

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE QUÍMICA
CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

Proyecto Final de Graduación para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería
Ambiental

**“Evaluación de riesgo toxicológico por el consumo de plastificantes BPA, DEHP y
DBP en especies seleccionadas de piangua (*Anadara tuberculosa*), jaiba (*Callinectes
arcuatus*) y corvina (*Cilus gilberti*)”**

Luis Alejandro Gómez Vargas

Cartago, mayo, 2022

“Evaluación de riesgo toxicológico por el consumo de plastificantes BPA, DEHP y DBP en especies seleccionadas de piangua (*Anadara tuberculosa*), jaiba (*Callinectes arcuatus*) y corvina (*Cilus gilberti*)”

Informe presentado a la Escuela de Química del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar por el título de Ingeniero Ambiental con el grado de licenciatura

Miembros del tribunal

PhD. Virginia Montero Campos
Director

Lic. Adrián Flores Cantillo
Lector 1

Máster Eric Romero Blanco
Lector 2

Dra. Mary Luz Barrios Hernández
Coordinadora COTRAFIG

MGA. Ricardo Coy Herrera
Director Escuela de Química

M.Sc. Diana A. Zambrano Piamba
Coordinadora Carrera de Ingeniería Ambiental



Attribution-NonCommercial 4.0 International

DEDICATORIA

A mis padres Alejandra y Carlos,
a mis abuelitas Liliana y Mireya,
y a mí mismo,
Este logro es nuestro.

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A mi niño interior apasionado por el océano y la vida marina.

A mis padres Carlos y Alejandra que siempre me han impulsado soñar en grande y ser una mejor versión de mí mismo cada día.

A mi abuelita Lilliana (RIP) que me amó y alimentó durante mi etapa universitaria.

A mi abuela Mireya por su amor y apoyo incondicional desde siempre.

A mi hermana y hermanos: Priscilla, Sebastián y Daniel.

A mi tutor Adrián Flores, quién siempre estuvo apoyándome sin importar la hora ni el momento, por ser un guía excepcional durante todo este proceso.

A mis tutores excepcionales del TEC: Josué Valladares, Javier Montero, Eric Romero y Diana Zambrano.

A mis amigos: Josefina, Melany, Rodrigo y Nicolás, por ser mi segunda familia y gran apoyo durante mi etapa universitaria.

A Sharon Ulate, Angélica Astorga y Fausto Arias, por ser un gran apoyo durante el desarrollo de la investigación.

A mi tutora Virginia Montero, por impulsarme a desarrollar habilidades que voy a seguir utilizando en mi vida personal y profesional.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. <i>Objetivo general</i>	2
2.1.1. Objetivos específicos	2
3. REVISIÓN DE LITERATURA	3
3.1. <i>Generalidades de la producción de plástico</i>	3
3.2. <i>Generalidades y comportamiento del microplástico</i>	3
3.3. <i>Plastificantes</i>	5
3.3.1. Bisfenol A	6
3.3.2. Ftalato de bis (2-etilhexilo)	6
3.3.3. Ftalato de dibutilo	7
3.4. <i>Generalidades del golfo de Nicoya</i>	7
3.4.1. Especies extraídas del golfo de Nicoya	8
3.4.1.1. Piangua	8
3.4.1.2. Jaiba	8
3.4.1.3. Corvina	8
3.5. <i>Validación de una metodología</i>	9
3.5.1. Linealidad	9
3.5.2. Límite de detección (LD)	9
3.5.3. Límite de cuantificación (LC)	9
3.5.4. Exactitud	10
3.5.5. Intervalo de trabajo	10
3.6. <i>Métodos de extracción, limpieza y cuantificación</i>	10
3.6.1. Método de extracción y limpieza: tubos QuEChERS	10
3.6.2. Método de cuantificación: Cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (GC - MS)	11
3.7. <i>Evaluación de riesgo toxicológico</i>	13
3.7.1. Identificación del peligro	13
3.7.2. Evaluación dosis - respuesta	13

3.7.3.	Evaluación de la exposición	14
3.7.4.	Caracterización del riesgo	14
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1.	Área de estudio	15
4.2.	Muestreo	15
4.3.	Validación de una metodología	<i>¡Error! Marcador no definido.</i>
4.4.	Materiales y equipo	18
4.5.	Reactivos y disoluciones	18
4.5.1.	Reactivos	18
4.5.2.	Disoluciones	19
4.5.2.1.	Disolución madre de BPA (386.10 ± 0.48) $\mu\text{g/mL}$	19
4.5.2.2.	Disolución intermedia de BPA (38.61 ± 0.10) $\mu\text{g/mL}$	19
4.5.2.3.	Disolución de trabajo de BPA (4.63 ± 0.02) $\mu\text{g/mL}$	19
4.5.2.4.	Disolución madre de DEHP (400.40 ± 0.29) $\mu\text{g/mL}$	19
4.5.2.5.	Disolución madre de DBP (325.35 ± 0.28) $\mu\text{g/mL}$	20
4.5.2.6.	Disolución de trabajo de los ftalatos: DEHP (2.00 ± 0.23) $\mu\text{g/mL}$ y DBP (2.00 ± 0.18) $\mu\text{g/mL}$	20
4.5.2.7.	Disolución de acetonitrilo en ácido acético (1%)	20
4.6.	Curvas de calibración	20
4.6.1.	Curva de calibración para BPA	20
4.6.2.	Curva de calibración para los ftalatos DEHP y DBP.	21
4.7.	Procedimiento	21
4.7.1.	Preparación de la muestra de piangua	21
4.7.2.	Preparación de la muestra de jaiba	22
4.7.3.	Preparación de la muestra de corvina	22
4.7.4.	Extracción por QuEChERS para análisis de BPA	22
4.7.5.	Extracción por QuEChERS para análisis de ftalatos (DEHP y DBP)	22
4.7.6.	Cuantificación por GC – MS	23
4.7.7.	Condiciones del equipo de GC-MS para la metodología de detección de BPA	23
4.7.8.	Condiciones del equipo de GC-MS para la metodología de detección de ftalatos (DEHP y DBP)	24
4.7.9.	Determinación de tiempo de retención de los analitos	24

4.7.10.	Determinación de las transiciones de cada analito	25
4.8.	<i>Características de desempeño</i>	25
4.8.1.	Determinación de linealidad	25
4.8.2.	Determinación de límites de detección	25
4.8.3.	Determinación de límites de cuantificación	26
4.8.4.	Determinación de exactitud	26
4.9.	<i>Expresión de resultados</i>	27
4.9.1.	Cálculo de concentración de analito ($\mu\text{g/g}$ de muestra)	27
4.10.	<i>Reporte de resultados</i>	27
4.11.	<i>Cálculo de incertidumbre</i>	28
4.12.	<i>Análisis de riesgo toxicológico</i>	29
4.12.1.	Cálculo de ingesta diaria.	30
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
5.1.	<i>Tiempo de retención de los analitos BPA, DEHP y DBP</i>	30
5.2.	<i>Parámetros de desempeño calculados</i>	31
5.2.1.	Linealidad	33
5.2.2.	Límite de detección y límite de cuantificación	31
5.2.3.	Exactitud	32
5.3.	<i>Mejoras en la metodología para cuantificar BPA, DEHP y DBP en tejido de especies marinas</i>	36
5.4.	<i>Resultados de presencia de BPA, DEHP y DBP en especies marinas de consumo</i>	38
5.5.	<i>Evaluación preliminar de riesgo toxicológico asociado al consumo de piangua, jaiba y corvina.</i> ³⁹	
6.	CONCLUSIONES	43
7.	RECOMENDACIONES	43
8.	REFERENCIAS	45
9.	APÉNDICES	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representación gráfica con color blanco de 5.25 trillones de partículas de plástico en las aguas superficiales del océano global. Fuente: Eriksen et al. (2019).....	5
Figura 2. Representación esquemática del sistema GC-MS. Tomado de Wu et al. (2012) .	12
Figura 3. Mapa del golfo de Nicoya. Tomado de Rodríguez et al. (2015).....	15
Figura 4. Diagrama de Ishikawa de las fuentes de incertidumbre más significativas en la cuantificación de BPA, DEHP y DBP.....	28
Figura 5. Curva de calibración de BPA.....	34
Figura 6. Curva de calibración de DEHP	35
Figura 7. Curva de calibración de DBP.....	35

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Distribución de muestras de piangua (<i>Anadara tuberculosa</i>) recolectadas en el Golfo de Nicoya.	16
Cuadro 2. Distribución de muestras de jaiba (<i>Callinectes arcuatus</i>) recolectadas en el Golfo de Nicoya.	17
Cuadro 3. Distribución de muestras de corvina (<i>Cynoscion stolzmanni</i>) recolectadas en el Golfo de Nicoya.	17
Cuadro 4. Preparación de curva de calibración para BPA.	20
Cuadro 5. Preparación de curva de calibración para DEHP y DBP.	21
Cuadro 6. Condiciones instrumentales del método de BPA.	23
Cuadro 7. Condiciones instrumentales del método de ftalatos DEHP y DBP.	24
Cuadro 8. Criterios para reportar los analitos en estudio.	28
Cuadro 9. Aportes a la incertidumbre de los resultados de BPA.	29
Cuadro 10. Aportes a la incertidumbre de los resultados de DEHP.	29
Cuadro 11. Aportes a la incertidumbre de los resultados de DBP.	29
Cuadro 12. Tiempos de retención de los analitos en estudio.	31
Cuadro 13. Límites de detección obtenidos con el criterio de aceptabilidad respectivo.	32
Cuadro 14. Límites de cuantificación obtenidos con el criterio de aceptabilidad respectivo.	32
Cuadro 15. Pruebas de recuperación para el compuesto BPA.	32
Cuadro 16. Pruebas de recuperación para el compuesto DEHP.	33
Cuadro 17. Pruebas de recuperación para el compuesto DBP.	33
Cuadro 18. Pruebas de la metodología de detección de BPA en tejido de especies marinas de consumo.	36
Cuadro 19. Pruebas de optimización del método para DEHP.	37
Cuadro 20. Pruebas de optimización del método para DBP.	38
Cuadro 21. Resultados encontrados en muestras compuestas de piangua.	39
Cuadro 22. Dosis preliminar asociada al consumo de especies marinas en estudio.	40

LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

EFSA	European Food Safety Authority
BPA	Bisfenol A
DEHP	Ftalato de bis (2-etilhexilo)
DBP	Ftalato de dibutilo
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
CEQIATEC	Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos
GC-MS	Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas
dSPE	Extracción en fase sólida dispersiva
LD	Límite de detección
LC	Límite de cuantificación
NC	No cuantificable
r^2	Índice de determinación o índice de correlación al cuadrado
TDI	Ingesta Diaria Tolerable
LMP	Límite Máximo Permitido
SML	Límite de Migración Específico

RESUMEN

Actualmente en Costa Rica se desconoce el riesgo de ingesta de plastificantes en especies marinas de consumo. Con el propósito de valorar la pertinencia de un método analítico que permitiera determinar este riesgo, se realizó la validación de dos metodologías de cuantificación de plastificantes: una para bisfenol A (BPA) y otra enfocada en los ftalatos ftalato de bis (2-etilhexilo) (DEHP) y ftalato de dibutilo (DBP). Estos compuestos tienen un efecto potencial o probado como disruptores endocrinos. Los métodos validados se utilizaron para obtener preliminarmente las concentraciones en muestras provenientes del Golfo de Nicoya, específicamente en especies marinas de consumo popular: piangua (*Anadara tuberculosa*), jaiba (*Callinectes arcuatus*) y corvina (*Cilus gilberti*). La metodología incluyó una primera etapa de extracción realizada mediante tubos QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) y una segunda etapa de cuantificación utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) del Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQIATEC). Se encontraron concentraciones asociadas a los tres analitos en las tres especies en estudio. A partir de estas, se calcularon las dosis de ingesta y luego de una evaluación de riesgo toxicológico se determinó que ninguno de los casos sobrepasa las dosis de ingestas diarias tolerables (TDI) establecidas por la European Food Safety Authority (EFSA). Este es el primer estudio de cuantificación de plastificantes desarrollado en el país, abriendo la posibilidad de realizar más estudios a futuro que generen datos sobre la presencia de estos contaminantes en especies marinas de consumo.

Palabras clave: plastificantes, bisfenol A, ftalato de bis (2-etilhexilo), ftalato de dibutilo, cromatógrafo de gases, espectrómetro de masas, evaluación de riesgo toxicológico.

ABSTRACT

Currently, in Costa Rica, the risk of ingestion of plasticizers in marine species for consumption is unknown. To assess the relevance of an analytical method to determine this risk, two plasticizer quantification methodologies were validated: one for bisphenol A (BPA) and the other focused on bis(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and dibutyl phthalate (DBP). These compounds have a potential or proven effect as endocrine disruptors. The validated methods were used to preliminarily obtain the concentrations in samples from the Gulf of Nicoya, specifically in marine species of popular consumption: mud cockle (*Anadara tuberculosa*), blue crab (*Callinectes arcuatus*) and corvina drum (*Cilus gilberti*). The methodology added a first cleaning and extraction stage using QuEChERS tubes (Quick, Easy, Cheap, Effect, Rugged and Safe) and a second quantification stage using a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GC-MS) from the Center for Research and Chemical and Microbiological Services (CEQIATEC). Concentrations associated with the three analytes were found in the three species under study. From these, the intake doses are calculated and after a toxicological risk assessment it is limited that none of the cases exceeded the Tolerable Daily Intake (TDI) doses established by the European Food Safety Authority (EFSA). This is the first study of quantification of plasticizers developed in the country, opening the possibility of carrying out more studies in the future that generate data on the presence of these contaminants in marine species of consumption.

Key words: plasticizers, bisphenol A, bis (2-ethylhexyl) phthalate, dibutyl phthalate, gas chromatograph, mass spectrometer, toxicological risk assessment.

1. INTRODUCCIÓN

La presencia de plásticos en el océano es una de las problemáticas ambientales más complejas que enfrentamos actualmente. La afectación a los ecosistemas marinos varía según el tamaño y composición del material. La fragmentación del plástico en el océano puede llegar a formar microplásticos de tamaños tan diminutos que pueden ser ingeridos por el zooplancton (Sarria & Gallo, 2016). Una característica particular de los microplásticos en el océano es que pueden servir como portadores para la dispersión de sustancias contaminantes de la actividad humana, así como de aditivos propios del material (Cverenkárová et al., 2021).

La ingesta de microplásticos por especies marinas puede provocar una liberación de aditivos como plastificantes debido a los procesos digestivos y enzimáticos. Estos procesos facilitan la exposición y transferencia hacia el tejido de los organismos (Koelmans, 2015). Se dice que la ingesta de alimentos es la ruta de exposición del ser humano más habitual a plastificantes, los cuales pueden llegar a provocar efectos nocivos como disrupción endocrina (Yang et al., 2007). El desarrollo de metodologías que permitan detectar estos plastificantes en alimentos marcan un inicio para determinar el riesgo de exposición.

La técnica de GC-MS para la detección de compuestos en bajas concentraciones es una gran opción por su alta sensibilidad (Amirav et al., 2013). Esta técnica ha sido utilizada anteriormente en la detección de diferentes plastificantes como BPA (Adeyi & Babalola, 2019), DEHP y DBP (Xu et al., 2018) en alimentos.

Para la determinación del riesgo asociado a la ingesta de los plastificantes: BPA, DEHP y DBP en especies marinas, fue seleccionado el golfo de Nicoya como sitio de muestreo. Este golfo se caracteriza por ser la zona de mayor aprovechamiento pesquero del país, debido a su gran riqueza marina (Fernández, 2013). Se utilizó la técnica de GC-MS como la opción más viable para la cuantificación de los tres analitos en tres grupos de especies marinas de consumo: moluscos, crustáceos y peces, para los cuales se seleccionaron las especies: piangua (*Anadara tuberculosa*), jaiba (*Callinectes arcuatus*) y corvina (*Cilus gilberti*), respectivamente. Los resultados permitieron evaluar el riesgo toxicológico asociado a la ingesta de estas especies y generar una base metodológica para futuros estudios.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Determinar la presencia y evaluar el riesgo por consumo de los plastificantes BPA, DEHP y DBP en especies escogidas de corvina, piangua y jaiba provenientes del golfo de Nicoya.

2.1.1. Objetivos específicos

- Validar la metodología necesaria para la detección de los plastificantes BPA, DEHP y DBP en especies marinas escogidas.
- Cuantificar la concentración de BPA, DEHP y DBP presentes en muestras escogidas de corvina, piangua y jaiba.
- Aplicar la metodología de evaluación de riesgo toxicológico para la ingesta de muestras escogidas de corvina, piangua y jaiba.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Generalidades de la producción de plástico

El plástico es un material que ha trascendido a lo largo de la historia de la humanidad. En los años 1800 se registraron los primeros materiales fabricados de manera artificial (Katz et al., 2014). Durante la Segunda Guerra Mundial, el plástico fue utilizado como un “material secreto” al poseer propiedades ventajosas para el diseño de artefactos de batalla, como consecuencia su proceso de fabricación se volvió popular alrededor del mundo (Wearbeard, 2017).

