción en fase sólida requiere una optimización, dependiendo del analito como de la matriz en la cual se encuentra el analito. Con el uso de cartridges con resina C-18 se obtuvo un adecuado porcentaje de recuperación de TCS. Uno de los factores a considerar en la optimización de la SPE es la secuencia de pasos que se realizan de forma manual en el proceso (acondicionamiento, paso de muestra, lavado y elución). Debido a que en los estudios preliminares se observó la presencia de TCS remanente en columnas ya ocupadas, fue necesario una optimización de la etapa de elución. Al comparar acetona como solvente de elución con una mezcla de metanol/acetonitrilo, acetona fue capaz de eluir una mayor cantidad de analito desde la columna que la mezcla de solventes

(acetonitrilo/metanol), además de poseer una alta volatilidad que permiten realizar la etapa de evaporación posterior a la elución en menor tiempo.

El cultivo definitivo fue realizado en forma posterior a las pruebas con lechuga comercial, cultivos hidropónicos de lechuga y ejemplares comerciales de rábano, el cual consideró el trabajo previo de Riveros (2007) en los aspectos de cultivo, tales como germinación de semillas en arena de río, condiciones ambientales de cultivo y SN utilizada. En el caso de los ejemplares de lechuga se observó un desarrollo secuencial por parte de las plántulas hasta ejemplares maduros. No así en el caso de los ejemplares de rábano, los cuales posterior al traslado de las plántulas desde el soporte de arena hacia los vasos con SN, se observó un enlentecimiento en el crecimiento de éstos. La concentración de macronutrientes en la solución ocupada en este trabajo era mucho menor a la solución de Hoagland, por lo cual se procedió a aumentar algunos nutrientes, específicamente los macronutrientes K, P y N ( $K_2HPO_4$ ;  $Ca(NO_3)_2$ ;  $K_2SO_4$ ). Transcurridos entre 2-3 días utilizando la SN enriquecida se apreció un incremento de tamaño en las plantas de rábano.

La evaluación del medio para la aplicación del TCS a la planta, entre los cuales se probó agua, SN y solución de  $CaCl_2$  señalan que la concentración promedio efectiva de TCS en solución acuosa es de 1,8 mg/L a partir de una concentración nominal de 10 mg/L. El trabajo de Koc y col, (2014) evidenció que el TCS en soluciones acuosa experimenta un fenómeno de adsorción sobre el material de plástico de recipientes que contienen la solución, por lo que éste proceso puede estar dando cuenta del bajo porcentaje de recuperación obtenido a partir de soluciones acuosas de TCS. Las pruebas con distintas proporciones de acetona, en la cual TCS es soluble, evidenció que el compuesto si se encuentra en el recipiente que contiene a la solución, pero adherido en las paredes del recipiente que lo contiene.

El TCS pseudototal pudo ser cuantificado en todas las muestras de lechuga como también de rábano. En el caso de las partes comestibles obtenidas en cultivo hidropónico, la concentración de TCS fluctuó entre 0,9 mg/kg en muestras de raíz reservante de rábano y hasta 2,8 mg/kg en muestras de parte aérea de lechuga. Las raíces de todos los ejemplares (cultivos de invernadero y cultivo hidropónico final) absorbieron gran cantidad de TCS desde la SN, ésta cantidad es proporcional al tiempo de exposición, siendo mayor en el caso del rábano, desde 321 mg/kg para la exposición de 1 día a 1166 mg/kg para 3

días; en comparación a lechuga que fluctuó entre 309 mg/kg para la exposición de 1 día y 959 mg/kg para 3 días.

La translocación de TCS desde la raíz a la parte aérea de lechuga y desde la raíz verdadera a la raíz reservante de rábano fue bajo en todas las pruebas realizadas. Los FT estuvieron en el rango 0,002-0,003 y 0,003-0,009 para rábano y lechuga, respectivamente. Los mecanismos de absorción y translocación para TCS en vegetales no son conocidos, debido a la ausencia de estudios en relación al TCS en vegetales, lo más cercano y que permitiría dar una respuesta al bajo porcentaje de TCS movilizado hacia la parte aérea o hacia la raíz reservante serían los trabajos sobre herbicidas en plantas (Papa J, 2016). La absorción desde la SN hacia la raíz puede producirse de forma apoplástica (entre células), simplástica (a través de células), o ambas. En nuestro caso se observó en muestras de raíz de lechuga y rábano una alta concentración de TCS en los tratamientos de 1 día, lo que indicaría una absorción de tipo apoplástica, siendo la lipofilia del compuesto un factor que favorecería esta alta absorción por parte de la raíz. Una vez en el vegetal el TCS podría ser movilizado a través de un sistema apoplástico o simplástico, el primero formado por espacios intercelulares y xilema, el segundo por citoplasma celular y floema, pero nuevamente la lipofilia de éste desinfectante juega un papel importante siendo contrario al que juega en la absorción, debido a que compuestos altamente liposolubles carecen de movilidad a través del espacio intercelular.

En relación al TCS bioaccesible, podemos mencionar que fue cuantificado en muestras de lechuga (parte aérea) como también en rábano (raíz comestible), sin embargo al comparar éstos valores respecto al pseudototal para cada muestra se pudo observar que a pesar de que las muestras de lechugas (parte aérea) contenían una mayor cantidad de TCS pseudototal (2,6 y 2,8 mg/kg), ésta no se vio reflejada en el TCS bioaccesible, manteniendo una concentración similar a la determinada en muestras de rábano, las cuales contenían una menor cantidad de TCS pseudototal (0,9 y 1,91 mg/kg). Las concentraciones bioaccesibles determinadas tanto en lechuga como rábano fueron muy similares entre las fases gástrica e intestinal, siendo levemente menores para el rábano, sin evidenciar algún cambio significativo en la concentración de TCS a causa de la especie de vegetal. La cantidad de TCS bioaccesible estaría determinada por la solubilidad de éste compuesto en el medio acuoso, solo siendo modificada su solubilidad por componentes con propiedades emulsificantes como lo son las sales biliares (ácido cólico y quenodesoxicólico), los que poseen como función emulsificar componentes grasos (lipofílicos). Otro posible factor que

puede afectar la solubilidad de TCS es el pH, soluciones acuosas a pH sobre el pKa de TCS (7,9), generarían aumentos en su solubilidad, pero en el caso de las pruebas de bioaccesibilidad con simulación de fluidos gastrointestinales, donde el rango de pH utilizado en las fases varía entre 1,5 y 7; se imposibilitaría la opción de que el TCS se encuentre en su forma ionizada.



## 7. CONCLUSIONES

1. El trabajo realizado en esta memoria permitió validar una metodología para la determinación de TCS en tejido vegetal, mediante extracción sólido-líquido, SPE y análisis por GC- $\mu$ ECD.
2. El TCS puede ser extraído eficientemente desde matrices vegetales mediante un solvente constituido por agua: acetonitrilo 1:1 y ácido metafosfórico al 2% (p/p) con posterior concentración y limpieza en columnas de extracción en fase sólida con resina C18.
3. El método optimizado cumple con los parámetros de validación esenciales de todo método de análisis. Entre estos se destacan el ser un método selectivo, sensible, con límites de detección y cuantificación de la técnica cromatográfica de 0,32 y 0,97  $\mu$ g/L, respectivamente, reproducible, con un coeficiente de variación de 10,7% y con buena recuperación, 88,1%.
4. El TCS puede ser absorbido por plantas de lechuga y rábano cultivadas hidropónicamente. En el caso de lechuga, se demostró que el TCS puede ser translocado a la parte aérea, en tanto que para el rábano el TCS se acumula en la raíz reservante (parte comestible) de la planta.
5. Mediante una prueba de bioaccesibilidad oral *in vitro* se demuestra que TCS es bioaccesible a partir de vegetales comestibles como lechuga y rábano, tanto en pruebas realizadas sobre material obtenido mediante aplicación directa del compuesto sobre la hoja de lechuga (foliar) y raíz reservante de rábano, como por cultivo hidropónico.
6. La concentración bioaccesible en hoja de lechuga de cultivo hidropónico varió en el rango de 0,14-0,45  $\mu$ g/g, en tanto que en hojas con aplicación directa del compuesto, la concentración varió en el rango 3,2-8,3  $\mu$ g/g. En el caso de rábano, los rangos fueron 0,15-0,34  $\mu$ g/g y 3-6,8  $\mu$ g/g, respectivamente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adolfsson-Erici, M.**, Pettersson, M., Parkkonen, J., Sturve, J. 2002. Triclosan, a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden; *Chemosphere*. 46: 1485-1489.
- Allmyra, M.**, Adolfsson-Ericib, M., McLachlanb, M., Sandborgh-Englunda, G. 2006. Triclosan in plasma and milk from Swedish nursing mothers and their exposure via personal care products. *Science of the Total Environment*. 372: 87-93.
- Birbaum, L.**, Sttaskal, D. 2004. Brominated Flame Retardants: Cause for Concern?. *Environmental Health Perspectives*. 112: 9-17.
- Bonifazi, P.**, Pierini, E., Bruner, F. 1997. Solid phase extraction of Polychlorinated Biphenyls from water containing humic substances. *Chromatographia*. 44: 595-600.
- Briggs, D.** 1940. The metaphosphoric acid-protein reaction. <http://www.jbc.org/content/134/1/261.full.pdf> [consulta en línea: 12 noviembre 2015].
- Boyd, G.R.**, Reemtsma, H., Grimm, D.A., Mitra, S. 2003. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *The Science of the Total Environment*. 311: 135-149.
- Boyd, G.R.**, Palmeri, J., Zhang, S., Grimm, DA. 2004. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine disrupting chemicals (EDCs) in stormwater canals and Bayou St. John in New Orleans, Louisiana, USA. *The Science of the Total Environment*. 333: 137-148.
- Canosa, M.** 2008. Desarrollo de metodología analítica para la determinación de TCS y parabenos. Aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales. Tesis. Universidad de Santiago de Compostela. Facultad de Química.
- Canosa, P.**, Rodriguez, I., Rub, E., Cela, R. 2005. Optimization of solid-phase microextraction conditions for the determination of triclosan and possible related compounds in water samples. *Journal of Chromatography A*. 1072: 107-115.
- Canosa, P.**, Rodríguez, I., Rubí, E., Ramil, M., Cela, R. 2008. Simplified sample preparation method for triclosan and methyltriclosan determination in biota and foodstuff samples. *Journal of Chromatography A*. 1188: 132-139.
- Colman, J.**, Rice, G., Wright, J., Hunter, E., Teuscher, L., Lipscomb, J., Hertzberg, R., Simmons, J., Fransen, M., Osier, M., Narotky, M. 2011. Identification of

developmentally toxic drinking water disinfection byproducts and evaluation of data relevant to mode of action. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 254: 100-126.

**Correndo, A.,** Garcia, F. 2012. Concentración de nutrientes e planta como herramienta de diagnostic: Cultivos extensivos. Instituto internacional de nutrición vegetal (IPNI). Archivo agronomico #14.

**Crofton, K.,** Paul, K., DeVito, M., Hedge, J. 2007. Short-term in vivo exposure to the water contaminant triclosan: Evidence for disruption of thyroxine; *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 24: 194-197.