Este material sintético se forma a partir de monómeros y otras sustancias derivadas del petróleo. Mediante una reacción química se da el entrecruzamiento de los monómeros, formando cadenas de unidades monoméricas denominadas polímeros (Bilbao, 2015). Las propiedades tales como la forma, el tamaño, la textura y el color son definidas a partir de aditivos como los plastificantes, que permiten esa flexibilidad en el diseño de cada tipo de plástico (Rahman & Brazel, 2004). Esta versatilidad ha permitido satisfacer las demandas del mercado respecto a cualquier composición para usos específicos. El plástico ha llegado a ser un componente esencial en todo tipo de objetos y materiales por sus características, tales como: versatilidad, flexibilidad, moldeabilidad, ligerabilidad, impermeabilidad, resistencia y bajo precio (Ondarse, 2021). Su uso ha llegado a ser tan importante que actualmente casi todo artículo fabricado por el hombre posee algún componente o pieza de plástico. Para el año 2018, se reportó la producción mundial de alrededor de 360 millones de toneladas de plástico (PlasticsEurope, 2019), del cual se estima que más del 50% termina en el medio ambiente debido a un mal manejo; y aproximadamente entre 4.8 y 12.7 millones de toneladas métricas acaban en los ecosistemas marinos (Solomon et al., 2018).

3.2. Generalidades y comportamiento del microplástico

La degradación de los plásticos en ambientes marinos puede clasificarse en dos mecanismos: el físico, que hace referencia a cambios generales en la estructura, como agrietamiento, fragilización y descamación, o el mecanismo químico: que se refiere a cambios a nivel molecular, como ruptura de enlaces u oxidación de largas cadenas de polímeros (Gewert et al., 2015). Por otra parte, la velocidad de degradación del plástico depende tanto de las

propiedades intrínsecas del material: tipo de polímero, masa molecular, cargas, etc. como de las propiedades externas: el tamaño y la forma del material (Chamas et al., 2020). Además, los factores ambientales cumplen un papel importante en la ruta de degradación del plástico, tales como: la sal marina, los rayos UV del sol y la acción de las olas que, por la abrasión, genera una serie de roturas que luego se convierten en fracturas, lo que eventualmente conduce a la fragilidad del plástico (Corcoran et al., 2009).

Los microplásticos según el origen se clasifican como primarios cuando se fabrican originalmente en tamaño pequeño y secundarios si están fragmentados a partir de artículos de plástico más grandes (GESAMP, 2016). Por otra parte, según el tamaño el microplástico se define como partículas de plástico con un diámetro menor a 5 mm (Lehtiniemi et al., 2018; Moore, 2008). Sin embargo, existe un gran debate sobre cuál es el tamaño correcto, lo cual es un gran reto al momento de realizar mediciones y reportar resultados de investigación sobre partículas de tamaño pequeño (Zeng, 2018). Autores como Costa et al. (2010) y van Cauwenberghe et al. (2013) sugieren que una clasificación más intuitiva es definir todo plástico como “pequeño” al que tenga un diámetro mayor que 1 mm, pero menor que 20 mm, y el término microplástico asociarlo con aquel que posea un tamaño menor que 1 mm. Otro concepto importante que destacar son los nanoplásticos, que se definen como “una subfracción de microplásticos con tamaños iguales o inferiores a 100 nm en al menos, una dimensión” (Ekvall et al., 2019).

La degradación del plástico en el océano ha llegado a dar como resultado partículas tan pequeñas y en cantidades tan grandes que se ha formado un “smog plástico”, llamado así por su comportamiento similar a las partículas de carbono en el aire de las ciudades; siendo un hidrocarburo que se distribuye por las corrientes oceánicas y se instala lentamente en el fondo marino (Eriksen et al., 2016). La Figura 1 representa con color blanco el smog plástico presente de manera superficial en los océanos del planeta.

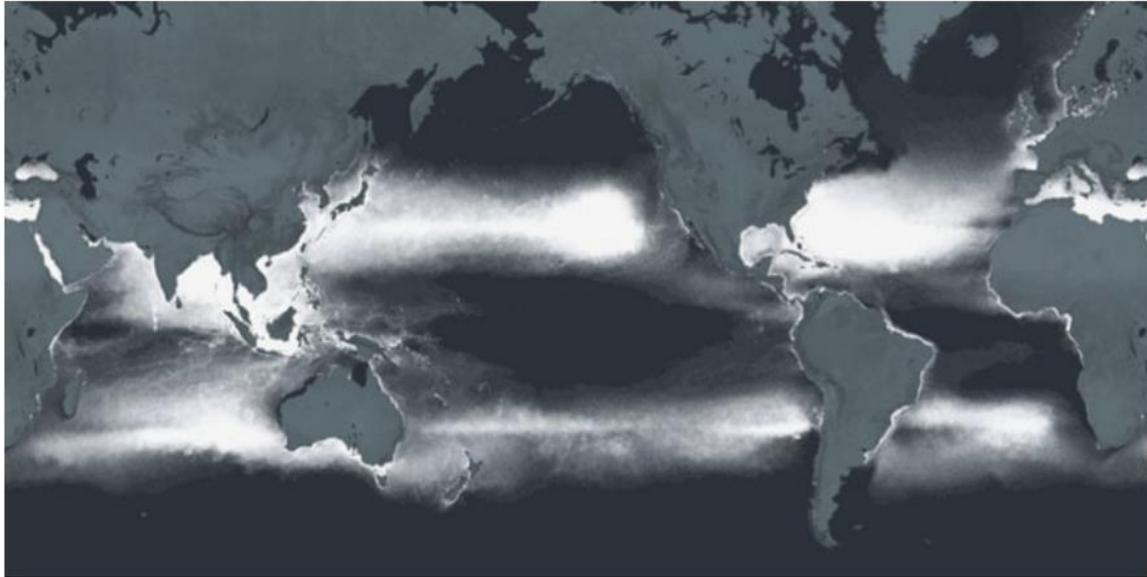


Figura 1. Representación gráfica con color blanco de 5.25 trillones de partículas de plástico en las aguas superficiales del océano global. Fuente: Eriksen et al. (2019).

El flujo hidrodinámico de los océanos es un factor fundamental en la dispersión de los residuos plásticos por todo el planeta. Las corrientes superficiales en las zonas costeras permiten el transporte de los microplásticos desde la costa hasta mar abierto (H. Zhang, 2017). En mar abierto, modelos de circulación oceánica sugieren como posibles regiones de acumulación a los cinco giros oceánicos subtropicales (Maximenko et al., 2012). Estos giros son sistemas a gran escala de corrientes superficiales que son impulsadas por el viento, creando movimientos ciclónicos atmosféricos y oceánicos Eriksen et al. (2016).

3.3. Plastificantes

Entre los aditivos del plástico, uno de los más esenciales son los plastificantes. Según el Consejo de la IUPAC, pueden definirse como “una sustancia que se incorpora a un material plástico o elastómero para aumentar su flexibilidad y facilitar su transformación”.

Los plastificantes son aditivos utilizados en la industria del plástico para darle suavidad y flexibilidad al material (Godwin, 2011). Compuestos por cadenas de carbono lineales o cíclicas de 14 a 40 carbonos y con masas moleculares entre 300 y 600 le permite ocupar espacios intermoleculares entre las cadenas poliméricas, y cambiar la organización tridimensional formando puentes de hidrógeno (Gurgel Adeodato Vieira et al., 2011).

3.3.1. Bisfenol A

El BPA (ver Apéndice 1: Figura A 1.1) es una sustancia química utilizada fundamentalmente como estabilizador en la producción de plástico de policarbonato y resinas epoxi. Es uno de los productos químicos industriales más comúnmente producidos en todo el mundo (Vandenberg et al., 2007). Se proyecta que el mercado global de BPA sea más de 7 000 000 toneladas para finales del año 2023 (Research and Markets, 2018). Los plásticos fabricados con BPA incluyen envases de bebidas y alimentos, juguetes, anteojos, computadoras, electrodomésticos, equipo médico, equipos de seguridad y papel de recibo. Las resinas epoxi se utilizan en trabajos dentales y recubrimientos metálicos para latas de alimentos, tuberías, automóviles, equipos de oficina y otros (Rubin, 2011).

Existe un debate actual sobre la toxicidad del BPA y sus efectos. Entre los efectos a la exposición prolongada se encuentran los cambios epigenéticos, daños en el ADN y la disrupción endocrina (Jalal et al., 2017). De acuerdo con estudios toxicocinéticos en humanos (Park et al., 2016) el BPA es excretado casi completamente por la orina luego de 24 h de exposición. Sin embargo, existe un riesgo potencial principalmente sobre el sistema reproductor y en las mujeres embarazadas. Estudios han evidenciado efectos negativos sobre las células de la placenta y el útero (Manzan-Martins & Paulesu, 2021), deteriorando así su desarrollo óptimo. También se han realizado estudios que asocian la exposición al BPA con riesgo a partos prematuros (Namat et al., 2021). Uno de los productos de la degradación del bisfenol A más persistentes en el agua que ha sido reportado es el 2,2 bis (4-hidroxifenil) 1 propanol-A (Drzewiecka et al., 2021). Según el decreto N° 35904-S publicado por La Gaceta en el 2010, se encuentra prohibido el uso del BPA en la fabricación de biberones y otros envases dedicados a la alimentación de la niñez en Costa Rica.

3.3.2. Ftalato de bis (2-etilhexilo)

El DEHP (Apéndice 1: Figura A 1.2) es utilizado principalmente como plastificante en la producción de productos a base de vinilo (revestimientos de paredes, guantes de vinilo, baldosas, conos de tráfico, moquetas, manteles, tapicería de muebles, cortinas de baño, mangueras de jardín, etc.), dispositivos médicos (por ejemplo, bolsas para embalaje de sangre, tubos médicos) y materiales de construcción (ATSDR, 2001).

Se ha reportado en bagre (*pseudobagrus fulvidraco*) que concentraciones de DEHP de 100, 500, y 1000 mg/kg inhiben la actividad acetilcolinesterasa (AChE) en el hígado, las branquias, los riñones, el corazón, el cerebro, los músculos y los tejidos oculares (Jee et al., 2009).

3.3.3. Ftalato de dibutilo

El DBP (Apéndice 1: Figura A 1.3) es un contaminante ambiental ubicuo que representa un riesgo para los humanos. Tiene un papel como contaminante ambiental, agente teratogénico y es ampliamente utilizado como plastificante. En la década de los 90, más del 75% del DBP se utilizaba como plastificante en plásticos como el PVC, el otro 25% se utilizaba en la fabricación de selladores y lechadas utilizados tanto en la construcción como en productos de consumo. También se utiliza como aditivo en perfumes, desodorantes, fijadores de pelo, esmalte de uñas, tintas de impresión e insecticidas. Junto con el DEHP, son de los plastificantes más predominantes y frecuentemente detectados en los sedimentos costeros (Zhang et al., 2018).

3.4. Generalidades del golfo de Nicoya

Es uno de los estuarios más grandes de América Central, donde su entrada está limitada por la Reserva Natural Absoluta Cabo Blanco y Punta Judas (Castro & Jiménez, 2021). Esta región ha sido el punto de mayor desarrollo de la pesca artesanal debido a su gran riqueza marina. Se estima que entre el 50% y el 70% de la actividad pesquera del país proviene de sus aguas (Fernández, 2013). El río Tempisque es uno de los puntos de mayor influencia sobre el golfo, al provenir de zonas agrícolas y ganaderas existe la posibilidad de que sus aguas lleguen cargadas de contaminantes. Sin embargo, Ballesteros et al., (2018) mencionan que las condiciones oceanográficas de circulación, hidrografía y calidad de agua dentro del golfo lo convierten en un sistema con un gran potencial de dilución y remoción de contaminantes que podrían ser transportados dentro y fuera del estuario. Estas particularidades del golfo de Nicoya lo convierten en un excelente sitio de investigación sobre la influencia antropogénica en los ecosistemas marinos.

3.4.1. Especies extraídas del golfo de Nicoya

3.4.1.1. Piangua

La piangua (*Anadara tuberculosa*), es un molusco bivalvo de la familia Arcidae (ver Apéndice 2: Figura A 2.1). Se puede localizar en la parte externa de los manglares del Pacífico de Costa Rica siendo uno de los principales animales marinos consumidos y comercializados en el Golfo de Nicoya y el Golfo Dulce (Arguedas et al., 2014; Quesada & Cortés, 2006), lo cual representa un valor importante para la comunidad pesquera. Se ha encontrado que su alimentación se da por medio de filtración de materia orgánica del medio, esto lo que le permite actuar como un filtro natural de los ecosistemas marinos (Santos, 2014). Por otra parte, un estudio realizado en las costas de Nicaragua por Aguirre et al. (2019) resalta la utilización de esta especie como biomonitor de índices de contaminación debido a su capacidad de acumular metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y contaminantes orgánicos persistentes (COPs) en su tejido.

3.4.1.2. Jaiba

La jaiba (*Callinectes arcuatus*), es una especie de cangrejo de natación de la familia *Portunidae* (ver Apéndice 2: Figura A 2.2) que vive a lo largo de la costa del Pacífico de América Central. Un estudio realizado por (Vargas-Zamora et al., 2019) en el golfo de Nicoya encontró la presencia de esta especie en un 50% o más de las 20 estaciones de la expedición. Gran parte de la captura nacional proviene del trasmallo que se realiza en el golfo de Nicoya bajo la modalidad de pesca incidental (MarViva, 2012). Esta especie ha sido utilizada en el campo científico para el estudio de la relación entre la bioacumulación de mercurio y factores ambientales (Esteban Gamboa-García et al., 2020).

3.4.1.3. Corvina

La corvina (*Cilus gilberti*) (Apéndice 2: Figura A 2.3) es una especie de la familia Sciaenidae que nada cerca de las costas hasta los 50 m de profundidad, y habita fondos arenosos o fangosos. (Chero et al., 2014). Es una especie carnívora, que se alimenta principalmente de crustáceos y peces pequeños (Cárdenas, 2012). Es uno de los grupos de especies de mayor

importancia comercial en el Golfo de Nicoya y se ha demostrado que presentan una reproducción prolongada durante todo el año (Marín & Alfaro, 2019).

3.5. Validación de una metodología

La validación de un método permite demostrar que los resultados producidos por un procedimiento analítico son fiables y reproducibles, y que se ajusta al propósito para el que fue desarrollado (Magnusson & Örnemark, 2014). Para obtener esta afirmación sobre los resultados se determinan ciertas características que definen su desempeño como técnica analítica. Estas características incluyen exactitud, precisión, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad e intervalo de trabajo (Bliesner, 2006). A su vez, cada característica de desempeño cuenta con ciertos criterios de aceptabilidad específicos que determinan si un método analítico es adecuado para la finalidad perseguida y ofrece resultados confiables.(Duffau et al., 2010). Entre los parámetros de desempeño se encuentran:

3.5.1. Linealidad

Se refiere a la posible relación lineal entre señales instrumentales y concentración del analito dentro de un rango establecido. Esta relación es medida por medio del comportamiento de las curvas de calibración (Boris Duffau et al., 2010).

3.5.2. Límite de detección (LD)

Se refiere a la concentración más baja del analito que puede ser detectada por el método a un nivel de confianza especificado. (Eurachem/CITAC, 2016). Cuando una muestra tiene una concentración mayor al LD el equipo da una señal analítica por la presencia del analito.

3.5.3. Límite de cuantificación (LC)

Se define como la concentración más baja de analito que se puede determinar con un nivel aceptable de incertidumbre y, por lo tanto, se puede establecer arbitrariamente como el extremo inferior requerido del rango de trabajo del método (Eurachem/CITAC, 2016).

Al analizar una muestra con una concentración mayor al LC el equipo puede detectar la presencia y cuantificar de forma exacta el analito. Si la concentración de la muestra se

encuentra entre el LD y LC se afirma que hay presencia del analito, pero no se puede cuantificar de forma exacta porque la incertidumbre es muy grande, es decir, es detectable, no cuantificable (NC).

3.5.4. Exactitud

Se expresa como el grado de concordancia entre el valor de referencia aceptado y el valor encontrado (FAO/OMS, 2015). El concepto de exactitud supone que las mediciones se realizan de acuerdo con el procedimiento documentado y que no se incluyen los efectos de los 'errores groseros' o equivocaciones (Eurachem/CITAC, 2016).

3.6. Intervalo de trabajo

Se refiere al intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. El extremo inferior del intervalo de trabajo está determinado por el LC y el extremo superior está definido por las concentraciones a las cuales se ha sido demostrado que puede ser determinado con la precisión y exactitud requeridas para una determinada matriz (Boris Duffau et al., 2010; Eurachem/CITAC, 2016).

3.7. Métodos de extracción, limpieza y cuantificación

3.7.1. Método de extracción y limpieza: tubos QuEChERS

El método QuEChERS es un sistema de extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) que consta de dos etapas, una primera etapa de extracción simple seguida de una fase de limpieza mediante extracción en fase sólida por dispersión (Fuentes López et al., 2015).

En la primera etapa, se realiza una extracción con un disolvente orgánico, generalmente acetonitrilo, en presencia de diferentes sales que cumplen diferentes funciones:

- Sulfato de magnesio ($MgSO_4$): gracias a que retiene agua mejora la recuperación del analito al facilitar la partición en la fase orgánica (acetonitrilo).
- Cloruro sódico ($NaCl$): ayuda a controlar la polaridad favoreciendo la separación de fases entre el contenido de agua y la orgánica.

La segunda etapa de este procedimiento corresponde a una limpieza del extracto mediante la extracción en fase sólida dispersiva. Este paso facilita la eliminación de agua residual y de

los compuestos presentes en la matriz del alimento que podrían provocar interferencias en el análisis, como los lípidos, azúcares, ácidos orgánicos y pigmentos (Fuentes López et al., 2015). Las sales y sorbentes empleados en esta fase son:

- Sulfato de magnesio (MgSO₄): elimina el exceso de agua residual.
- Amina primaria/secundaria (PSA): elimina ácidos orgánicos, ácidos grasos, azúcares y pigmentos de antocianina.
- Sorbente C18: elimina grasas, esteroides y otras interferencias no polares de la muestra.
- Carbón negro grafitado (GCB): elimina pigmentos de la muestra como clorofilas y carotenoides.