**Dann, A.,** Hontela, A. 2011. Triclosan: environmental exposure, toxicity and mechanisms of action; *Journal of Applied Toxicology*. 31: 285-311.

**Daughton, C.,** Ternes, T. 1999. Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: Agents of Subtle Change?. *Environmental Health Perspectives*. 107: 907-938.

**Delgado, D.,** Holguin, A., Martínez, F. 2012. Termodinámica de disolución de TCS y triclocarban en algunos solventes orgánicos volátiles. *Revista de la facultad de química farmacéutica Universidad de Medellin, Colombia*. 19: 79-92.

**De Prado, R.,** Cruz-Hipolito, H. Mecanismos de resistencia de las plantas a los herbicidas. [http://www.inia.org.uy/estaciones/la\\_estanzuela/webseminariomalezas/articulos/depradorafael.pdf](http://www.inia.org.uy/estaciones/la_estanzuela/webseminariomalezas/articulos/depradorafael.pdf) [consulta en línea: 05 enero 2016].

**Epigares, M.,** Perez, J. 1985. Aspectos sanitarios del estudio de las aguas. Universidad de Granada. Servicio de Publicaciones. Granada.

**Ferrer, I.,** Mezcuca, M., Gómez, M., Thurman, E., Agüera, A., Hernando, M., Fernández-Alba, A. 2004. Liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometric analyses for the elucidation of the photodegradation products of triclosan in wastewater samples. *Rapid Communications in mass spectrometry*. 18: 443-450.

**Fraker, S.,** Smith, G. 2004. Direct and Interactive Effects of Ecologically Relevant Concentrations of Organic Wastewater Contaminants on *Rana pipiens* Tadpoles. *Environmental Toxicology*. 3: 250-256.

**García, C.,** Gortáres, P., Drogui, P. 2011. Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remoción Emerging contaminants: effects and removal treatments. *Revista Química Viva; Número 2*.

- García, H.** 2000. Porfirinas Solubles en Agua: Síntesis, Homoasociación y Propiedades Fotofísicas de Porfirinas Sulfonadas 5,15-Difenilsustituidas. Universidad de Barcelona. Programa de Doctorado: Química Orgánica Bienni.
- Garrido, T.,** Mendoza, J. 2016. Characterization of Dissolved Organic Matter in River Water by Conventional Methods and Direct Sample Analysis-Time of Flight-Mass Spectrometry. *Journal of Chemistry*. 2016. 11p.
- Gatidou, G.,** Nikolaos, N.S., Athanasios, A.S., Lekkas, TD. 2007. Simultaneous determination of the endocrine disrupting compounds nonylphenol, nonylphenol ethoxylates, triclosan and bisphenol A in wastewater and sewage sludge by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1138: 32-41.
- 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: 31-39.
- Gil, M.,** Soto, A., Usma, J., Gutiérrez, O. 2012. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos; *Producción + Limpia*; 7: 52-73.
- Gomez, M.,** Petrovic, M., Fernandez, A., Barcelo, D. 2006. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *Journal of Chromatography*. 1114: 224-233.
- Halden, R.,** Paul, D. 2005. Co-Occurrence of Triclocarban and Triclosan in U.S. Water Resources; *Environmental Science Technology*. 39: 1420-1426
- Henriquez, D.** 2010. Presencia de contaminantes emergentes en aguas y su impacto en el ecosistema. Estudio de caso: productos farmacéuticos en la cuenca del río Biobío, región del Biobío, Chile. Santiago de Chile.
- Intawongse, M.,** Dean, J.R. 2008. Use of the physiologically based extraction test to assess the oral bioaccessibility of metals in vegetable plants grown in contaminated soil. *Environmental Pollution*. 152: 60-72.
- ISO/FDIS 17402.** 2006. Soil quality - Requirements and guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials.
- ISP.** 2010. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición “Aspectos generales sobre la validación de métodos”; Edición 2010.

- Jobling, S.**, Reynolds, T., White, R., Parker, M., Sumpter, J. 1995. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environmental Health Perspectives*. 103: 582–587.
- Karnjanapiboonwong, A.**, Chase, D., Can, E., Jackson, W., Maul, J., Morse, A., Anderson, T. 2011. Uptake of 17  $\alpha$ -ethynylestradiol and triclosan in pinto bean, *Phaseolus vulgaris*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 74: 1336-1342.
- Koc, A.**, Orhona, K., Ogutverici, A., Yilmaz, L., Furi, L., Oggioni, M., Dileka, F., Yetis, U. 2014. Is adsorption an artifact in experimentation with Triclosan?. *Desalination and Water Treatment*. 52: 37-39.
- Kuster, M.**, Alda, M., Hernando, M., Petrovic, M., Martín, A., Barceló, D. 2008. Analysis and occurrence of pharmaceuticals, estrogens, progestogens and polar pesticides in sewage treatment plant effluents, river water and drinking water in the Llobregat river basin (Barcelona, Spain); *Journal of hydrology*. 358: 112-23.
- Lee, H.**, Peart, T., Svoboda, M. 2005. Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1094: 122-129.
- Ljung, K.**, Oomen, A., Duits, M., Selinus, O., Berglund, M. 2007. Bioaccessibility of metals in urban playground soils. *Journal of Environmental Science and Health*. 42: 1241-1250.
- Marques, A.**, Lourenco, H., Nunes, M., Roseiro, C., Santos, C., Barranco, A., Rainieri, S., Langerholc, T., Cencic, A. 2011. New tools to assess toxicity, bioaccessibility and uptake of chemical contaminants in meat and seafood. *Food Research International*. 44: 510-522.
- McAvoy, D.C.**, Schatowitz, B., Jacob, M., Hauk, A., Eckhoff, W.S. 2002. Measurement of triclosan in wastewater treatment systems. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21:1323-1329.
- Mendoza, J.**, Garrido, T., Riveros, R., Parada, J. 2009. Rapid capillary electrophoresis analysis of glutathione and glutathione disulfide in roots and shoots of plants exposed to copper. *Phytochemical Analysis*. 20: 114-119.
- Nakada, N.**, Tanishima, T., Shinohara, H., Kiri, K., Takada, H. 2006. Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water research*. 40: 3297-3303.