3.7.2. Método de cuantificación: Cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas (GC - MS)

La cromatografía de gases es una técnica analítica que permite separar e identificar compuestos químicos contenidos en una mezcla. Tal como se muestra en la Figura 2, el GC-MS consta de un puerto de inyección de muestra que puede ser manual o automático, una columna capilar dentro de un horno y un detector de masas conectado a un procesador de datos.

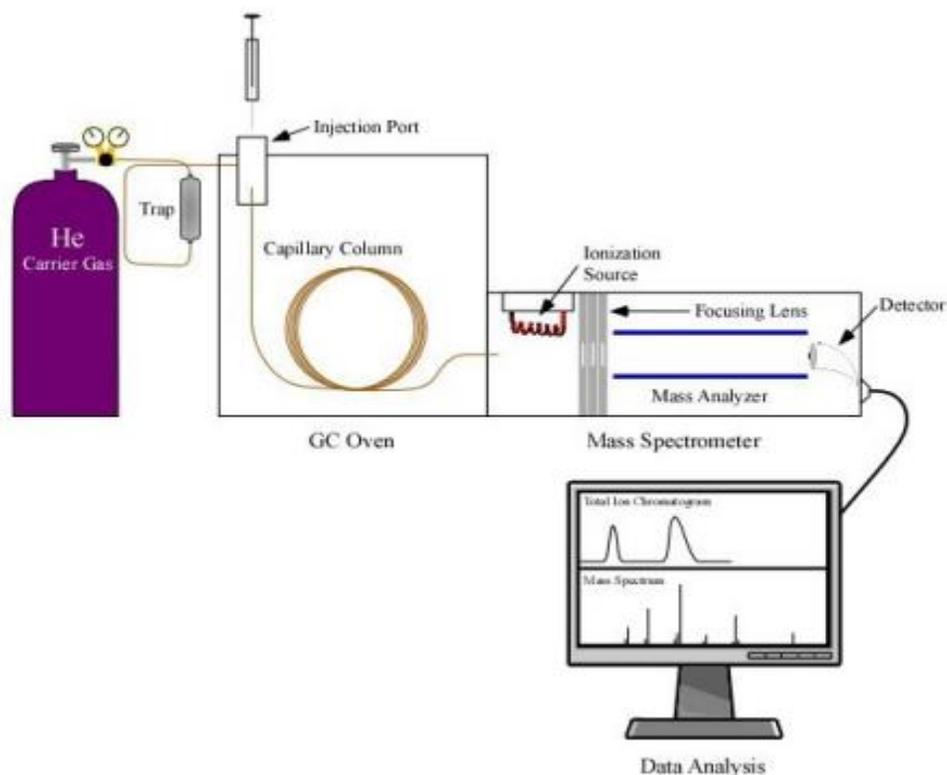


Figura 2. Representación esquemática del sistema GC-MS. Tomado de Wu et al. (2012)

La disolución de muestra preparada se inyecta en la entrada del GC, donde se vaporiza y el gas de arrastre la transporta hacia la columna. El gas de arrastre o fase móvil, como el helio (He), el nitrógeno (N₂) o el hidrógeno (H₂), se suministran a una velocidad de flujo constante (Shimadzu, 2020). La muestra fluye a través de la columna y los compuestos que componen la mezcla de interés se separan en virtud de su interacción relativa con el revestimiento de la columna (fase estacionaria) y el gas de arrastre. La separación dentro del sistema GC se da por la temperatura. Un GC típico comenzará con una temperatura baja de 100-150 °C y aumentará la temperatura a 5-20 °C por minuto hasta alcanzar la temperatura final, a menudo 300-400 °C. Luego, el sistema debe enfriarse y estar listo para la siguiente muestra. Esto pone un límite práctico de alrededor de 3 a 6 muestras por hora (Evers, 2015).

Posteriormente, ingresan a una fuente de iones, donde los compuestos que eluyen de la columna se convierten en iones. Luego, los iones se separan en un analizador de masas. Estas separaciones consecutivas se denominan transiciones, y cada compuesto tiene posee sus transiciones específicas que permiten identificarlo. Después de eso, los iones ingresan a un

detector cuya salida se amplifica para aumentar la señal. El detector envía información a una computadora que registra todos los datos producidos y se genera el cromatograma. (Wu et al., 2012). El tiempo transcurrido entre la introducción de la muestra (comienzo del cromatograma) y la señal máxima del analito en el detector se denomina tiempo de retención (Nagy & Vékey, 2008).

3.8. Evaluación de riesgo toxicológico

Una definición de riesgo es “la probabilidad de que ocurra un efecto en la salud después de que una persona haya estado expuesta a una cantidad específica de algo peligroso” (UNISDR, 2011). La evaluación de riesgo es un proceso de recaudación de información sobre los efectos tóxicos de una sustancia específica y así, concluir el riesgo posible relacionado directamente a la exposición (ATSDR, 2019). Torres & Bobst (2015) detallan las etapas para realizar una evaluación de riesgo toxicológico de manera resumida:

3.8.1. Identificación del peligro

La identificación de peligros implica identificar los contaminantes que se sospecha que representan un peligro para la salud, cuantificar las concentraciones a las que están presentes en el medio ambiente, describir las formas específicas de toxicidad (neurotoxicidad, carcinogenicidad, etc.) que pueden causar los contaminantes en cuestión y evaluar las condiciones bajo las cuales estas formas de toxicidad podrían expresarse en humanos expuestos.

3.8.2. Evaluación dosis - respuesta

La evaluación de la dosis-respuesta implica una evaluación adicional de las condiciones bajo las cuales las propiedades tóxicas de un químico pueden manifestarse en las personas expuestas, con especial énfasis en la relación cuantitativa entre la dosis y la respuesta tóxica. El desarrollo de esta relación puede implicar el uso de modelos matemáticos. Este paso puede incluir una evaluación de las variaciones en la respuesta, por ejemplo, las diferencias en la susceptibilidad entre personas jóvenes y mayores.

3.8.3. Evaluación de la exposición

Implica especificar la población que podría estar expuesta al agente de interés, identificar las rutas a través de las cuales puede ocurrir la exposición y estimar la magnitud, la duración y el momento de las dosis que las personas podrían recibir como resultado de su exposición.

3.8.4. Caracterización del riesgo

Involucra la integración de la información de los tres primeros pasos para desarrollar una estimación cualitativa o cuantitativa de la probabilidad de que cualquiera de los peligros asociados con el agente de interés se materialice en las personas expuestas. Este es el paso en el que se expresan los resultados de la evaluación de riesgos.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de este estudio se seleccionaron tres compuestos a determinar: BPA, DEHP y DBP en tres especies marinas de consumo: jaiba, piangua y corvina. Se realizó la validación de dos metodologías. La metodología de cuantificación de BPA se basó en un estudio realizado por Adeyi & Babalola, (2019) en Nigeria; donde los autores determinaron la concentración de BPA en ocho categorías de alimentos, entre ellos 4 tipos diferentes de especies marinas de consumo. Por otra parte, la metodología de cuantificación de los ftalatos DEHP y DBP se basó en un estudio realizado por Xu et al. (2018) en China; donde los autores optimizaron la metodología para detectar la concentración de 19 ftalatos en muestras de pescado. Ambas metodologías se subdividieron en dos etapas: en la primera se realizó la extracción y limpieza utilizando tubos QuChERS. Posteriormente en la segunda etapa de detección se utilizó un equipo de GC-MS. La validación de ambas metodologías implicó la selección y determinación de ciertas características de desempeño. Las que fueron contempladas en este estudio fueron: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y exactitud. Estos parámetros se encuentran entre los más importantes a incluir en un estudio de validación (Eurachem/CITAC, 2016).

4.1. Área de estudio

Este estudio se llevó a cabo en el golfo de Nicoya (Figura 3), ubicado en el océano Pacífico. Se seleccionó este sitio como punto de estudio debido a que los golfos del país se caracterizan por ser las zonas de mayor extracción pesquera del país. Además, por las condiciones de influencia antropogénica por los efluentes de los ríos como el Tempisque, lo convierten en un punto estratégico de investigación enfocada en el impacto de las actividades humanas sobre los ecosistemas marinos.

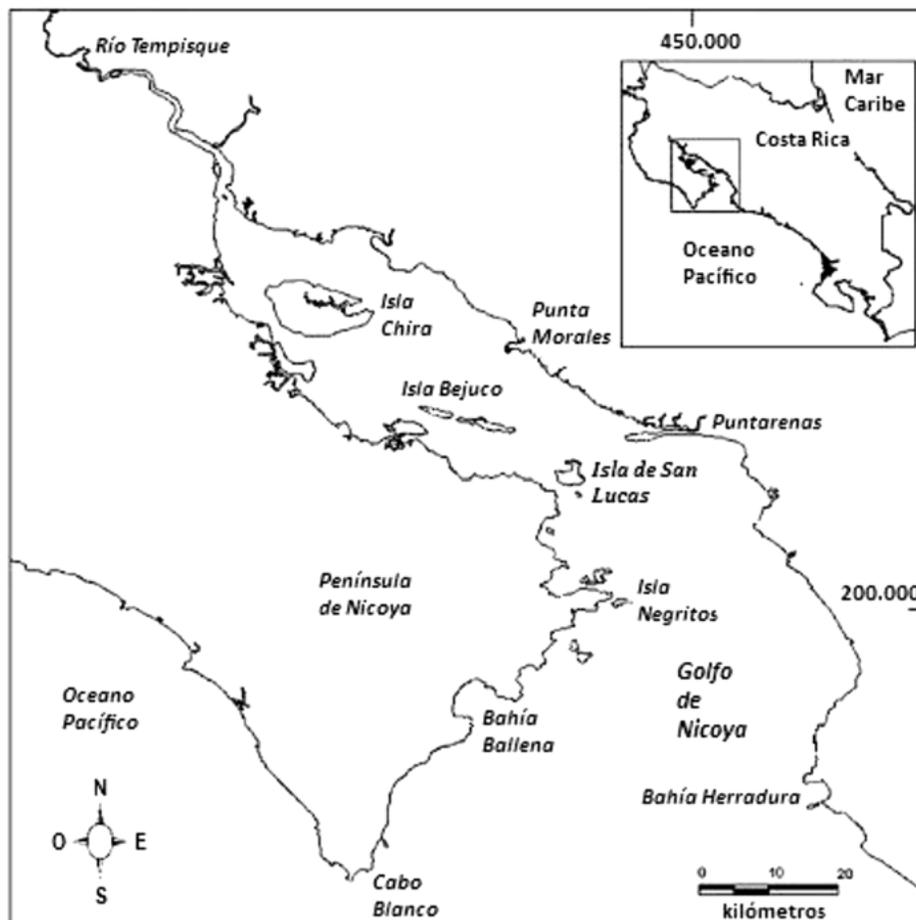


Figura 3. Mapa del golfo de Nicoya. Tomado de Rodríguez et al. (2015).

4.2. Muestreo

Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia. Dentro del estudio se contemplan tres especies de animales marinos de consumo que pertenecen a tres tipos de poblaciones: peces, moluscos y crustáceos. En representación de los moluscos se muestrea la piangua (*Anadara tuberculosa*), y en representación de los crustáceos se encuentra la jaiba

(*Callinectes sapidus*). Para el grupo de peces se obtienen muestras de corvina (*Cilus gilberti*). La selección de las especies fue realizada según las recomendaciones de expertos de la Escuela de Biología Marina de la Universidad Nacional de Costa Rica (UNA) y del Centro de Investigación Marino (CIMAR) de la Universidad de Costa Rica (UCR). Las muestras fueron adquiridas en la Cámara de Pescadores Artesanales de Puntarenas, donde se tiene la certeza de que fueron pescadas en el Golfo de Nicoya. Se recolectaron las muestras en tres fechas diferentes: 04/12/2020, 19/11/2021 y 29/01/2022. Adicionalmente, se procesaron 17 ejemplares de pianguas (*Anadara tuberculosa*) provenientes del golfo de Nicoya, proporcionadas por el Laboratorio de Estudios Marino Costeros (LEMACO) de la Universidad Nacional, adquiridas gracias a una expedición de monitoreo biológico realizado en el sitio.

Las pianguas y jaibas fueron agrupadas en muestras compuestas con el objetivo de obtener una cantidad de masa adecuada para la replicabilidad de los análisis. La variación en el tamaño y peso de cada piangua fue determinante para la agrupación según las fechas de muestreo, tal como se muestra en el Cuadro 1. Para esta especie se analizaron un total 109 especímenes distribuidos en 15 muestras compuestas.

Cuadro 1. Distribución de muestras de piangua (*Anadara tuberculosa*) recolectadas en el Golfo de Nicoya.

Número de muestra	Cantidad ejemplares	Fecha de recolección
1	8	04/12/2020
2	8	04/12/2020
3	10	04/12/2020
4	12	04/12/2020
5	10	04/12/2020
6	10	04/12/2020
7	5	19/11/2021
8	6	19/11/2021
9	6	19/11/2021
10	5	19/11/2021
11	6	30/11/2021
12	6	30/11/2021
13	6	30/11/2021
14	5	30/11/2021

15	6	30/11/2021
----	---	------------

El Cuadro 2 denota las especificaciones de las muestras de jaiba según las fechas de muestreo. La cantidad de ejemplares agrupados depende directamente del tamaño y masa disponible de cada ejemplar. Para esta especie se analizaron 37 especímenes distribuidos en 5 muestras compuestas.

Cuadro 2. Distribución de muestras de jaiba (*Callinectes arcuatus*) recolectadas en el Golfo de Nicoya.

Número de muestra	Cantidad ejemplares	Fecha de recolección
16	10	04/12/2020
17	12	04/12/2020
18	5	19/11/2021
19	5	19/11/2021
20	5	19/11/2021

El Cuadro 3 representa la cantidad de ejemplares de corvina recolectados en cada muestreo. La masa de cada ejemplar permite que se analice cada pescado por separado, como una muestra individual, para un total de 12 muestras correspondientes a 12 especímenes.

Cuadro 3. Distribución de muestras de corvina (*Cynoscion stolzmanni*) recolectadas en el Golfo de Nicoya.

Número de muestra	Cantidad ejemplares	Fecha de recolección
21	1	04/12/2020
22	1	04/12/2020
23	1	04/12/2020
24	1	04/12/2020
25	1	04/12/2020
26	1	04/12/2020
27	1	19/11/2020
28	1	29/01/2020
29	1	29/01/2020
30	1	29/01/2020
31	1	29/01/2020
32	1	29/01/2020

4.3. Materiales y equipo

- Cromatógrafo de gases con sistema de inyección splitless (Thermo Scientific Trace 1310).
- Detector de espectrometría de masas, triple cuadrupolo (Thermo Scientific TSQ 800 Evo).
- Columna para análisis cuantitativo TG-5SILMS (25 m x 0.33 mm x 0.25 μm), fase: similar a 5% fenil metilpolisiloxano.
- Software Xcalibur-Trace Finder-TSQ Dashboard.
- Tubos de plástico de 15 mL para evaporación.
- Tubo de vidrio de 50 mL para centrifuga.
- Viales de 2 mL.
- Micropipeta de 10 μL marca Eppendorf Research plus.
- Micropipeta de 100 μL marca Eppendorf Research plus.
- Micropipeta de 1000 μL marca Eppendorf Research plus.
- Micropipeta de 10 mL marca Eppendorf Reference 2.
- Balanza analítica marca A&D, modelo GH-252.
- Evaporador marca CHRIST, modelo RVC 2-18 CDplus.
- Erlenmeyers
- Centrifuga marca Damon/IEC Division, modelo HNS 2.
- Balón aforado de 25 mL, marca Normax, clase A.
- Balón aforado de 50 mL, marca Pyrex, clase A.
- Balón aforado de 100 mL, marca Norma, clase A.
- Tubos QuEChERS (400 mg PSA, 400 mg C18, 1200 mg MgSO_4).
- Probetas

4.4. Reactivos y disoluciones

4.4.1. Reactivos

- Tolueno (grado HPLC, marca Merck).
- Gas nitrógeno (ultra alta pureza, proveedor PRAXAIR).

- Gas helio (ultra alta pureza, proveedor PRAXAIR).
- Gas argón (ultra alta pureza, proveedor PRAXAIR).
- Cloruro de sodio (grado reactivo, marca J.T. Baker).
- Sulfato de magnesio (grado reactivo, marca Sigma Aldrich).
- Ácido acético glacial (grado reactivo, marca J.T. Baker).
- Acetonitrilo (LC-masas, marca Merck).
- Estándar de Bisfenol A (marca Sigma Aldrich, lote # BCBW7911).
- Estándar de ftalato de dibutilo (marca Sigma Aldrich, lote # BCBV9940).
- Estándar de ftalato de bis (2-etilhexilo) (marca Sigma Aldrich, lote # BCBT9968).