- Orvos, D.,** Versteeg, D., Capdevielle, M., Rothenstein, A., Cunningham, V 2004. Aquatic toxicity of triclosan. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21: 1338-1349.
- Papa J;** 2016. Interacciones Planta-herbicida. [http://www.agroconsultasonline.com.ar/documento.html/Interacciones%20planta-herbicida.pdf?op=d&documento\\_id=663](http://www.agroconsultasonline.com.ar/documento.html/Interacciones%20planta-herbicida.pdf?op=d&documento_id=663) [consulta en línea: 16 febrero 2016].
- Parsons, S.,** Boxall, A., Sinclair, C., Ramwell, C. 2008. Pesticide degradates of concern to the drinking water community. AWWA Research Foundation, Denver. Subject Area: High-Quality Water. Project 2938.
- Paul, M.,** Gregory, D. 2005. Tracking acidic pharmaceuticals, caffeine, and triclosan through the wastewater treatment process, *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol 24: 25-30.
- Perkin Elmer.** 2015. Automated Direct Sample Analysis (DSA/TOF) for the Rapid Testing of Drug Compounds. [https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP\\_01\\_Illicit\\_Drugs.pdf](https://www.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/APP_01_Illicit_Drugs.pdf) [consulta en línea: 20 marzo 2015].
- Petrović, M.,** Gonzalez, S., Barcelo, D. 2003. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends in Analytical Chemistry*. 22: 685-696.
- Poggio, L.,** Vrscaj, B., Schulin, R., Hepperle, E., Marsan, F. 2009. Metals pollution and human bioaccessibility of topsoils in Grugliasco (Italy). *Environmental Pollution*. 157: 680-689.
- Quilodrán, C.,** Mendoza, J. 2015. "Bioaccesibilidad oral humana de metales pesados en suelos urbanos contaminados". Tesis. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias. 107p.
- Real decreto 1599/1997** de 17 de octubre, que recoge la regulación de los productos cosméticos. [https://www.aemps.gob.es/legislacion/espanacosméticosHigiene/docs/cosmeticos/rcl\\_1997\\_2572.pdf](https://www.aemps.gob.es/legislacion/espanacosméticosHigiene/docs/cosmeticos/rcl_1997_2572.pdf) [consulta en línea: 26 marzo 2016].
- Reiss, R.,** Mackay, N., Habig, C., Griffin, J. 2002. An ecological risk assessment for triclosan in lotic systems following discharge from wastewater treatment plants in the United States. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 21: 2483-2492.
- Rezvani, M.,** Zaefarian, F. 2011. Bioaccumulation and translocation factors of cadmium and lead in *Aeluropus littoralis*. *Australian Journal of Agricultural Engineering*. 2: 114-119.

- Richardson, S.**, 2003. Disinfection by-products and other emerging contaminants in drinking water. *Trends in Analytical Chemistry*. 22: 666-884.
- Riveros, R.**, Mendoza, J. 2007. Efecto de la materia orgánica soluble y coloidal de los biosólidos sobre la biodisponibilidad de Cu, Pb, Ni, Cd y los niveles de ácido ascórbico y glutatión en plantas. Tesis. Universidad de Chile. Facultad Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 70 p.
- Sabaliunas, D.**, Webb, S., Hauke, A., Jacob, M., Eckhoff, W. 2003. Environmental fate of Triclosan in the River Aire Basin, UK. *Water Research*. 37: 3145-3154.
- Saikat, S.**, Barnes, B., Westwood, D. 2007. A review of laboratory results for bioaccessibility values of arsenic, lead and nickel in contaminated UK soils. *Journal of Environmental Science and Health*. 42: 1213-1221.
- Samsøe-Petersen, L.**, Winter-Nielsen, M., Madsen, T. 2003. Fate and effects of triclosan. Danish Environmental Protection Agency. Environmental Project No. 861.
- Shelver, W.**, Kamp, L., Church, J., Rubio, F. 2007. Measurement of Triclosan in Water Using a Magnetic Particle Enzyme Immunoassay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55: 3758-3763.
- Sialelli, J.**, Davidson, C., Hursthouse, A., Ajmone-Marsan, F. 2011. Human bioaccessibility of Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in urban soils from the city of Torino, Italy. *Environmental Chemistry*. 9: 197-202.
- Sigma Aldrich**. 2015. Derivatization Reagents for Selective Response and Detection in Complex Matrices. <http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/migrationresource4/Derivatization%20Rgts%20brochure.pdf> [consulta en línea: 12 enero 2015].
- Singer, H.**, Müller, S., Tixier, C., Pillonel, L. 2002. Triclosan: occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments. *Environmental science & technology*. 36:4998-5004.
- Taxe-Wuersch, A.**, De Alencastro, L., Grandjean, D., Tarradellas, J. 2005. Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment; *Water research*. 9: 1761-1772.
- Terzić, S.**, Senta, I., Ahel, M., Gros, M., Petrović, M., Barcelo, D., Müller, J., Knepper, T., Martí, I., Ventura, F., Jovanić, P., Jabucar, D. 2008. Occurrence and fate of

emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region. *Science of the total environment*. 399: 66-67.

**Thompson, A.**, Griffin, P., Stuetz, R., Cartmell, E. 2005. The Fate and Removal of Triclosan during Wastewater Treatment. *Water Environment*. 77: 63-67.

**Varela, P.**, Garrido, T. 2014. Caracterización de la materia orgánica disuelta presente en aguas del río Mapocho y su interacción con bifenilos policlorados en sistemas acuáticos; Tesis. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias. 121p.

**Varano, V.** 2014. Use of bioassays and biomarkers in daphnia magna to assess the effect of pharmaceutical residuals in freshwater ecosystems. [http://amsdottorato.unibo.it/6372/1/Varano\\_Valentina\\_tesi.pdf](http://amsdottorato.unibo.it/6372/1/Varano_Valentina_tesi.pdf) [consulta en línea: 12 abril 2016].

**Wang, Y.**, Shen, H., Xu, L., Zhu, X., Li, C., Zhang, W., Xie, Y., Gong, Y., Liu, L. 2015. Transport ultrastructural localization and distribution of chemical forms of lead in radish (*Raphanus sativus* L). *Journal Frontiers in Plant Science*. 6. Artículo 293

**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*. 6: 583-592.

**Witorsch, R.**, Thomas, J. 2010. Personal care products and endocrine disruption: A critical review of the literature. *Critical Reviews in Toxicology*. 40: 1-30.

**Wu, J. L.**, Lam, N.P., Martens, D., Kettrup, A., Cai, Z. 2007. Triclosan determination in water related to wastewater treatment. *Talanta*. 71: 1650-1654.

**Xin, H.**, Yun, Z., Jun, L., Hongzhen, L., Zhuhong, D. 2011. Bioaccessibility and health risk of arsenic, mercury and other metals in urban street dusts from a mega-city, Nanjing, China. *Environmental Pollution*. 159: 1215–1221.

**Ye, X.**, Kuklenyik, Z., Needham, L., Calafat, A. 2005. Automated On-Line Column-Switching HPLC-MS/MS Method with Peak Focusing for the Determination of Nine Environmental Phenols in Urine. *Analytical Chemistry*. 77: 5407-5413.

**Ying, G.**, Kookana, R. 2007. Triclosan in wastewaters and biosolids from Australian wastewater treatment plants. *Environmental International*. 33: 199-205.

**Zarate, F.**, Schulwitz, S., Stevens, K., Venables, B. 2012. Bioconcentration of triclosan, methyl-triclosan, and triclocarban in the plants and sediments of a constructed wetland. *Chemosphere*. 88: 323-329.



## ANEXOS

Tabla porcentajes de recuperación

Analito	Unidad	Recuperación estimada (%)
100	100 %	98 – 102
10	10 %	98 – 102
1	1 %	97 – 103
0,1	0,10 %	95 – 105
0,01	100 ppm	90 – 107
0,001	10 ppm	80 – 110
0,0001	1 ppm	80 – 110
0,00001	100 ppb	80 – 110
0,000001	10 ppb	60 – 115
0,0000001	1 ppb	40 – 120

Tabla de Horwitz

CONCENTRACIÓN			REPETIBILIDAD CVh%	REPRODUCIBILIDAD INTERNA CVh%
1 ppt	10/10 <sup>12</sup>	1,00E-12	64,0	85,3
10 ppt	10/10 <sup>12</sup>	1,00E-11	45,3	60,3
100 ppt	10/10 <sup>12</sup>	1,00E-10	32,0	42,7
1 ppb	10/10 <sup>9</sup>	1,00E-09	22,6	30,2
10 ppb	10/10 <sup>9</sup>	1,00E-08	16,0	21,3
100 ppb	10/10 <sup>9</sup>	1,00E-07	11,3	15,1
1 ppm	10/10 <sup>6</sup>	1,00E-06	8,00	10,7
10 ppm	10/10 <sup>6</sup>	1,00E-05	5,66	7,54
100 ppm	10/10 <sup>6</sup>	1,00E-04	4,00	5,33
1000 ppm	10/10 <sup>6</sup>	1,00E-03	2,83	3,77
1 %	10/10 <sup>2</sup>	1,00E-02	2,00	2,67
10 %	10/10 <sup>2</sup>	1,00E-01	1,41	1,89

Tabla 1: Concentraciones de TCS pseudototal en ejemplares de lechuga de invernadero a distintas concentraciones de exposición

MUESTRA	Área PCB 28	Tiempo (min)	Área TCS	Tiempo (min)	Razón áreas	Concentración muestra (µg/L)	Concentración mg/kg
Raíz 5 mg/L	6354	6,621	30453	7,785	4,79	62,60	25,04
Raíz 5 mg/L	6621,3	6,624	32777	7,785	4,95	64,71	25,88
Raíz 5 mg/L	5974,3	6,631	28648	7,795	4,80	62,63	25,05
Raíz 10 mg/L	5700	6,625	15389	7,821	27,00	360,96	144,38
Raíz 10 mg/L	5343,1	6,631	15532	7,818	29,07	388,78	155,51
Raíz 10 mg/L	5456	6,628	15268	7,82	27,98	374,17	149,67
Raíz 20 mg/L	5641	6,632	44967	7,796	79,71	1069,10	427,64
Raíz 20 mg/L	5688	6,631	46395	7,793	81,56	1094,06	437,62
Raíz 20 mg/L	5754	6,627	45213	7,796	78,57	1053,80	421,52
Hoja 5 mg/L	5517	6,639	1484	7,828	0,27	1,82	0,73
Hoja 5 mg/L	5343	6,639	1361	7,827	0,25	1,62	0,65
Hoja 5 mg/L	5856	6,639	1629	7,795	0,28	1,94	0,78
Hoja 10 mg/L	6439	6,613	2055	7,794	0,32	2,49	1,00
Hoja 10 mg/L	6304	6,626	1932	7,803	0,31	2,32	0,93
Hoja 10 mg/L	6103	6,615	1826	7,805	0,30	2,22	0,89
Hoja 20 mg/L	6304	6,611	2119	7,793	0,34	2,72	1,09
Hoja 20 mg/L	6237	6,611	2032	7,785	0,33	2,58	1,03
Hoja 20 mg/L	6429	6,611	2220	7,792	0,35	2,84	1,14

Tabla 2: Concentraciones de TCS pseudototal en ejemplares de lechuga de invernadero a distintos tiempos de exposición.