4.4.2. Disoluciones

4.4.2.1. Disolución madre de BPA (386.10 ± 0.48) $\mu\text{g/mL}$

Se pesaron 0.01950 g en balanza analítica. Se trasvasó a un balón aforado de 50.0 mL. Se aforó con acetonitrilo y se almacenó en congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.2.2. Disolución intermedia de BPA (38.61 ± 0.10) $\mu\text{g/mL}$

Se tomó una alícuota de 5.00 mL de la disolución madre de BPA (386.10 ± 0.48) $\mu\text{g/mL}$ y se vertió en un balón aforado de 50.0 mL. Se aforó con acetonitrilo y se almacenó en un congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.2.3. Disolución de trabajo de BPA (4.63 ± 0.02) $\mu\text{g/mL}$

Se tomó una alícuota de 3.00 mL de la primera disolución intermedia de BPA (38.61 ± 0.10) $\mu\text{g/mL}$ y se vertió en un balón aforado de 25.0 mL. Se aforó con acetonitrilo y se almacenó en un congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.2.4. Disolución madre de DEHP (400.40 ± 0.29) $\mu\text{g/mL}$

En un balón aforado de 50.0 mL se pesaron 0.02010 g en balanza analítica. Se aforó con tolueno y se almacenó en un congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4.2.5. Disolución madre de DBP (325.35 ± 0.28) $\mu\text{g/mL}$

En un balón aforado de 50.0 mL se pesaron 0.01630 g en balanza analítica. Se aforó con tolueno y se almacenó en un congelador a -20 °C.

4.4.2.6. Disolución de trabajo de los ftalatos: DEHP (2.00 ± 0.23) $\mu\text{g/mL}$ y DBP (2.00 ± 0.18) $\mu\text{g/mL}$

En un balón aforado de 50.0 mL se añadió una alícuota de 307 μL de la disolución madre de DEHP (400.40 ± 0.29) $\mu\text{g/mL}$ y otra alícuota de 250 μL de la disolución madre de DBP (325.35 ± 0.28) $\mu\text{g/mL}$. Se aforó con tolueno y se almacenó en un congelador a -20 °C.

4.4.2.7. Disolución de acetonitrilo en ácido acético (1%)

Se vertió 10.0 mL de ácido acético glacial en una probeta de 1000 mL con tapa. Se añadieron 990 mL de acetonitrilo. Se tapó y se agitó. Se almacenó a temperatura ambiente.

4.5. Curvas de calibración

4.5.1. Curva de calibración para BPA

Para obtener la curva de calibración se prepararon disoluciones en balones aforados de 50.0 mL. Se preparó a partir de la segunda disolución intermedia de BPA (4.63 ± 0.02) $\mu\text{g/mL}$. Se agregó una alícuota específica para cada estándar de la curva (Cuadro 4) y se aforó con acetonitrilo. Se preparó un blanco para cada curva.

Cuadro 4. Preparación de curva de calibración para BPA.

Estándar	Concentración (± 0.0009) $\mu\text{g/mL}$	Alícuota (μL)
1	20.0000	215
2	45.0000	485
3	70.0000	755
4	90.0000	970
5	115.0000	1240
6	140.0000	1510
7	185.0000	2000

4.5.2. Curva de calibración para los ftalatos DEHP y DBP.

Para obtener la curva de calibración combinada de ftalatos se prepararon disoluciones en balones aforados de 25.0 mL. Se preparó a partir de la disolución intermedia de los ftalatos DEHP (2.00 ± 0.23) $\mu\text{g/mL}$ y DBP (2.00 ± 0.18) $\mu\text{g/mL}$. Se agregó una alícuota específica para cada estándar de la curva (Cuadro 5) y se aforó con tolueno. Se preparó un blanco para cada curva.

Cuadro 5. Preparación de curva de calibración para DEHP y DBP.

Estándar	Concentración DEHP (\pm 0.0001) ng/mL	Concentración DBP (\pm 0.0005) ng/mL	Alícuota (μL)
1	10.0000	10.0000	125
2	20.0000	20.0000	250
3	40.0000	40.0000	500
4	80.0000	80.0000	1000
5	120.0000	120.0000	1500
6	180.0000	180.0000	2250
7	260.0000	260.0000	3250
8	400.0000	400.0000	5000

4.6. Procedimiento

4.6.1. Preparación de la muestra de piangua

Se abrió la concha de la piangua con tijeras y se extrajo la carne del animal. Se licuó la carne del animal y se pesó. Se rotuló y almacenó en un congelador a -20 °C. El apéndice 1: Fig. A 1.1 muestra un ejemplar de piangua previo a su procesamiento.

4.6.2. Preparación de la muestra de jaiba

Se colocó la jaiba boca arriba (ver Apéndice 1: Fig A 1.2). Se removió la solapa triangular del estómago en caso de ser hembra. Se insertó los pulgares entre el caparazón y el cuerpo y se haló para extraer la carne del cuerpo. Se rompió la cáscara de las patas y tenazas para extraer la carne. Se licuó la carne del animal y se pesó. Se rotuló y almacenó en un congelador a -20 °C.

4.6.3. Preparación de la muestra de corvina

Se realizó una incisión desde el ano hacia la boca (ver Apéndice 1: Fig. A 1.3). Se retiraron los órganos internos. Se realizó un corte lateral detrás de cada aleta para remover la cabeza. Se realizó un corte central para retirar la columna vertebral. Se retiró la piel dejando solo el tejido de músculo. Se licuó la carne y se pesó. Se rotuló y almacenó en un congelador a -20 °C.

4.6.4. Extracción por QuEChERS para análisis de BPA

Se pesaron aproximadamente 5.0000 g en balanza analítica de muestra homogeneizada de acuerdo con el procedimiento de las secciones 4.7.1, 4.7.2 y 4.7.3. Se utilizó un tubo para centrífuga de vidrio de 50.0 mL. Se agregaron 10.0 mL de acetonitrilo (disolvente). Se agitó por 1 min. Se añadió 1.0 g de NaCl y 4.0 g de MgSO₄. Se agitó por 3 min. Se centrifugó por 5 min a 4000 rpm. Se tomó una alícuota de 5.00 mL del sobrenadante y se traspasó al tubo QuEChER. Se agitó por 1 min. Se centrifugó por 3 min a 4000 rpm. Se tomó una alícuota de 1.00 mL y se transfirió a un vial de 2.00 mL. Se procedió a inyectar en el equipo GC-MS.

4.6.5. Extracción por QuEChERS para análisis de ftalatos (DEHP y DBP)

Se pesaron aproximadamente 5.0000 g en balanza analítica de muestra homogeneizada de acuerdo con el procedimiento de las secciones 4.7.1, 4.7.2 y 4.7.3. Se utilizó un tubo para centrífuga de vidrio de 50.0 mL. Se agregó 7.00 mL de ácido acético en acetonitrilo al 1% (disolvente). Se agitó por 1 min. Se añadió 2.0 g de NaCl. Se agitó por 1 min. Se colocó en baño ultrasónico por 30 min a 40 °C y 60 W. Se centrifugó por 5 min a 4000 rpm. Se tomó una alícuota de 3.00 mL del sobrenadante y se traspasó al tubo QuEChER. Se agitó por 1

min. Se centrifugó por 5 min a 4000 rpm. Se tomó una alícuota de 1.00 mL. Se transfirió a un tubo plástico de 15.0 mL. Se evaporó por un periodo de 2 horas a 40 °C. Se reconstituyó con 1.00 mL de tolueno. Se trasvasó a un vial de 2.00 mL. Se procedió a inyectar en el equipo GC-MS.

4.6.6. Cuantificación por GC – MS

Dentro de las herramientas necesarias para el uso del equipo de GC – MS se encuentra el software Trace Finder, donde se programa la secuencia del nuevo método a desarrollar y se definen las condiciones del equipo.

4.6.7. Condiciones del equipo de GC-MS para la metodología de detección de BPA

A continuación, el Cuadro 6 presenta las condiciones del equipo para la metodología de BPA. Las condiciones fueron replicadas del artículo base (Adeyi & Babalola, 2019).

Cuadro 6. Condiciones instrumentales del método de BPA.

Condición	Valor		
Detector	Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo		
Columna capilar	Agilent HP-5 ms (30m x 250 mm x 0.25 µm).		
Gas transportador	Helio		
Gas de colisión	Argón		
Flujo	1 mL/min		
Inyección	Split less		
Temperatura del inyector	250 °C		
Temperatura del detector	Fuente de iones 250 °C Línea de transferencia 250 °C		
Programación temperatura del horno	Rampa (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo de espera (min)
	-	100	0.5
	30	280	5
Tiempo total corrida	12 min		

4.6.8. Condiciones del equipo de GC-MS para la metodología de detección de ftalatos (DEHP y DBP)

A continuación, el Cuadro 7 muestra las condiciones del equipo para la metodología de los ftalatos DEHP y DBP. Las condiciones fueron replicadas de los autores Xu et al., (2018) en que se basó el desarrollo del método.

Cuadro 7. Condiciones instrumentales del método de ftalatos DEHP y DBP.

Condición	Valor												
Detector	Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo												
Columna capilar	Agilent HP-5 ms (30m x 250 mm x 0.25 µm).												
Gas transportador	Helio												
Gas de colisión	Argón												
Flujo	1 mL/min												
Inyección	Split less												
Temperatura del inyector	285 °C												
Temperatura del detector	Fuente de iones 320 °C Línea de transferencia 320 °C												
Programación temperatura del horno	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Rampa (°C/min)</th> <th>Temperatura (°C)</th> <th>Tiempo de espera (min)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-</td> <td>60</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>220</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>280</td> <td>4</td> </tr> </tbody> </table>	Rampa (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo de espera (min)	-	60	1	20	220	-	5	280	4
	Rampa (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo de espera (min)										
	-	60	1										
	20	220	-										
5	280	4											
Tiempo total corrida	25 min												

4.6.9. Determinación de tiempo de retención de los analitos

Para determinar el tiempo de retención asociado a los analitos en estudio, se realiza una prueba en el software del equipo GC-MS denominado Xcalibur. Esta prueba permite detectar el tiempo de retención asociado a las condiciones actuales del laboratorio. Este factor puede variar a lo largo del tiempo, por eso es importante actualizarlo constantemente.

4.6.10. Determinación de las transiciones de cada analito

Se determinaron las fragmentaciones específicas para cada compuesto, necesarias para la detección de los analitos en estudio. A partir de una inyección en el equipo de la disolución estándar de cada analito, fue posible identificar las transiciones óptimas que permitan obtener una mayor sensibilidad. Se seleccionaron las transiciones de ión precursor e ión producto que fuesen más abundantes y se verificó que no correspondieran a ruido instrumental como O₂ o CO₂.

4.7. Características de desempeño

Para la determinación de los criterios de desempeño se consultó con los expertos del área de cromatografía del laboratorio CEQIATEC, donde fue validado el método. Los criterios acordados como indispensables para la validación de las metodologías de detección de BPA, DEHP y DBP en tejido de animal marino fueron: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y exactitud. Los criterios de aceptabilidad empleados son los mismos utilizados por el laboratorio.

4.7.1. Determinación de linealidad

Se utilizaron estándares para la formulación de la curva de calibración y así poder asociar la señal instrumental de las muestras por medio de una interpolación.

El criterio de aceptabilidad utilizado para determinar si existe una relación lineal adecuada se basa en que el valor del coeficiente de determinación o coeficiente de correlación al cuadrado (r^2) sea mayor o igual a 0.995. Este criterio se basa en la guía para validación de metodologías de Monaghan, (2006).

4.7.2. Determinación de límites de detección

El límite de detección se calculó según Monaghan, (2006). Se determinó la desviación estándar de 10 muestras blanco, es decir, se procesaron los reactivos sin el analito en estudio, y se procedió a aplicar la siguiente fórmula:

$$LD = 3 * S_0$$

Donde:

LD: Límite de detección.

S_0 : Desviación estándar de 10 muestras blanco.

El criterio de aceptabilidad para el LD según Duffau et al. (2010) se basa en que:

- Para un LMP ≥ 0.1 ppm se debe obtener un LD \leq LMP/10.
- Para un LMP < 0.1 ppm se debe obtener un LD \leq LMP/5.

Donde LMP se refiere al límite máximo permitido siendo el nivel máximo o tolerancia establecida para un analito en una reglamentación.

4.7.3. Determinación de límites de cuantificación

El límite de cuantificación se calculó según Monaghan, (2006). Se determinó la desviación estándar de 10 muestras blanco y se procede a aplicar la siguiente fórmula:

$$LC = 10 * S_0$$

Donde:

LC: Límite de cuantificación.

S_0 : Desviación estándar de 10 muestras blanco.

El criterio de aceptabilidad utilizado para el LC según Duffau et al. (2010) se basa en que:

- Para un LMP ≥ 0.1 ppm se debe obtener un LC \leq LMP/5.
- Para un LMP < 0.1 ppm se debe obtener un LC $\leq 2*LMP/5$.

4.7.4. Determinación de exactitud

Este parámetro se determinó por medio del porcentaje de recuperación. Se utilizó la corvina en representación de la matriz de tejido de animal marino. Una vez pesados los 5 g de muestra, en el caso del BPA se enriqueció con 300 μ L con la disolución de trabajo de BPA descrita en la sección 4.5.2.3 y para los ftalatos DEHP y DBP se agregaron 700 μ L de la disolución de trabajo descrita en la sección 4.5.2.6. Se trabajó las pruebas por triplicado y se promedió el resultado. Es necesario que el enriquecimiento permita ubicar la señal asociada dentro del rango de concentraciones de la curva de calibración respectiva. Se calculó la

recuperación luego de procesar la muestra bajo las mismas condiciones que las muestras sin enriquecer. La fórmula utilizada para el cálculo del % de recuperación es la siguiente:

$$\% \text{ rec} = \frac{C_{no}}{C_{ne}} * 100$$

Donde:

% rec; Porcentaje de recuperación

C_{no}: Concentración obtenida (µg/ g muestra)

C_{ne}: Concentración de enriquecimiento (µg/ g muestra)

El criterio de aceptación utilizado para el porcentaje de recuperación se basa en la Tabla A5 de la AOAC, donde se establece que para un rango entre 100 ppb y 1 ppm el porcentaje de recuperación adecuado es de 80% a 110% (AOAC, 2016).

4.8. Expresión de resultados

4.8.1. Cálculo de concentración de analito (µg/g de muestra)

La determinación de la concentración de los analitos se llevó a cabo mediante regresión lineal, para esto se utiliza la siguiente fórmula:

$$C_{n_{analito}} = \left(\frac{\text{Área}_m - b}{m} \right) * \left(\frac{V_S}{M} \right) * 1000$$

Donde:

C_{n_{analito}} = concentración del analito encontrado en la muestra en µg/g muestra.

Área_m = área determinada para el analito

b = intercepto de la curva de calibración.

m = pendiente de la curva de calibración.

V_S = volumen de disolvente adicionado en mL.

M = masa de la muestra utilizada en g.

4.9. Reporte de resultados

Para reportar la concentración de los analitos BPA, DEHP y DBP presentes en la muestra se aplicaron los criterios mostrados en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Criterios para reportar los analitos en estudio.

Criterio	Resultado reportado
Si $C_{\text{analito}} < LC$	NC
Si $C_{\text{analito}} > LC$	(Concentración \pm incertidumbre)

C_{analito} : concentración en μg de analito presente en 1 g de tejido de animal marino.

LC: límite de cuantificación del método.

ND: no cuantificable.

4.10. Cálculo de incertidumbre

Para el cálculo de la incertidumbre se determinan los aportes más significativos sobre las metodologías de detección de BPA, DEHP y DBP en tejido de animal marino. Estos aportes fueron evidenciados por medio del diagrama de Ishikawa, tal como se muestra en la Figura 4.

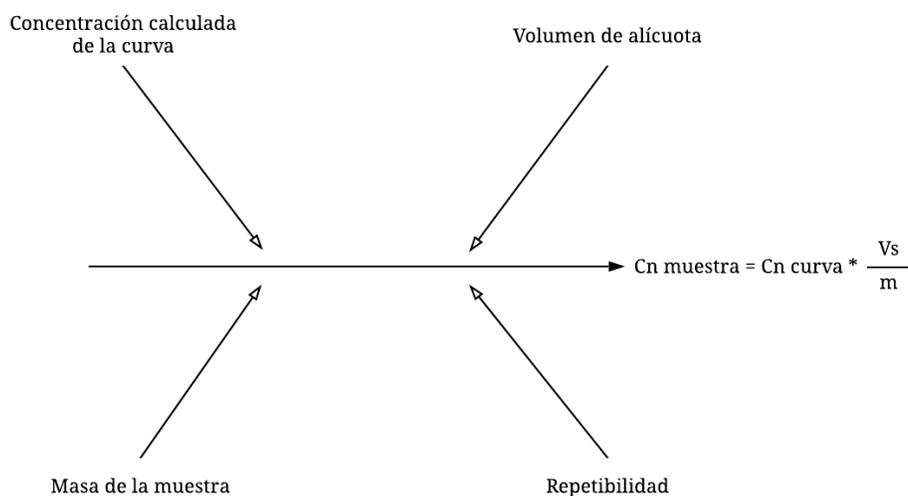


Figura 4. Diagrama de Ishikawa de las fuentes de incertidumbre más significativas en la cuantificación de BPA, DEHP y DBP.

El cálculo de los aportes de la incertidumbre se determinó de manera individual para cada analito. Los Cuadros 9, 10 y 11 muestran los resultados de la incertidumbre asociada a cada metodología desarrollada.

Cuadro 9. Aportes a la incertidumbre de los resultados de BPA.

Aporte	Valor x	Incertidumbre estándar U (x)	Incertidumbre estándar relativa U (x)/x
Repetibilidad ($\mu\text{g/g}$ muestra)	0.017	0.003	0.151
Masa de la muestra (g)	5.00	0.000014	0.0000028
Volumen de la alícuota (mL)	10.00	0.0038	0.000514286
Concentración de la curva ($\mu\text{g/L}$)	8.047	0.007	0.0009
Incertidumbre expandida (Nivel de confianza de 95% y un factor k igual a 2)			0.006

Cuadro 10. Aportes a la incertidumbre de los resultados de DEHP.

Aporte	Valor x	Incertidumbre estándar U (x)	Incertidumbre estándar relativa U (x)/x
Repetibilidad ($\mu\text{g/g}$ muestra)	0.03	0.005	0.166666667
Masa de la muestra (g)	5.00	0.000014	0.0000028
Volumen de la alícuota (mL)	7.00	0.0036	0.000514286
Concentración de la curva ($\mu\text{g/L}$)	13.490	0.001	0.0001
Incertidumbre expandida (Nivel de confianza de 95% y un factor k igual a 2)			0.01

Cuadro 11. Aportes a la incertidumbre de los resultados de DBP.

Aporte	Valor x	Incertidumbre estándar U (x)	Incertidumbre estándar relativa U (x)/x
Repetibilidad ($\mu\text{g/g}$ muestra)	0.009	0.001	0.138337935
Masa de la muestra (g)	5.00	0.000014	0.0000028
Volumen de la alícuota (mL)	7.00	0.0036	0.000514286
Concentración de la curva ($\mu\text{g/L}$)	3.810	0.002	0.0005
Incertidumbre expandida (Nivel de confianza de 95% y un factor k igual a 2)			0.002

4.11. Análisis de riesgo toxicológico

Se realizó un análisis de riesgo toxicológico de forma preliminar en base a los resultados obtenidos en la sección 4.9.1. A partir de la concentración de BPA, DEHP y DBP en tejido de animal marino se calcula la ingesta diaria para un caso de consumo de alguna de las tres especies en estudio: piangua, jaiba y corvina. Posteriormente, se compara la ingesta con la

TDI establecidas por la EFSA y determinar si existe un riesgo asociado al consumo de estas especies.

4.11.1. Cálculo de ingesta diaria.

Para la determinación de ingesta diaria de un compuesto tóxico al consumir alimentos se utilizó la fórmula establecida por US EPA (2019) para cada analito en estudio:

$$Ds \left(\frac{\mu g}{kg \text{ bw} * d} \right) = \frac{Cn_{promedio} \left(\frac{\mu g}{g_{muestra}} \right) * T(g/d)}{M(kg \text{ bw})}$$

Donde:

Ds: Ingesta diaria ($\mu\text{g}/\text{kg bw} * \text{d}$)

Cn_{promedio}: Concentración promedio de analito en especie marina de consumo ($\mu\text{g}/\text{g muestra}$)

T: Tasa de contacto (g/d)

M: Masa corporal (kg bw)

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Tiempo de retención de los analitos BPA, DEHP y DBP

El tiempo de retención resultante para los analitos en estudio se muestran en el Cuadro 12. En el caso del BPA, se observó en el cromatograma (Apéndice A 3.1) que el tiempo de retención donde se ubica la señal más pronunciada es a los 7.21 min. El espectro de masas (Apéndice A 3.2) asociado a este tiempo fue comparado con una base de datos que permitió identificar con un porcentaje de confirmación que tal tiempo corresponde a BPA. El tiempo de retención del DEHP se ubicó a los 16.94 min (Apéndice A 3.3) y el DBP a los 11.07 min (Apéndice A 3.5). El tiempo de retención de los analitos puede cambiar por varios factores como la variación en las matrices de la muestra, variaciones en el instrumento de detección como deterioro, recorte o reemplazo de la columna analítica o por variaciones de presión, temperatura o flujos (Lee & Cooper, 2020) Para mantener un tiempo de retención representativo del analito durante todo el desarrollo del proyecto, fue necesario realizar pruebas de full scan periódicamente para actualizar los tiempos de retención. Esta prueba realizada en Xcalibur (software del equipo GC-MS) determina el tiempo de retención

asociado a las condiciones del equipo y laboratorio actuales. De esta manera, se pudo identificar y actualizar las metodologías cuando fuese necesario.

Cuadro 12. Tiempos de retención de los analitos en estudio.

Analito	Tiempo de retención (min)
BPA	7.21
DEHP	16.94
BP	11.07

5.2. Parámetros de desempeño calculados

En esta sección se procuró determinar los parámetros de desempeño necesarios para desarrollar y probar las metodologías de cuantificación de BPA, DEHP y DBP en tejido de animales marinos. La precisión, siendo uno de los parámetros de desempeño más importantes de una validación metodológica, no fue determinada en ninguna de las dos metodologías. Esto se debió a que el equipo de GC-MS utilizado presentaba problemas en cuanto a reproducibilidad, incluso las metodologías del Laboratorio no han logrado este parámetro. Sin embargo, CEQIATEC continúa realizando acciones para mejorar la repetibilidad del equipo y así contemplar tan importante parámetro. Por otro lado, la cantidad de reactivos y muestras disponibles ameritaban una priorización de pruebas para la validación, dejando la precisión como un parámetro pendiente a calcular para completar el primer objetivo específico del trabajo.

5.2.1. Límite de detección y límite de cuantificación

Para el criterio de aceptabilidad de los tres analitos se utilizó como LMP el valor de SML (Límite de Migración Específico) en alimentos. En el caso del BPA se utilizó el valor de 0.6 mg/kg establecido por la EFSA (2015). En el caso de los ftalatos también se utilizaron valores establecidos por la EFSA donde se define un LMP de 1.5 mg/kg para DEHP y 0.3 mg/kg para DBP (Silano et al., 2019).

El Cuadro 13 muestra los valores de LD obtenidos para cada analito en estudio. Se observa que es el mismo valor para los tres compuestos (0.002). Al comparar el LD de cada

compuesto con el criterio de aceptabilidad (LMP/10) se evidencia en los tres casos que el LD es menor, indicando que se cumple con el criterio planteado en la sección 4.8.2.

Cuadro 13. Límites de detección obtenidos con el criterio de aceptabilidad respectivo.

Analito	LD ($\mu\text{g} / \text{g}$ muestra)	LMP ($\mu\text{g} / \text{g}$)	LMP / 10
BPA	0.002	0.6	0.06
DEHP	0.002	1.5	0.15
DBP	0.002	0.3	0.03

Por otra parte, el Cuadro 14 presenta los resultados obtenidos los límites de cuantificación para cada analito. Este valor determinó la concentración mínima cuantificable para cada método y es importante recalcar que en todos los analitos el valor de LC es mayor que el de LD. Al comparar el valor del LC de cada analito con el criterio de aceptabilidad (LMP/5) se evidencia en todos los casos que el LC es menor, lo cual permite afirmar que se cumple con el criterio establecido en la sección 4.8.3.

Cuadro 14. Límites de cuantificación obtenidos con el criterio de aceptabilidad respectivo.

Analito	LC ($\mu\text{g} / \text{g}$ muestra)	LMP ($\mu\text{g} / \text{g}$)	LMP / 5
BPA	0.006	0.6	0.12
DEHP	0.006	1.5	0.3
DBP	0.008	0.3	0.06

5.2.2. Exactitud

El Cuadro 15 denota tres pruebas de recuperación por triplicado realizadas para la metodología de cuantificación de BPA en tejido de especies marinas de consumo. Estas pruebas fueron realizadas una vez que se alcanzó una linealidad adecuada. Se observa que el porcentaje alcanzado en la prueba 3 cumple con el criterio de aceptabilidad establecido en la sección 4.8.4, donde se indica que debe ser mayor al 80%, en este caso se obtuvo un 97%.

Cuadro 15. Pruebas de recuperación para el compuesto BPA.

Prueba	Porcentaje de recuperación (%)
1	32
2	63
3	97

El Cuadro 16 evidencia cuatro pruebas de recuperación por triplicado realizadas para la metodología de cuantificación de DEHP en tejido de especies marinas de consumo. Estas pruebas fueron realizadas una vez que se alcanzó una linealidad adecuada. Se observa que el porcentaje alcanzado en la prueba 3 cumple con el criterio de aceptabilidad establecido en la sección 4.8.4, donde se indica que debe ser mayor al 80%, en este caso se obtuvo un 83%, sin embargo, se realizó una cuarta prueba en caso de alguna variación.

Cuadro 16. Pruebas de recuperación para el compuesto DEHP.

Prueba	Porcentaje de recuperación (%)
1	17
2	76
3	83
4	84

El Cuadro 17 evidencia tres pruebas de recuperación por triplicado realizadas para para la metodología de cuantificación de DBP en tejido de especies marinas de consumo. Estas pruebas fueron realizadas una vez que se alcanzó una linealidad adecuada. Se observa que el porcentaje alcanzado en la prueba 3 cumple con el criterio de aceptabilidad establecido en la sección 4.8.4, donde se indica que debe ser mayor al 80%, en este caso se obtuvo un 88%.

Cuadro 17. Pruebas de recuperación para el compuesto DBP.

Prueba	Porcentaje de recuperación (%)
1	82
2	92
3	88

5.2.3. Linealidad

El comportamiento de las curvas de calibración para BPA, DEHP y DBP muestran un comportamiento positivo-moderado. La figura 5 evidencia que el BPA cuenta con un r^2 de 0.9952, la figura 6 muestra que el r^2 del DEHP es igual a 0.9997 y en la figura 7 se muestra un r^2 de 0.9993 para el DBP; estos valores al ser mayores a 0.995 cumplen con el criterio de

aceptabilidad establecido en la sección 4.8.1 e indican un comportamiento lineal adecuado (Schober et al., 2018).

El apéndice 4 muestra en las figuras A.4.1, A.4.3 y A.4.5 ejemplos de cromatogramas asociados a los patrones 8 de las curvas de calibración de BPA, DEHP y DBP respectivamente. Se puede observar la similitud con los cromatogramas de las figuras A.4.2, A.4.4 y A.4.6, que corresponden a muestras de tejido de animal marino analizadas para detectar BPA, DEHP y DBP respectivamente.

Cabe destacar que el valor de las señales de los patrones es adimensional y puede variar respecto a la fecha de inyección, pero la relación entre los valores de cada curva sigue obteniendo un comportamiento similar de manera que el coeficiente de determinación (r^2) sigue siendo adecuado en la mayoría de los casos.

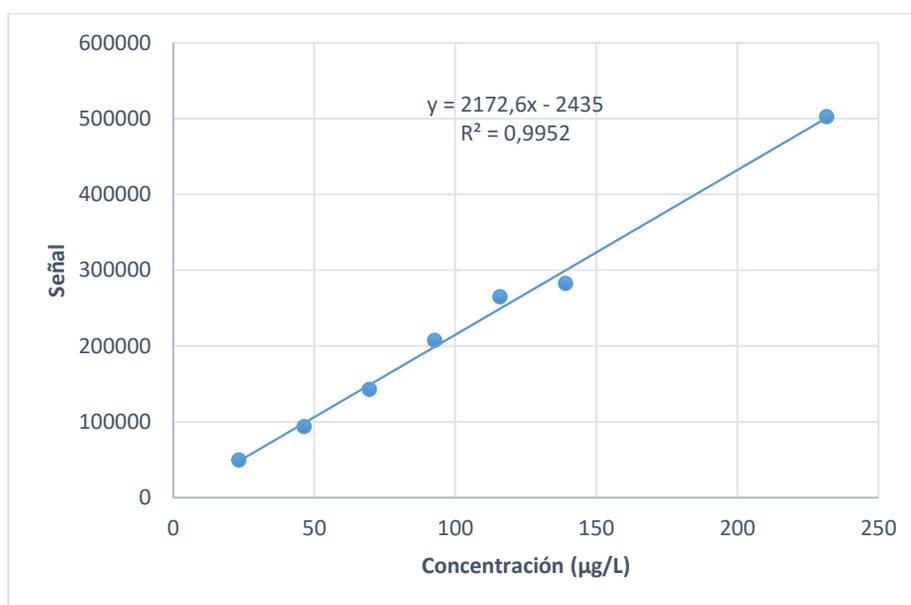


Figura 5. Curva de calibración de BPA.

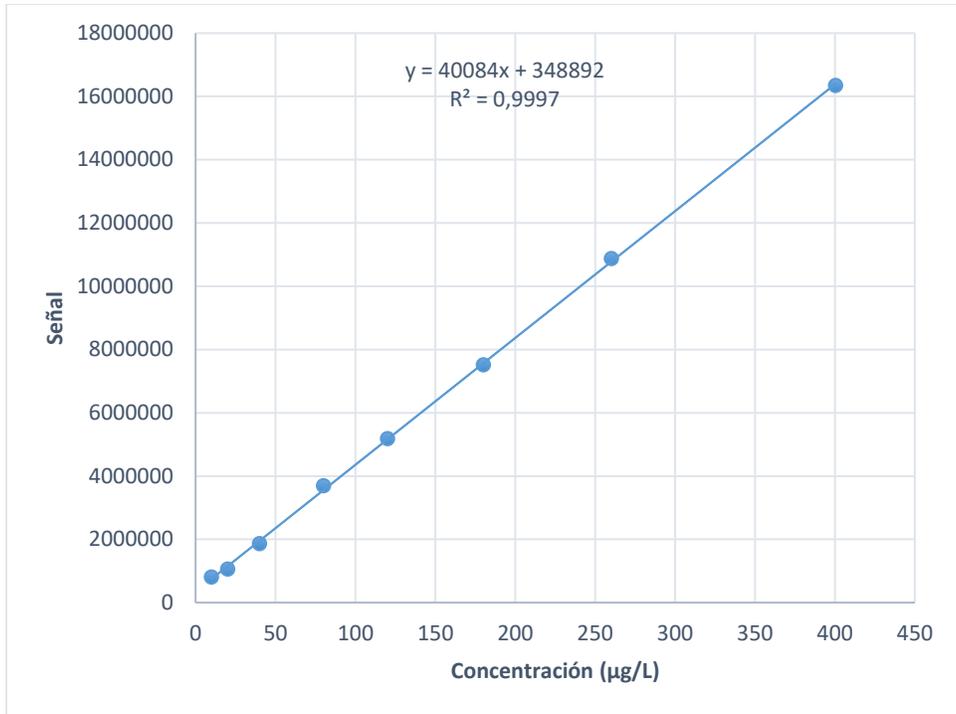


Figura 6. Curva de calibración de DEHP

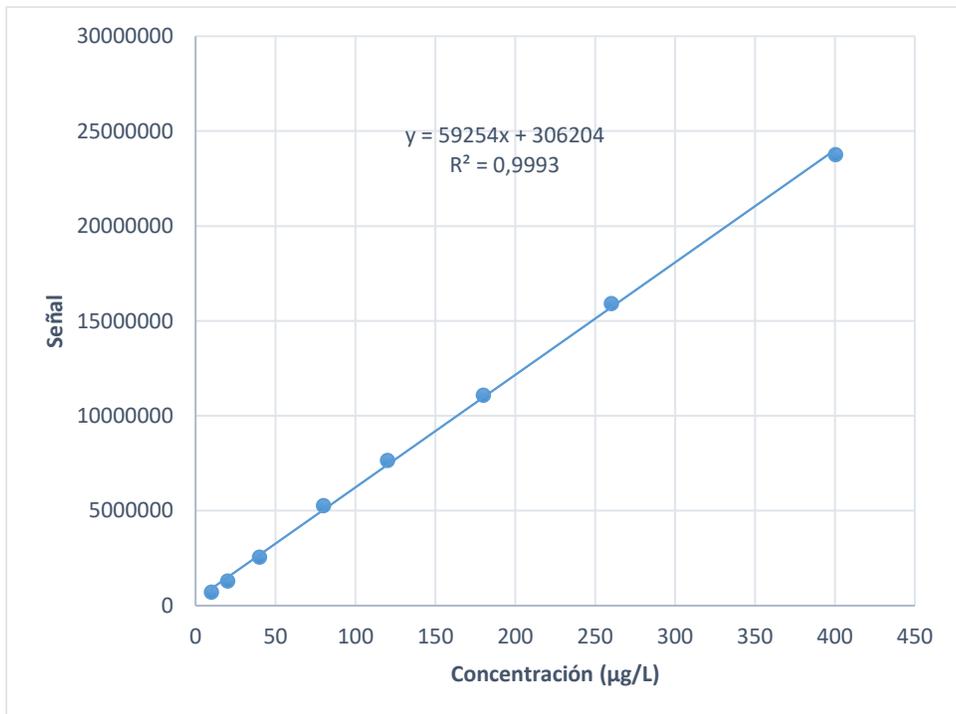


Figura 7. Curva de calibración de DBP.

5.3. Mejoras en las metodologías para cuantificar BPA, DEHP y DBP en tejido de especies marinas de consumo.

Se realiza un análisis de linealidad para definir el rango de concentraciones y la cantidad de patrones que permitan cumplir de manera óptima el criterio establecido en la sección 4.7.1. El Cuadro 18 presenta las curvas de calibración como pruebas empleadas para mejorar la linealidad de la metodología de cuantificación de BPA en tejido de especies marinas de consumo. En la curva 5 se obtiene el menor valor de r^2 igual a 0.9181, el cual no representa el comportamiento lineal esperado, además, en las curvas 4 y 5 algunos patrones daban como resultado NF (Not Found) que significa que el equipo GC-MS no logró detectar la señal asociada a esa inyección; por estas dos razones se redujo el ámbito de trabajo de 30 $\mu\text{g/L}$ – 2000 $\mu\text{g/L}$ a 60 $\mu\text{g/L}$ - 500 $\mu\text{g/L}$.

En las curvas 8 y 9 se agregó una etapa de derivatización a la metodología, tal como lo realizan los autores Adeyi & Babalola, (2019) en el artículo en que fue basada la metodología. Esta etapa implica un cambio en las propiedades del analito, en este caso una alquilación que forma el aducto bisfenol A diacetato. La derivatización se utiliza para mejorar la separación del analito y mejorar la sensibilidad del método (Moldoveanu & David, 2018). Sin embargo, los resultados no fueron los esperados, el Cuadro 15 denota mediante las pruebas 1 y 2 los porcentajes de recuperación asociados a las curvas 8 y 9 respectivamente, donde no supera el 80% necesario para cumplir con el criterio de aceptabilidad, por esto se procedió a descartar esta etapa de la metodología.