MUESTRA	Área PCB 28	Tiempo (min)	Área TCS	Tiempo (min)	Razón de área	Concentración muestra (µg/L)	Concentración mg/kg
Raíz blanco	6466	6,629	nd	-	-	-	-
Raíz blanco	6772	6,614	nd	-	-	-	-
Raíz blanco	7349	6,613	nd	-	-	-	-
Raíz 2 días	6258	6,617	35168	7,778	56,1	293	117
Raíz 2 días	6666	6,615	38377	7,777	57,5	275	120
Raíz 2 días	6975	6,612	41400	7,773	59,3	263	123
Raíz 3 días	6198	6,621	70204	7,776	113,2	591	236
Raíz 3 días	6184	6,631	73392	7,785	113,5	593	247
Raíz 3 días	6374	6,629	76357	7,785	110,1	575	250
Raíz 4 días	6653	6,628	55125	7,783	82,8	432	173
Raíz 4 días	6432	6,626	52855	7,783	82,1	447	171
Raíz 4 días	6584	6,618	54285	7,777	82,4	437	172
Hoja blanco	6345	6,641	nd	-	-	-	-
Hoja blanco	6456	6,612	nd	-	-	-	-
Hoja blanco	6657	6,621	nd	-	-	-	-
Hoja 2 días	6971	6,623	4653	7,789	0,67	3,21	1,29
Hoja 2 días	6616	6,613	3917	7,722	0,59	2,82	1,13
Hoja 2 días	6698	6,614	3779	7,725	0,56	2,67	1,07
Hoja 3 días	6484	6,615	3646	7,777	0,56	2,66	1,07
Hoja 3 días	6272	6,626	2748	7,794	0,44	2,01	0,81
Hoja 3 días	6310	6,625	3126	7,794	0,50	2,31	0,93
Hoja 4 días	5761	6,613	3825	7,782	0,66	3,19	1,28
Hoja 4 días	6433	6,613	4766	7,782	0,74	3,60	1,44
Hoja 4 días	6721	6,614	5869	7,782	0,87	4,29	1,72

Tabla 3: Concentraciones de TCS bioaccesible en ejemplares comerciales de lechuga (hojas) y rábano (raíz reservante) expuestos a solución acuosa de TCS (20 mg/L) durante 24 hrs.

Fase	Área PCB 28	Tiempo (min)	Área TCS	Tiempo (min)	Razón de área	Concentración muestra (µg/L)	Concentración mg/kg
G. lechuga	6166	6,64	nd	-	-	-	-
G. lechuga	5964	6,64	nd	-	-	-	-
G. lechuga	6190	6,63	nd	-	-	-	-
I 1. lechuga	5998	6,62	nd	-	-	-	-
I 1. lechuga	6465	6,62	nd	-	-	-	-
I 2. lechuga	6275	6,62	nd	-	-	-	-
I 2. lechuga	6236	6,63	nd	-	-	-	-
G. rábano	6321	6,62	7880	7,79	1,25	6,24	5,00
G. rábano	5884	6,62	2946	7,81	0,50	2,34	1,88
I 1. rábano	5911	6,62	6659	7,78	1,13	5,62	4,49
I 1. rábano	6420	6,62	7333	7,79	1,14	5,70	4,56
I 2. rábano	6134	6,61	8697	7,78	1,42	7,14	5,71
I 2. rábano	5882	6,62	7666	7,80	1,30	6,54	5,23

Consideraciones: G (Fase gástrica), I 1 (Fase intestinal 1), I 2 (Fase intestinal 2); Bioaccesibilidad hoja de lechuga y raíz reservante de rábano; muestras realizadas en duplicado.

Tabla 4: Concentraciones de TCS pseudototal en ejemplares de lechugas cultivados hidropónicamente expuestos a 1 y 3 días a SN con TCS.