A partir de la curva 11 se reajustó el rango de concentraciones a 20 – 230 $\mu\text{g/L}$ porque en ese ámbito se observaba un mejor comportamiento en la línea de tendencia del gráfico de concentración de los patrones ($\mu\text{g/L}$) vs área detectada de los patrones. En la curva 12 se observa que el r^2 posee un valor mayor que 0.995, este valor tan cercano a 1 indica un adecuado grado de precisión de la curva y que esta curva representa de manera acertada la respuesta del detector (Asuero et al., 2006).

Cuadro 18. Pruebas de mejoras para la metodología de detección de BPA en tejido de especies marinas de consumo.

Curva de calibración	Cantidad de patrones	Ámbito de trabajo ($\mu\text{g/L}$)	r^2
1	7	30-2000	0.9936

2	7	30-2000	0.9848
3	7	30-2000	0.9801
4	7	30-2000	0.9845
5	7	30-2000	0.9181
6	7	60-500	0.9809
7	7	60-500	0.9968
8	7	60-500	0.9823
9	7	60-500	0.9330
10	7	10-200	0.9818
11	7	20-230	0.9881
12	7	20-230	0.9951
13	7	20-230	0.9959

El Cuadro 19 presenta las curvas de calibración como pruebas empleadas para mejorar la linealidad de la metodología de cuantificación de DEHP en tejido de especies marinas de consumo. Se destaca que a partir de la curva 3 donde al incrementar de 5 a 8 patrones permitió obtener un coeficiente de determinación mayor a 0.995. En la curva 6 se aumenta el volumen de disolvente agregado de 5 mL a 7 mL, debido a que para la toma de alícuotas se requiere contar con una fase líquida más abundante. Además, los autores Xu et al. (2018) reportan que el porcentaje de recuperación al utilizar 7 mL de disolvente resulta similarmente conveniente que utilizar 5 mL. Por otro lado, se observó que el aumentar el rango de concentraciones de las curvas de calibración de 10 – 200 ug/L a un ámbito de 10 – 400 ug/L mejoraba el coeficiente de determinación al punto que el valor obtenido fue de 0.9999 siendo excelente para la cuantificación.

Cuadro 19. Pruebas de mejoras para la metodología de detección de DEHP en tejido de especies marinas de consumo.

Curva de calibración	Cantidad de patrones	Ámbito de trabajo (µg/L)	r ²
1	5	10-200	0.9942
2	5	10-200	0.9777
3	8	10-200	0.9991
4	8	10-200	0.9987
5	8	10-200	0.9998
6	8	10-200	0.9994
7	8	10-400	0.9999

El Cuadro 20 presenta las curvas de calibración como pruebas empleadas para mejorar la linealidad de la metodología de cuantificación de DBP en tejido de especies marinas de consumo. En las curvas 1 y 2 se obtuvieron patrones por debajo del LD, por esta razón se

aumenta la curva de 5 a 8 patrones y se evidencia la mejora en la curva 3 al obtener un coeficiente de determinación de 0.9994, mayor que 0.995. Al igual que con el DEHP, se ve la necesidad de aumentar el volumen del disolvente para restarle dificultad a la toma de alícuotas, por esta razón en la curva 6 se aumenta de 5 mL a 7 mL. Tal como se muestra en la curva 7, el aumentar el ámbito de trabajo de 10 – 200 ug/L a 10 – 400 ug/L en este caso no genera un impacto favorable sobre el coeficiente de determinación, ya que pasa de 0.9994 a 0.9988, sin embargo, el valor de r^2 sigue siendo mayor que 0.995 lo cual es adecuado.

Cuadro 20. Pruebas de mejoras para la metodología de detección de DBP en tejido de especies marinos de consumo.

Curva de calibración	Cantidad de patrones	Ámbito de trabajo (µg/L)	r^2
1	5	10-200	0.9407
2	5	10-200	0.9446
3	8	10-200	0.9994
4	8	10-200	0.9996
5	8	10-200	0.9990
6	8	10-200	0.9994
7	8	10-400	0.9988

5.4. Presencia de BPA, DEHP y DBP en tejido de especies marinas de consumo

En total se analizaron 32 muestras combinadas, de las cuales 15 correspondieron a pianguas, 5 a jaibas y 12 fueron corvinas. Los 96 resultados correspondientes a los tres analitos cuantificados en las tres especies se exponen en el Apéndice 5: Cuadro A 5.1. Cada muestra se analizó mediante las dos metodologías: cuantificación de BPA en tejido de especies marinas y cuantificación de DEHP y DBP en tejido de especies marinas. Se procesó las muestras por duplicado, para un total de 128 análisis realizados, además, cada réplica se inyectó dos veces en el GC-MS, dando un total de 256 inyecciones. Siendo tres analitos en estudio, en total se analizaron 384 cromatogramas resultantes.

De los 96 resultados, 76 mostraron una concentración cuantificable, es decir, mayor al LC. Los resultados promediados se muestran en el Cuadro 21, donde se evidencia que, en el caso de la piangua y la jaiba, el resultado de DBP es el que se asocia a una menor cantidad de muestras, siendo 7 muestras de pianguas y 1 muestra de jaiba. En este caso de la jaiba, corresponde a una única muestra, y dio como resultado la concentración más alta de DBP en

todas las especies (0.059 ± 0.002) $\mu\text{g} / \text{g}$ muestra. Por otro lado, se observa que el DEHP es el analito que se encontró en menor cantidad en las tres especies, donde la concentración más baja fue de 0.03 ± 0.01 $\mu\text{g} / \text{g}$ muestra en jaiba y la más alta fue de 0.13 ± 0.01 $\mu\text{g} / \text{g}$ muestra en piangua. El BPA se encontró en menor cantidad en la corvina, con un total de 0.009 ± 0.006 $\mu\text{g} / \text{g}$ muestra y la mayor presencia de este compuesto se encontró en la jaiba (0.028 ± 0.006) $\mu\text{g} / \text{g}$ muestra. El apéndice 6 muestra los gráficos de dispersión de las concentraciones obtenidas de las muestras de cada especie.

Cabe destacar que entre mayor sea el número de muestra se puede asociar los resultados de una manera más representativa. Todas las muestras provienen de un mismo sitio de muestreo, siendo adquiridos de una pescadería donde se desconoce el método de extracción y almacenaje previo a su adquisición.

Cuadro 21. Resultados encontrados en muestras compuestas de piangua.

Especie	Cantidad de muestras	Analito	Concentración promedio ($\mu\text{g} / \text{g}$ muestra)	Rango de concentraciones ($\mu\text{g} / \text{g}$ muestra)
Piangua	15	BPA	0.014 ± 0.006	0.008 - 0.039
Piangua	15	DEHP	0.13 ± 0.01	0.01 - 1.41
Piangua	7	DBP	0.017 ± 0.002	0.013 - 0.025
Jaiba	5	BPA	0.028 ± 0.006	0.007 - 0.076
Jaiba	5	DEHP	0.03 ± 0.01	0.01 - 0.1
Jaiba	1	DBP	0.059 ± 0.002	0.059 - 0.059
Corvina	7	BPA	0.009 ± 0.006	0.006 - 0.018
Corvina	12	DEHP	0.04 ± 0.01	0.01 - 0.08
Corvina	8	DBP	0.019 ± 0.002	0.013 - 0.022

5.5. Evaluación preliminar de riesgo toxicológico asociado al consumo de piangua, jaiba y corvina.

Se considera una evaluación de riesgo preliminar debido a que se plantea un caso específico que representa a un tipo de población específica, donde se utiliza un valor de masa corporal estándar de 70 kg (Stroheker et al., 2014) tal como lo recomienda la US EPA. Y se utiliza un valor de consumo diario promedio de pescado y mariscos cocidos de 17.50 g por día para la población urbana de Costa Rica entre 15 y 65 años (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación, 2021).

El Cuadro 22 denota las dosis de ingesta preliminar determinadas, así como los límites de TDI en alimentos establecidos por la EFSA. En general, se nota que ninguna de las concentraciones de BPA, DEHP y DBP en las especies de piangua, jaiba y corvina exceden las TDI establecidas. Se obtiene que la dosis de DBP al consumir jaiba es de 0.015 ug/kg bw/d. Esta dosis representa una sola muestra, en este caso la muestra 16 (Apéndice 5: Cuadro A.5.1) compuesta por 10 ejemplares (ver Cuadro 2). En contraste, las dosis de BPA y DEHP en piangua se encuentran asociadas a una cantidad de 15 muestras combinadas, una mayor cantidad de muestra mejora la representatividad real de los datos obtenidos (García et al., 2013). Según la EFSA (2015), el valor temporal establecido de TDI en alimentos para BPA es 4 µg/kg bw/d. Es evidente que el consumo de las tres especies en estudio no representa un riesgo ya que no sobrepasa el valor establecido. Cabe destacar que se ha realizado una reevaluación de la toxicidad del compuesto BPA, en la cual se plantea disminuir el TDI a 0.004 ng/ kg bw, sin embargo, no se ha oficializado la redefinición del TDI (EFSA, 2021). Para el caso de los ftalatos, la EFSA establece un TDI de 50 µg/kg bw/d en alimentos para DEHP y 10 µg/kg bw/d en alimentos para DBP (Silano, Barat, et al., 2019). En todos los casos, el escenario donde se consume una mayor cantidad de plastificante es para el DEHP en piangua donde el valor de ingesta diaria es de 0.033 g/kg bw/d. Es importante recalcar que existen estudios que han reportado un comportamiento no monotónico en las tres sustancias: BPA, DEHP y DBP (Beausoleil et al., 2016), por lo que pese a que las dosis de ingesta obtenidas no exceden los límites establecidos por la EFSA, estas sustancias no son seguras a ninguna concentración.

Cuadro 22. Dosis preliminar asociada al consumo de especies marinas en estudio

Especie	Analito	Cantidad de muestras	Concentración promedio (µg/g muestra)	TDI alimentos (EFSA) (µg/kg bw/d)	Dosis ingesta diaria (ug/kg bw/d)
Piangua	BPA	15	0.014 ± 0.006	4	0.004
Piangua	DEHP	15	0.13 ± 0.01	50	0.033
Piangua	DBP	7	0.017 ± 0.002	10	0.004
Jaiba	BPA	5	0.028 ± 0.006	4	0.007
Jaiba	DEHP	5	0.03 ± 0.01	50	0.008
Jaiba	DBP	1	0.059 ± 0.002	10	0.015
Corvina	BPA	7	0.009 ± 0.006	4	0.002

Corvina	DEHP	12	0.04 ± 0.01	50	0.010
Corvina	DBP	8	0.019 ± 0.002	10	0.005

6. CONCLUSIONES

La validación de la metodología de cuantificación para BPA en tejido de especies marinas, específicamente piangua, jaiba y corvina genera resultados que son confiables al cumplir con los parámetros de desempeño de: linealidad al obtener un r^2 de 0.9952, siendo mayor que 0.995, de exactitud al obtener una porcentaje de recuperación 97%, siendo mayor que 80%, con un límite de detección de 0.002 $\mu\text{g} / \text{g}$ muestra, menor que 0.06 $\mu\text{g} / \text{g}$ muestra y un límite de cuantificación de 0.006 $\mu\text{g} / \text{g}$ muestra, menor que 0.12 $\mu\text{g} / \text{g}$ muestra.

La validación de la metodología de cuantificación para DEHP en tejido de especies marinas, específicamente piangua, jaiba y corvina genera resultados que son confiables al cumplir con los parámetros de desempeño de: linealidad al obtener un r^2 de 0.9997, siendo mayor que 0.995, de exactitud al obtener una porcentaje de recuperación 84%, siendo mayor que 80%, con un límite de detección de 0.002 $\mu\text{g} / \text{g}$ muestra, menor que 0.15 $\mu\text{g} / \text{g}$ muestra y un límite de cuantificación de 0.006 $\mu\text{g} / \text{g}$ muestra, menor que 0.3 $\mu\text{g} / \text{g}$ muestra.

La validación de la metodología de cuantificación para DBP en tejido de especies marinas, específicamente piangua, jaiba y corvina genera resultados que son confiables al cumplir con los parámetros de desempeño de: linealidad al obtener un r^2 de 0.9993, siendo mayor que 0.995, de exactitud al obtener una porcentaje de recuperación 88%, siendo mayor que 80%, con un límite de detección de 0.002 $\mu\text{g} / \text{g}$ muestra, menor que 0.03 $\mu\text{g} / \text{g}$ muestra y un límite de cuantificación de 0.008 $\mu\text{g} / \text{g}$ muestra, menor que 0.06 $\mu\text{g} / \text{g}$ muestra.

En piangua, se encontraron rangos de concentraciones de 0.008 - 0.039 μg de BPA / g muestra, 0.01 – 1.41 μg de DEHP/ g muestra y 0.013 – 0.025 μg de DBP / g muestra.

En jaiba, se encontraron rangos de concentraciones de 0.007 – 0.076 μg de BPA / g muestra, 0.01 – 0.1 μg de DEHP/ g muestra y 0.059 – 0.059 μg de DBP / g muestra.

En corvina, se encontraron rangos de concentraciones de 0.006 – 0.018 μg de BPA / g muestra, 0.01 – 0.08 μg de DEHP/ g muestra y 0.013 – 0.022 μg de DBP / g muestra.

En el escenario donde se tiene una masa corporal de 70 kg y se consume 17.50 g por día, el consumo de jaiba, piangua y corvina proveniente del golfo de Nicoya no presenta un riesgo por ingesta de los plastificantes BPA, DEHP y DBP. Sin embargo, debe considerarse su inseguridad a cualquier concentración.

Este estudio abre la posibilidad de cuantificar otros plastificantes presentes en más especies marinas de consumo y alimentos, de manera que se generen más datos sobre otras rutas de exposición a estos compuestos.

7. RECOMENDACIONES

Se recomienda completar la validación de ambas metodologías de cuantificación de BPA, DEHP y DBP en tejido de animales marinos calculando la precisión.

Es recomendable realizar estudios con un mayor tamaño de muestra y más puntos de muestreo para obtener resultados más representativos.

Se recomienda tomar las muestras directamente del golfo, controlando así el almacenamiento y transporte de las muestras desde el sitio de muestreo hasta el laboratorio.

8. REFERENCIAS

- Adeyi, A. A., & Babalola, B. A. (2019). Bisphenol-A (BPA) in Foods commonly consumed in Southwest Nigeria and its Human Health Risk. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53790-2>
- Aguirre, J., Ortiz, M., Izagirre, U., Etxebarria, N., Espinoza, F., & Marigómez, I. (2019). Prospective biomonitor and sentinel bivalve species for pollution monitoring and ecosystem health disturbance assessment in mangrove-lined Nicaraguan coasts. *The Science of the Total Environment*, 649, 186–200. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.08.269>
- Amirav, A., Fialkov, A. B., Alon, T., Amirav, A., Fialkov, A. B., & Alon, T. (2013). What Can Be Improved in GC-MS—When Multi Benefits Can Be Transformed into a GC-MS Revolution. *International Journal of Analytical Mass Spectrometry and Chromatography*, 1(1), 31–47. <https://doi.org/10.4236/IJAMSC.2013.11005>
- AOAC. (2016). *Guidelines for Standard Method Performance Requirements. Appendix F*. http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf
- Arguedas, M., Bouroncle, C., & Cifuentes, M. (2014). *Percepción de las comunidades marino-costeras del Golfo de Nicoya sobre los manglares, Costa Rica*. https://www.researchgate.net/publication/318337605_Percepcion_de_las_comunidades_marino-costeras_del_Golfo_de_Nicoya_sobre_los_manglares_Costa_Rica
- Asuero, A. G., Sayago, A., & González, A. G. (2006). The Correlation Coefficient: An Overview. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 36, 41–59. <https://doi.org/10.1080/10408340500526766>
- ATSDR. (2001). *TOXICOLOGICAL PROFILE FOR DI-n-BUTYL PHTHALATE*.
- ATSDR. (2019). *Módulo III - Introducción a la evaluación de riesgo | Notas para la instrucción / ATSDR en Español*. https://www.atsdr.cdc.gov/es/training/toxicology_curriculum/modules/3/es_lecturenotes.html
- Ballesteros, D., Vargas, M., Brenes, C., Tisseaux, A., & Cambronero, S. (2018). *Estudio de las condiciones oceanográficas en el Golfo de Nicoya para el Proyecto de Granjas Ostrícolas*.