Muestra	Área PCB 28	Tiempo (min)	Área TCS	Tiempo (min)	Razón áreas	Concentración muestra (µg/L)	Concentración mg/kg
Hoja blanco	6584	6,66	Nd	-	-	-	-
Hoja blanco	6866	6,65	Nd	-	-	-	-
Hoja blanco	6854	6,66	Nd	-	-	-	-
Hoja blanco	6365	6,66	Nd	-	-	-	-
Hoja blanco	6445	6,66	Nd	-	-	-	-
Hoja blanco	6652	6,64	Nd	-	-	-	-
Hoja blanco	6679	6,64	Nd	-	-	-	-
Hoja blanco	6458	6,66	Nd	-	-	-	-
Hoja blanco	6387	6,66	Nd	-	-	-	-
Hoja 1 día	5590	6,66	6043	7,79	1,08	5,38	2,15
Hoja 1 día	6721	6,66	7755	7,83	1,15	5,76	2,30
Hoja 1 día	5944	6,66	6927	7,82	1,17	5,82	2,33
Hoja 1 día	6658	6,64	11563	7,81	1,74	8,81	3,52
Hoja 1 día	6888	6,64	13110	7,81	1,90	9,68	3,87
Hoja 1 día	6156	6,63	10832	7,8	1,76	8,93	3,57
Hoja 1 día	6679	6,63	8172	7,79	1,22	6,12	2,45
Hoja 1 día	7144	6,62	8299	7,82	1,16	5,80	2,32
Hoja 1 día	7429	6,62	8900	7,78	1,20	5,99	2,40
Hoja 3 días	6621	6,65	9880	7,81	1,49	7,53	3,01
Hoja 3 días	6486	6,63	8343	7,8	1,29	6,45	2,58
Hoja 3 días	7071	6,64	10450	7,8	1,48	7,45	2,98
Hoja 3 días	7140	6,62	8884	7,79	1,24	6,23	2,49
Hoja 3 días	7078	6,62	8247	7,79	1,17	5,82	2,33
Hoja 3 días	6774	6,62	8372	7,78	1,24	6,19	2,48
Hoja 3 días	7413	6,62	9315	7,79	1,26	6,30	2,52
Hoja 3 días	7389	6,62	9469	7,78	1,28	6,43	2,57
Hoja 3 días	7389	6,63	9570	7,8	1,30	6,50	2,60
Raíz blanco	7340	6,63	Nd	-	-	-	-
Raíz blanco	6895	6,63	Nd	-	-	-	-
Raíz blanco	7023	6,62	Nd	-	-	-	-
Raíz 1 día	2896	6,64	25448	7,81	8,79	913	365
Raíz 1 día	3785	6,63	34862	7,82	9,21	957	382
Raíz 1 día	4442	6,64	42389	7,81	9,54	992	396
Raíz 1 día	1799	6,64	8226	7,82	4,57	472	189
Raíz 1 día	3619	6,64	22328	7,84	6,17	639	255
Raíz 1 día	3290	6,64	21078	7,82	6,41	664	265
Raíz 3 días	9964	6,63	22330	7,79	22,41	2337	935
Raíz 3 días	9031	6,64	20649	7,79	22,86	2384	953
Raíz 3 días	3833	6,64	9412	7,8	24,55	2561	1024
Raíz 3 días	2718	6,65	63813	7,81	23,48	2449	979
Raíz 3 días	2230	6,64	53317	7,82	23,90	2493	997
Raíz 3 días	2443	6,64	50447	7,81	20,65	2153	861

Tabla 5: Determinación de bioaccesibilidad de TCS en ejemplares de lechugas cultivados hidropónicamente expuestos a 1 y 3 días a SN con TCS.

Fase	Área PCB 28	Tiempo (min)	Área TCS	Tiempo (min)	Razón de área	Concentración muestra (µg/L)	Concentración mg/kg
G. blanco	7194	6,64	nd	-	-	-	-
G. blanco	6964	6,64	nd	-	-	-	-
G. blanco	6802	6,63	nd	-	-	-	-
G. blanco	6645	6,63	nd	-	-	-	-
I 1. blanco	6970	6,63	nd	-	-	-	-
I 1. blanco	7282	6,63	nd	-	-	-	-
I 1. blanco	6983	6,63	nd	-	-	-	-
I 1. blanco	7153	6,63	nd	-	-	-	-
I 2. blanco	7022	6,63	nd	-	-	-	-
I 2. blanco	7296	6,62	nd	-	-	-	-
I 2. blanco	7589	6,63	nd	-	-	-	-
I 2. blanco	7188	6,65	nd	-	-	-	-
G. 1 día	7012	6,63	2037	7,82	0,29	1,25	0,22
G. 1 día	6685	6,62	1797	7,83	0,30	1,30	0,24
G. 1 día	7100	6,63	2133	7,82	0,30	1,30	0,24
G. 1 día	6978	6,62	2142	7,82	0,31	1,33	0,25
I 1. 1 día	7016	6,62	2421	7,81	0,35	1,53	0,41
I 1. 1 día	7013	6,62	2437	7,81	0,35	1,54	0,42
I 1. 1 día	6886	6,62	2428	7,82	0,35	1,57	0,43
I 1. 1 día	7190	6,62	2854	7,82	0,40	1,80	0,55
I 2. 1 día	6876	6,66	2580	7,84	0,38	1,69	0,50
I 2. 1 día	6656	6,63	2567	7,83	0,39	1,74	0,52
I 2. 1 día	6225	6,63	2116	7,82	0,34	1,50	0,40
I 2. 1 día	6742	6,63	2301	7,84	0,34	1,51	0,41
G. 3 días	6904	6,64	1857	7,85	0,27	1,13	0,17
G. 3 días	6247	6,63	1557	7,84	0,25	1,03	0,13
G. 3 días	5195	6,63	1377	7,83	0,27	1,11	0,16
G. 3 días	5951	6,63	1454	7,84	0,24	1,01	0,12
I 1. 3 días	6894	6,62	2579	7,80	0,37	1,68	0,49
I 1. 3 días	7460	6,62	2888	7,81	0,39	1,75	0,52
I 1. 3 días	7238	6,62	3091	7,81	0,43	1,96	0,62
I 1. 3 días	8031	6,62	3579	7,80	0,45	2,06	0,67
I 2. 3 días	6090	6,63	1913	7,82	0,31	1,37	0,34
I 2. 3 días	6957	6,62	2502	7,81	0,36	1,61	0,45
I 2. 3 días	6024	6,63	1912	7,84	0,32	1,39	0,34
I 2. 3 días	6224	6,63	2102	7,84	0,34	1,49	0,40

Consideraciones: G (Fase gástrica), I 1 (Fase intestinal 1), I 2 (Fase intestinal 2).

Tabla 6: Concentraciones de triclosán pseudototal en ejemplares de rábano cultivados hidropónicamente expuestos a 1 y 2 días a SN con TCS.