- https://www.researchgate.net/publication/329045146_Estudio_de_las_condiciones_ocenograficas_en_el_Golfo_de_Nicoya_para_el_Proyecto_de_Granjas_Ostricolas
- Beausoleil, C., Beronius, A., Bodin, L., Bokkers, B. G. H., Boon, P. E., Burger, M., Cao, Y., De Wit, L., Fischer, A., Hanberg, A., Leander, K., Litens-Karlsson, S., Rousselle, C., Slob, W., Varret, C., Wolterink, G., & Zilliacus, J. (2016). Review of non-monotonic dose-responses of substances for human risk assessment. *EFSA Supporting Publications*, 13(5). <https://doi.org/10.2903/SP.EFSA.2016.EN-1027>
- Bilbao, A. (2015). *Desengancharse del plástico Problemas de un material ubicuo*. <https://www.ecologistasenaccion.org/wp-content/uploads/adjuntos-spip/pdf/informe-plastico.pdf>
- Bliesner, D. M. (2006). Appendix I: Glossary of Methods Validation Terms. *Validating Chromatographic Methods*, 57–71. <https://doi.org/10.1002/0470042206.APP1>
- Boris Duffau, Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M., Aguilera, M., & Sandoval, S. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos.”*
- Cárdenas, S. (2012). Biología y acuicultura de corvinas en el mundo. *Revista AquaTIC*, 37, 1–13.
- Castro, M., & Jiménez, J. (2021). *Atlas Marino-Costero del Golfo de Nicoya* (Fundación). [https://www.marviva.net/sites/default/files/2021-12/Atlas Golfo Nicoya web.pdf](https://www.marviva.net/sites/default/files/2021-12/Atlas%20Golfo%20Nicoya%20web.pdf)
- Chamas, A., Moon, H., Zheng, J., Qiu, Y., Tabassum, T., Jang, J. H., Abu-Omar, M., Scott, S. L., & Suh, S. (2020). Degradation Rates of Plastics in the Environment. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 8(9), 3494–3511. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b06635>
- Chero, J., Iannacone, J., Cruces, C., Sáez, G., & Alvarino, L. (2014). *Comunidad de metazoos parásitos de la corvina cilus Gilberti (Abbott, 1899) (Perciformes: Sciaenidae) en la zona costera de Chorrillos, Lima, Perú*. 163–182. <https://biblat.unam.mx/es/revista/neotropical-helminthology/articulo/comunidad-de-metazoos-parasitos-de-la-corvina-cilus-gilberti-abbott-1899-perciformes-sciaenidae-en-la-zona-costera-de-chorrillos-lima-peru>

- Corcoran, P., Biesinger, M., & Grifi, M. (2009). Plastics and beaches: A degrading relationship. *Marine Pollution Bulletin*, 58, 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.08.022>
- Costa, M. F., Ivar Do Sul, J. A., Silva-Cavalcanti, J. S., Araújo, M. C. B., Spengler, Â., & Tourinho, P. S. (2010). On the importance of size of plastic fragments and pellets on the strandline: a snapshot of a Brazilian beach. *Environmental Monitoring and Assessment*, 168(1–4), 299–304. <https://doi.org/10.1007/S10661-009-1113-4>
- Cverenkárová, K., Valachovičová, M., Mackul’ak, T., Žemlička, L., & Bírošová, L. (2021). Microplastics in the Food Chain. *Life (Basel, Switzerland)*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/LIFE11121349>
- Drzewiecka, M., Beszterda, M., Frańska, M., & Frański, R. (2021). 2,2-Bis(4-Hydroxyphenyl)-1-Propanol—A Persistent Product of Bisphenol A Bio-Oxidation in Fortified Environmental Water, as Identified by HPLC/UV/ESI-MS. *Toxics 2021, Vol. 9, Page 49*, 9(3), 49. <https://doi.org/10.3390/TOXICS9030049>
- Duffau, B., Rojas, F., Guerrero, I., Roa, L., Rodríguez, L., Soto, M., Aguilera, M., & Sandoval, S. (2010). *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: “Aspectos generales sobre la validación de métodos.”*
- EFSA. (2015a). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*, 13(1). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2015.3978>
- EFSA. (2015b). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*, 13(1). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2015.3978>
- EFSA. (2021, December 15). *Bisphenol A: EFSA draft opinion proposes lowering the tolerable daily intake* | EFSA. <https://www.efsa.europa.eu/en/news/bisphenol-efsa-draft-opinion-proposes-lowering-tolerable-daily-intake>
- Ekvall, M. T., Lundqvist, M., Kelpsiene, E., Šileikis, E., Gunnarsson, S. B., & Cedervall, T. (2019). Nanoplastics formed during the mechanical breakdown of daily-use polystyrene products. *Nanoscale Advances*, 1(3), 1055–1061. <https://doi.org/10.1039/C8NA00210J>

- Eriksen, M., Thiel, M., & Lebreton, L. (2016). Nature of Plastic Marine Pollution in the Subtropical Gyres. *Handbook of Environmental Chemistry*, 78, 135–162. https://doi.org/10.1007/698_2016_123
- Esteban Gamboa-García, D., Duque, G., Cogua, P., & Luis Marrugo-Negrete, J. (2020). Mercury dynamics in macroinvertebrates in relation to environmental factors in a highly impacted tropical estuary: Buenaventura Bay, Colombian Pacific. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 4044–4057. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06970-6>
- Eurachem/CITAC. (2016). Guide to quality in analytical chemistry - An aid to accreditation. In *Eurachem*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25174426>
- Evers, F. R. (2015). *Development of a Liquid Chromatography Ion Trap Mass Spectrometer Method for Clinical Drugs of Abuse Testing with Automated On-Line Extraction Using Turbulent Flow Chromatography* [University of Portsmouth]. <https://doi.org/10.13140/2.1.2125.1367>
- FAO/OMS. (2015). *COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias Vigésima tercera edición COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS*. www.codexalimentarius.org
- Fernández, D. (2013). PESCA ARTESANAL Y POBREZA EN COMUNIDADES ALEDAÑAS AL GOLFO DE NICOYA. *Ciencias Sociales*, 140, 137–152.
- Fuentes López, A., García Martínez, E. M., & Fernández Segovia, I. (2015). *Procedimiento de extracción en fase sólida dispersiva QuEChERS para el análisis de plaguicidas*. <https://riunet.upv.es/handle/10251/51363>
- García, J. A., Reding-Bernal, A., & López-Alvarenga, J. C. (2013). Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. *Investigación En Educación Médica*, 2(8), 217–224. [https://doi.org/10.1016/S2007-5057\(13\)72715-7](https://doi.org/10.1016/S2007-5057(13)72715-7)
- GESAMP. (2016). *SOURCES, FATE AND EFFECTS OF MICROPLASTICS IN THE MARINE ENVIRONMENT: PART TWO OF A GLOBAL ASSESSMENT*. <http://www.gesamp.org/site/assets/files/1275/sources-fate-and-effects-of-microplastics-in-the-marine-environment-part-2-of-a-global-assessment-en.pdf>

- Gewert, B., Plassmann, M., & Macleod, M. (2015). Pathways for degradation of plastic polymers floating in the marine environment. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 17, 1513–1521. <https://doi.org/10.1039/c5em00207a>
- Godwin, A. D. (2011). Plasticizers. *Applied Plastics Engineering Handbook*, 487–501. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-3514-7.10028-5>
- Gurgel Adeodato Vieira, M., Altenhofen da Silva, M., Oliveira dos Santos, L., & Masumi Beppu, M. (2011). Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. *European Polymer Journal*, 47, 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011>
- Jalal, N., Surendranath, A. R., Pathak, J. L., Yu, S., & Chung, C. Y. (2017). Bisphenol A (BPA) the mighty and the mutagenic. *Toxicology Reports*, 5, 76–84. <https://doi.org/10.1016/J.TOXREP.2017.12.013>
- Jee, J. H., Koo, J. G., Keum, Y. H., Park, K. H., Choi, S. H., & Kang, J. C. (2009). Effects of dibutyl phthalate and di-ethylhexyl phthalate on acetylcholinesterase activity in bagrid catfish, *Pseudobagrus fulvidraco* (Richardson). *Journal of Applied Ichthyology*, 25(6), 771–775. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0426.2009.01331.X>
- Katz, S., Williamson, C., Richardson, C., Mossman, S., Russel, J., Kay, R., & Jaffe, D. (2014). *A History of Plastics*. https://www.bpf.co.uk/plastipedia/plastics_history/Default.aspx
- Koelmans, A. A. (2015). Modeling the role of microplastics in Bioaccumulation of organic chemicals to marine aquatic organisms. Critical Review. *Marine Anthropogenic Litter*, 309–324. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16510-3_11
- Lee, D., & Cooper, J. (2020). Addressing the challenges of changing retention times in GC/GC-MS. *ThermoFisherScientific*.
- Lehtiniemi, M., Hartikainen, S., Nähkö, P., Engström-Öst, J., Koistinen, A., & Setälä, O. (2018). Size matters more than shape: Ingestion of primary and secondary microplastics by small predators. *Food Webs*, 16. <https://doi.org/10.1016/j.fooweb.2018.e00097>
- Magnusson, B., & Örnemark, U. (2014). *The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. www.eurachem.org.

- Manzan-Martins, C., & Paulesu, L. (2021). Impact of bisphenol A (BPA) on cells and tissues at the human materno-fetal interface. *Tissue and Cell*, 73. <https://doi.org/10.1016/J.TICE.2021.101662>
- Marín, B., & Alfaro, J. (2019). *ÉPOCA REPRODUCTIVA DE LA CORVINA REINA Cynoscion albus, aguada C. squamipinnis y picuda C. phoxocephalus, ESPECIES DE ALTO INTERÉS COMERCIAL EN LA ZONA INTERIOR DEL GOLFO DE NICOYA, VERTIENTE DEL PACÍFICO, COSTA RICA.*
- MarViva. (2012). *Guía de identificación de filetes de pescado y mariscos.*
- Maximenko, N., Hafner, J., & Niiler, P. (2012). Pathways of marine debris derived from trajectories of Lagrangian drifters. *Marine Pollution Bulletin*, 65(1–3), 51–62. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2011.04.016>
- Moldoveanu, S. C., & David, V. (2018). Derivatization Methods in GC and GC/MS. *Gas Chromatography - Derivatization, Sample Preparation, Application.* <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.81954>
- Monaghan, M. (2006). La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos. In *Eurachem.*
- Moore, C. J. (2008). Synthetic polymers in the marine environment: a rapidly increasing, long-term threat. *Environmental Research*, 108(2), 131–139. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2008.07.025>
- Nagy, K., & Vékey, K. (2008). Separation methods. *Medical Applications of Mass Spectrometry*, 61–92. <https://doi.org/10.1016/B978-044451980-1.50007-0>
- Namat, A., Xia, W., Xiong, C., Xu, S., Wu, C., Wang, A., Li, Y., Wu, Y., & Li, J. (2021). Association of BPA exposure during pregnancy with risk of preterm birth and changes in gestational age: A meta-analysis and systematic review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 220. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2021.112400>
- Ondarse, D. (2021). *Plástico.* <https://concepto.de/plastico/>
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2021). Grandes cadenas de supermercados en Costa Rica. Efectos de su concentración sobre la producción agropecuaria y la nutrición. *Grandes Cadenas de Supermercados En Costa Rica.* <https://www.fao.org/publications/card/es/c/CB4509ES/>
- Park, J. H., Hwang, M. S., Ko, A., Jeong, D. H., Lee, J. M., Moon, G., Lee, K. S., Kho, Y. H., Shin, M. K., Lee, H. S., Kang, H. S., Suh, J. H., & Hwang, I. G. (2016). Risk

- assessment based on urinary bisphenol A levels in the general Korean population. *Environmental Research*, 150, 606–615. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2016.03.024>
- PlasticsEurope. (2019). *Plastics-the Facts 2019 An analysis of European plastics production, demand and waste data*.
- Prohibición del uso de Bisfenol en los biberones y otros envases dedicados a la alimentación de la niñez N° 35904-S, Pub. L. No. N° 35904-S (2010). http://www.pgrweb.go.cr/scij/Busqueda/Normativa/Normas/nrm_texto_completo.aspx?param1=NRTC&nValor1=1&nValor2=67711&nValor3=80351&strTipM=TC
- Quesada, M., & Cortés, J. (2006). Los ecosistemas marinos del Pacífico sur de Costa Rica: estado del conocimiento y perspectivas de manejo. *Revista de Biología Tropical*, 54(S1), 101–145. <https://doi.org/10.15517/RBT.V54I1.26832>
- Rahman, M., & Brazel, C. (2004). The plasticizer market: an assessment of traditional plasticizers and research trends to meet new challenges. *Progress in Polymer Science*, 29(12), 1223–1248. <https://doi.org/10.1016/J.PROGPOLYMSCI.2004.10.001>
- Research and Markets. (2018). *Global Bisphenol A Market Report 2018: Analysis 2013-2017 & Forecasts 2018-2023*. <https://www.prnewswire.com/news-releases/global-bisphenol-a-market-report-2018-analysis-2013-2017--forecasts-2018-2023-300757673.html>
- Rodríguez, D., Saravia, A., Pacheco, O., & Piedra, G. (2015). EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE HIDROCARBUROS EN SEDIMENTOS MARINOS, SU POSIBLE ORIGEN Y EFECTOS SOBRE LA ACTIVIDAD DE ACUICULTURA ENTRE PUNTA MORALES Y COSTA DE PÁJAROS EN EL GOLFO DE NICOYA. *Revista Geográfica de América Central*, 2(53). <https://doi.org/10.15359/RGAC.2-53.5>
- Rubin, B. (2011). Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(1–2), 27–34. <https://doi.org/10.1016/J.JSBMB.2011.05.002>
- Santos, C. (2014). *Dieta del “curil” Anadara tuberculosa (Sowerby, 1833) a partir del análisis de contenido estomacal e intestinal, en Bahía de Jiquilisco, Departamento de Usulután, El Salvador*. UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA.

- Sarria, R., & Gallo, J. (2016). La gran problemática ambiental de los residuos plásticos: Microplásticos. *Journal de Ciencia e Ingeniería*, 8(1). https://redib.org/Record/oai_articulo1186841-la-gran-problem%C3%A1tica-ambiental-de-los-residuos-pl%C3%A1sticos-micropl%C3%A1sticos
- Schober, P., Boer, C., & Schwarte, L. (2018). Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesthesia and Analgesia*, 126(August), 1763–1768. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002864>
- Shimadzu. (2020). *Basics & Fundamentals: Gas Chromatography*. <https://www.shimadzu.com/an/literature/gc/icc120006.html>
- Silano, V., Barat, J., Bolognesi, C., Chesson, A., Cocconcelli, P. S., Crebelli, R., Gott, D. M., Grob, K., Lampi, E., Mortensen, A., Rivière, G., Steffensen, I. L., Tlustos, C., van Loveren, H., Vernis, L., Zorn, H., Cravedi, J. P., Fortes, C., Tavares Poças, M. de F., ... Castle, L. (2019). Update of the risk assessment of di-butylphthalate (DBP), butylbenzyl-phthalate (BBP), bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), di-isononylphthalate (DINP) and di-isodecylphthalate (DIDP) for use in food contact materials. *EFSA Journal*, 17(12). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2019.5838>
- Silano, V., Manuel Barat Baviera, J., Bolognesi, C., Johannes Brüscheweiler, B., Chesson, A., Sandro Cocconcelli, P., Crebelli, R., Michael Gott, D., Lampi, E., Mortensen, A., Rivière, G., Steffensen, I.-L., van Loveren, H., Vernis, L., Zorn, H., & Cravedi, J.-P. (2019). Draft update of the risk assessment of di-butylphthalate (DBP), butylbenzylphthalate (BBP), bis(2-2 ethylhexyl)phthalate (DEHP), di-isononylphthalate (DINP) 3 and di-isodecylphthalate (DIDP) for use in food contact materials. *EFSA Journal*. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.20YY.NNNN>
- Solomon, O., Ahmed, O., & Eyiwunmi, A. (2018). Mitigation measures to avert the impacts of plastics and microplastics in the marine environment (a review). *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 9293–9310. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1499-z>
- Stroheker, T., Peladan, F., & Paris, M. (2014). Safety of Food and Beverages: Water (Bottled Water, Drinking Water) and Ice. *Encyclopedia of Food Safety*, 3, 349–359. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00295-X>

- Torres, J., & Bobst, S. (2015). *Toxicological Risk Assessment for Beginners*.
<https://doi.org/10.1007/978-3-319-12751-4>
- UNISDR. (2011). *2009 UNISDR Terminología sobre Reducción del Riesgo de Desastres - World / ReliefWeb*. <https://reliefweb.int/report/world/2009-unisdr-terminolog%C3%ADa-sobre-reducci%C3%B3n-del-riesgo-de-desastres>
- US EPA. (2019). *Guidelines for Human Exposure Assessment Risk Assessment Forum*.
www.epa.gov/risk
- van Cauwenberghe, L., Claessens, M., Vandeghechuchte, M. B., Mees, J., & Janssen, C. R. (2013). Assessment of marine debris on the Belgian Continental Shelf. *Marine Pollution Bulletin*, 73(1), 161–169. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2013.05.026>
- Vandenberg, L., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., & Welshons, W. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*, 24(2), 139–177. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2007.07.010>
- Vargas-Zamora, J. A., Vargas-Castillo, R., & Sibaja-Cordero, J. A. (2019). Crustáceos (Decapoda y Stomatopoda) del R.V. Skimmer y R.V. Victor Hensen en el Golfo de Nicoya, Pacífico, Costa Rica. In *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN (Vol. 67, Issue 1)*.
- Wearbeard. (2017). *El plástico nace por accidente*.
<https://www.agenciasinc.es/Visual/Ilustraciones/El-plastico-nace-por-accidente>
- Wu, S., Lv, G., & Lou, R. (2012). Applications of Chromatography Hyphenated Techniques in the Field of Lignin Pyrolysis. *Applications of Gas Chromatography*. <https://doi.org/10.5772/32446>
- Xu, Y., Weng, R., Lu, Y., Wang, X., Zhang, D., Li, Y., Qiu, J., & Qian, Y. (2018). Evaluation of Phthalic Acid Esters in Fish Samples Using Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry with Simplified QuEChERS Technique. *Food Analytical Methods*, 11(12), 3293–3303. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1313-z>
- Yang, M., Park, M. S., & Lee, H. S. (2007). Endocrine Disrupting Chemicals: Human Exposure and Health Risks. [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/10590500600936474](http://Dx.Doi.Org/10.1080/10590500600936474), 24(2), 183–224. <https://doi.org/10.1080/10590500600936474>
- Zeng, E. Y. (2018). Microplastic contamination in aquatic environments: An emerging matter of environmental urgency. *Microplastic Contamination in Aquatic*

Environments: An Emerging Matter of Environmental Urgency, 1–409.
<https://doi.org/10.1016/C2016-0-04784-8>

Zhang, H. (2017). Transport of microplastics in coastal seas. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 199, 74–86. <https://doi.org/10.1016/J.ECSS.2017.09.032>

Zhang, Z. M., Zhang, H. H., Zou, Y. W., & Yang, G. P. (2018). Distribution and ecotoxicological state of phthalate esters in the sea-surface microlayer, seawater and sediment of the Bohai Sea and the Yellow Sea. *Environmental Pollution (Barking, Essex : 1987)*, 240, 235–247. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2018.04.056>

9. APÉNDICES

Apéndice 1: Estructuras químicas de los analitos en estudio.