Muestra	Área PCB 28	Tiempo (min)	Área TCS	Tiempo (min)	Razón áreas	Concentración muestra (µg/L)	Concentración mg/kg
Rábano blanco 1	3007	6,636	nd	-	-	-	
Rábano blanco 1	3999	6,639	nd	-	-	-	
Rábano blanco 1	3271	6,637	nd	-	-	-	
Raíz rábano blanco 1	7293	6,626	nd	-	-	-	
Raíz rábano blanco 1	7912	6,631	nd	-	-	-	
Raíz rábano blanco 1	7689	6,641	nd	-	-	-	
Rábano 1 día	7317	6,639	2783	7,83	0,38	1,72	0,82
Rábano 1 día	7987	6,638	2693	7,81	0,34	1,49	0,64
Rábano 1 día	8190	6,624	3636	7,80	0,44	2,05	1,09
Rábano 1 día	7921	6,623	3519	7,80	0,44	2,05	1,09
Rábano 1 día	8059	6,624	3433	7,80	0,43	1,95	1,01
Rábano 1 día	7987	6,36	3400	7,81	0,43	0,98	0,23
Raíz rábano 1 día	7911	6,65	7968	7,85	1,01	199	159
Raíz rábano 1 día	7069	6,63	16105	7,82	2,28	465	371
Raíz rábano 1 día	7540	6,63	17137	7,82	2,27	464	370
Raíz rábano 1 día	7497	6,62	16427	7,82	2,19	447	357
Raíz rábano 1 día	8390	6,63	17785	7,82	2,12	432	345
Raíz rábano 1 día	8257	6,63	16389	7,82	1,98	404	322
Rábano 2 días	6993	6,63	4911	7,81	0,70	3,40	2,17
Rábano 2 días	7016	6,62	3747	7,81	0,53	2,52	1,47
Rábano 2 días	7419	6,62	5288	7,80	0,71	3,45	2,21
Rábano 2 días	7442	6,62	4882	7,81	0,66	3,16	1,98
Rábano 2 días	6770	6,63	4190	7,81	0,62	2,96	1,82
Rábano 2 días	6799	6,63	4208	7,80	0,62	2,96	1,82
Raíz rábano 2 día	6942	6,64	57936	7,81	8,35	1734	1386
Raíz rábano 2 día	6498	6,63	45078	7,81	6,94	1439	1150
Raíz rábano 2 día	6608	6,63	46304	7,81	7,01	1454	1162
Raíz rábano 2 día	7245	6,63	47707	7,81	6,58	1365	1092
Raíz rábano 2 día	6841	6,63	45651	7,80	6,67	1384	1106
Raíz rábano 2 día	6733	6,63	44500	7,81	6,61	1371	1096

Tabla 7: Determinación de bioaccesibilidad de TCS en ejemplares de rábano cultivados hidropónicamente expuestos a 1 y 2 días a SN con TCS.

MUESTRA	Área PCB 28	Tiempo (min)	Área TCS	Tiempo (min)	Razón de área	Concentración muestra (ug/L)	Concentración mg/kg
G. blanco	7791	6,63	nd	-	-	-	-
G. blanco	7904	6,63	nd	-	-	-	-
G. blanco	7890	6,63	Nd	-	-	-	-
I 1. blanco	6862	6,63	Nd	-	-	-	-
I 1. blanco	6232	6,63	Nd	-	-	-	-
I 1. blanco	7268	6,63	Nd	-	-	-	-
I 2. blanco	6747	6,63	Nd	-	-	-	-
I 2. blanco	7379	6,63	Nd	-	-	-	-
I 2. blanco	7366	6,63	Nd	-	-	-	-
G. 1 día	6721	6,63	945	7,82	0,14	0,23	0,09
G. 1 día	6862	6,65	1378	7,82	0,20	0,39	0,22
G. 1 día	7012	6,63	2037	7,82	0,29	0,62	0,16
G. 1 día	6685	6,62	1797	7,83	0,27	0,57	0,13
I 1. 1 día	7100	6,63	2133	7,82	0,30	0,65	0,40
I 1. 1 día	6978	6,62	2142	7,82	0,31	0,67	0,41
I 1. 1 día	7016	6,62	2421	7,81	0,35	0,77	0,46
I 1. 1 día	7013	6,62	2437	7,81	0,35	0,77	0,46
I 2. 1 día	6886	6,62	2428	7,82	0,35	0,79	0,28
I 2. 1 día	7190	6,62	2854	7,82	0,40	0,90	0,34
I 2. 1 día	6876	6,66	2580	7,84	0,38	0,84	0,31
I 2. 1 día	6656	6,63	2567	7,83	0,39	0,87	0,33
G. 2 día	6742	6,63	2301	7,84	0,34	0,76	0,21
G. 2 día	6904	6,64	1857	7,85	0,27	0,57	0,13
G. 2 día	6247	6,63	1557	7,84	0,25	0,52	0,11
G. 2 día	5195	6,63	1377	7,83	0,27	0,56	0,13
I 1. 2 días	5551	6,63	1654	7,84	0,30	0,64	0,40
I 1. 2 días	6894	6,62	2579	7,80	0,37	0,84	0,42
I 1. 2 días	7460	6,62	2888	7,81	0,39	0,88	0,44
I 1. 2 días	7238	6,62	3091	7,81	0,43	0,98	0,60
I 2. 2 días	8031	6,62	3579	7,80	0,45	1,03	0,40
I 2. 2 días	6090	6,63	1913	7,82	0,31	0,69	0,23
I 2. 2 días	6957	6,62	2502	7,81	0,36	0,80	0,29
I 2. 2 días	6024	6,63	1912	7,84	0,32	0,69	0,24

Consideraciones: G (Fase gástrica), I 1 (Fase intestinal 1), I 2 (Fase intestinal 2).