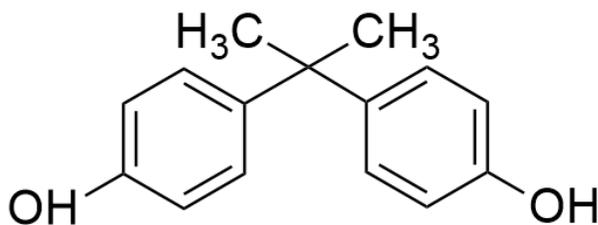


Figura A 1.1 Representación de la estructura química de bisfenol A (BPA). Elaborado con: ChemDraw Ultra (Versión 12.0) [Aplicación]

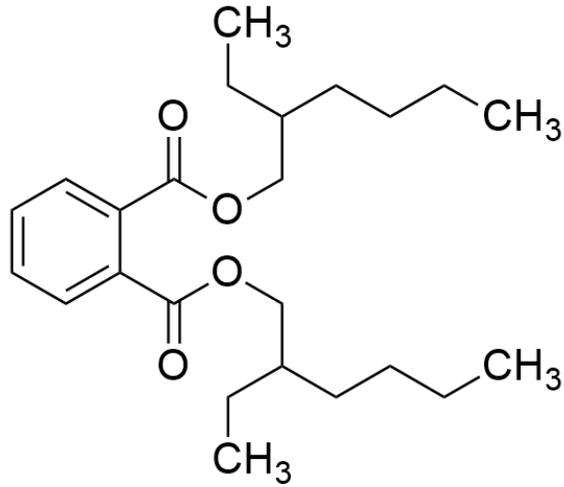


Figura A 1.2 Representación de la estructura química de bis (2-etilhexil) ftalato (DEHP). Elaborado con: ChemDraw Ultra (Versión 12.0) [Aplicación].

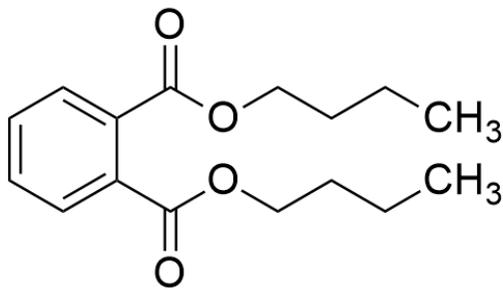


Figura A 1.3 Representación de la estructura química de ftalato de dibutilo (DBP). Elaborado con: ChemDraw Ultra (Versión 12.0) [Aplicación].

Apéndice 2: Procesamiento de las muestras.



Figura A 2.1 Ejemplar de piangua procesado.



Figura A 2.2 Ejemplar de jaiba procesada.



Figura A 2.3 Ejemplar de corvina procesada.



Figura A 2.4 Muestra con disolvente luego de ser agitado.



Figura A 2.5 Tubos QuEChERS para extracción en fase sólida.



Figura A 2.6 Viales de 2 mL listos para la inyección programada en el equipo GC-MS.



Figura A 2.7 Cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas marca Thermo Scientific.

Apéndice 3: Cromatogramas de tiempos de retención y espectros de masas asociados a los analitos BPA, DEHP y DBP.

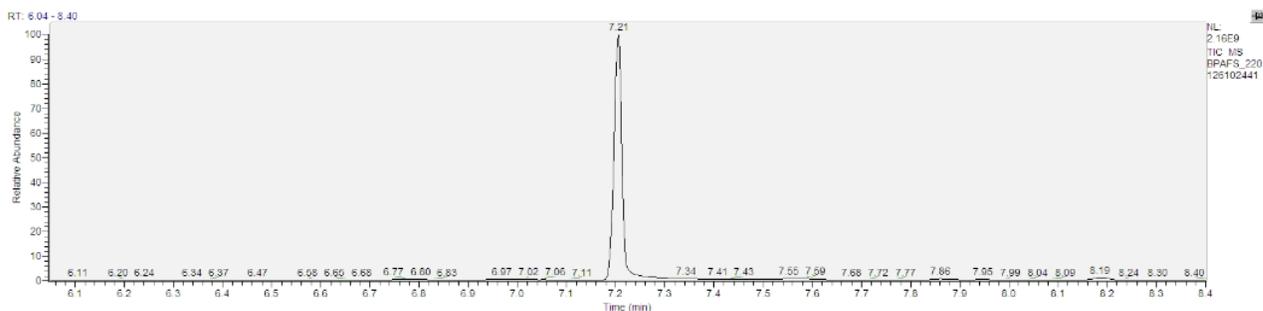


Figura A 3.1 Cromatograma de la abundancia de la señal en un estándar de BPA con respecto al tiempo.

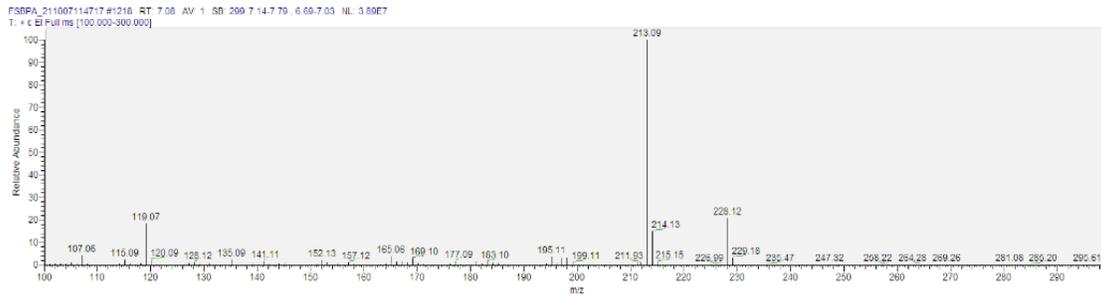


Figura A 3.2 Espectro de masas asociado al estándar de BPA a los 7.21 min.

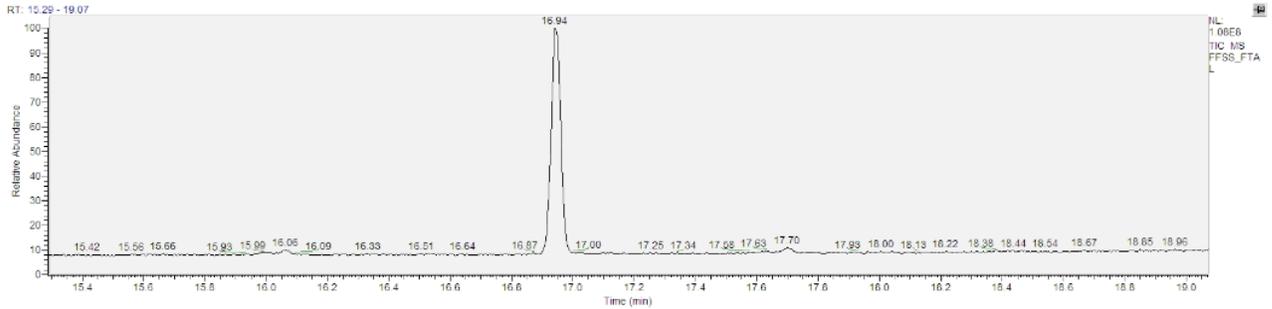


Figura A 3.3 Cromatograma de la abundancia de la señal en un estándar de DEHP con respecto al tiempo.

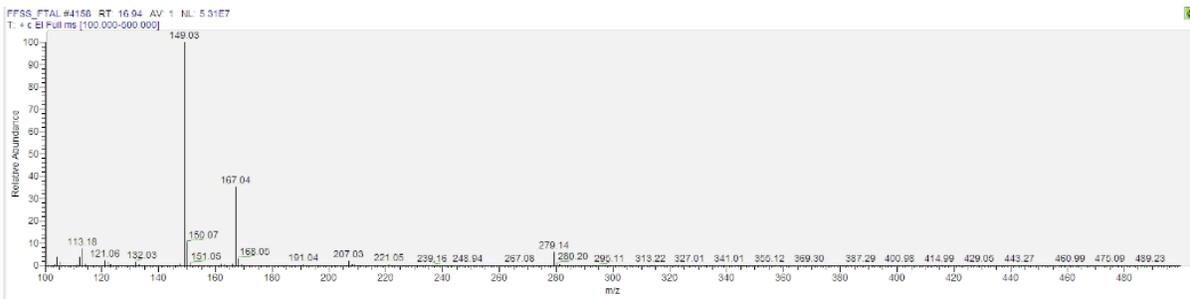


Figura A 3.4 Espectro de masas asociado al estándar de DEHP a los 16.94 min.

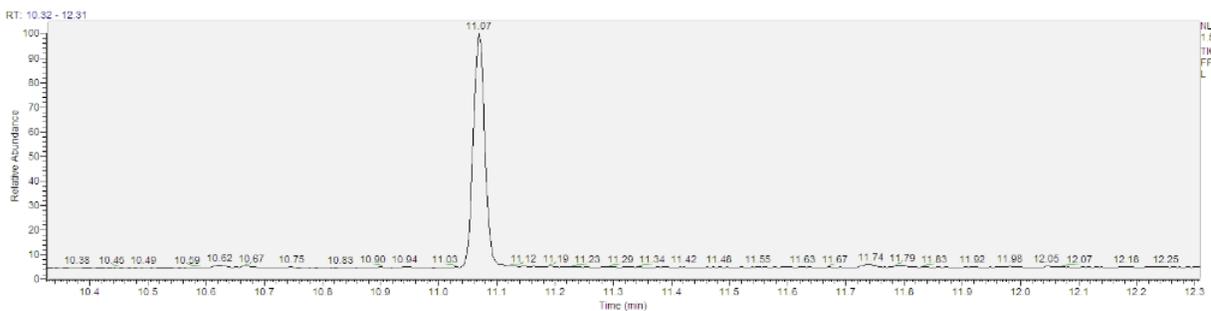


Figura A 3.5 Cromatograma de la abundancia de la señal en un estándar de DBP con respecto al tiempo.

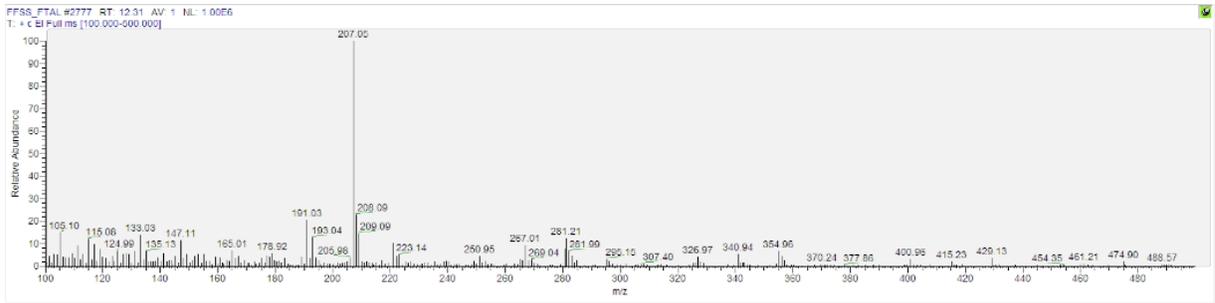


Figura A 3.6 Espectro de masas asociado al estándar de DBP a los 11.07 min.

Apéndice 4: Ejemplificación de cromatogramas asociados a las curvas de calibración y muestras en estudio.

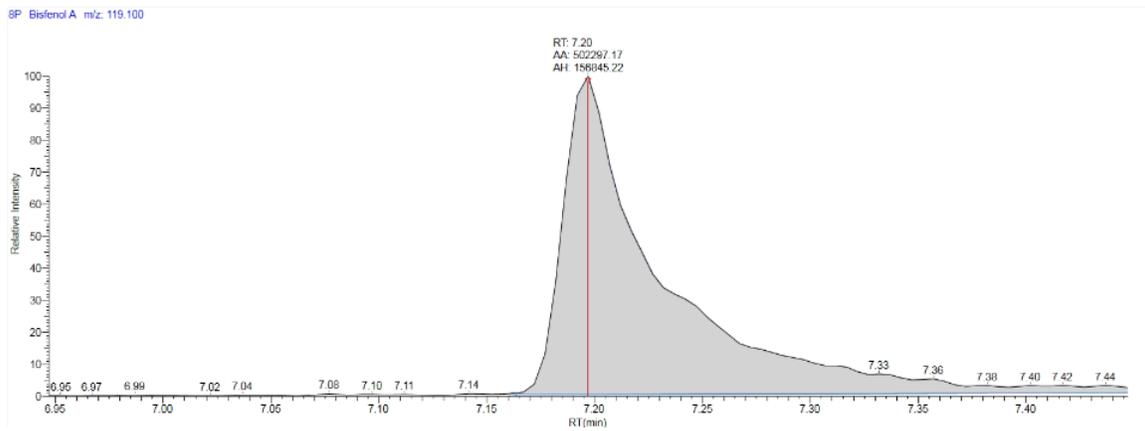


Figura A 4.1 Señal detectada del patrón 8 en la curva de calibración para BPA.

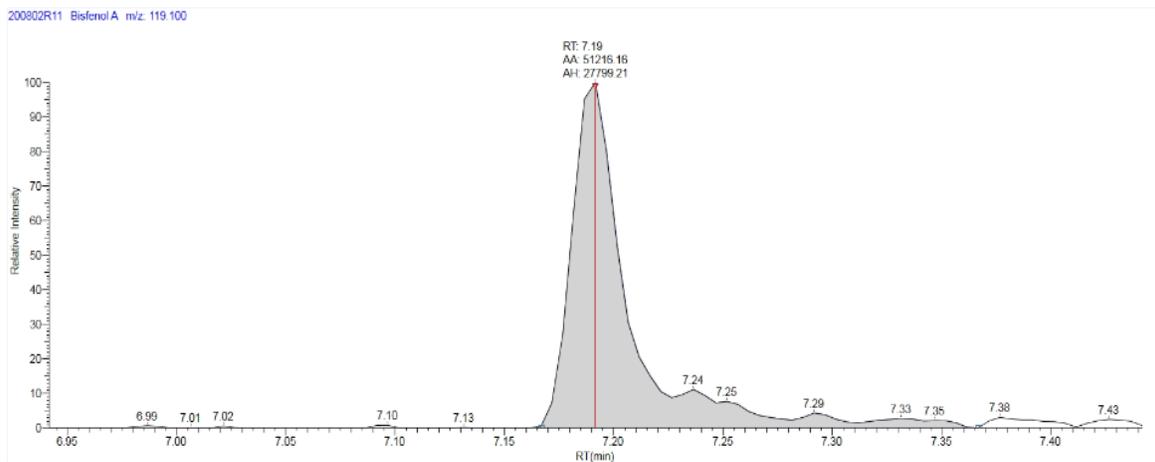


Figura A 4.2 Señal detectada de BPA en una muestra de jaiba.

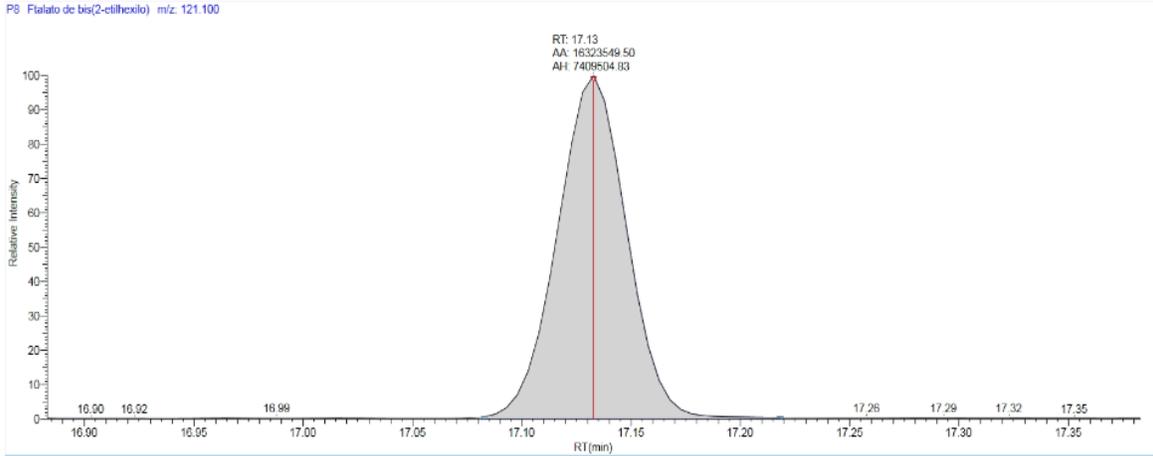


Figura A.4.3 Señal detectada del patrón 8 en la curva de calibración para DEHP.

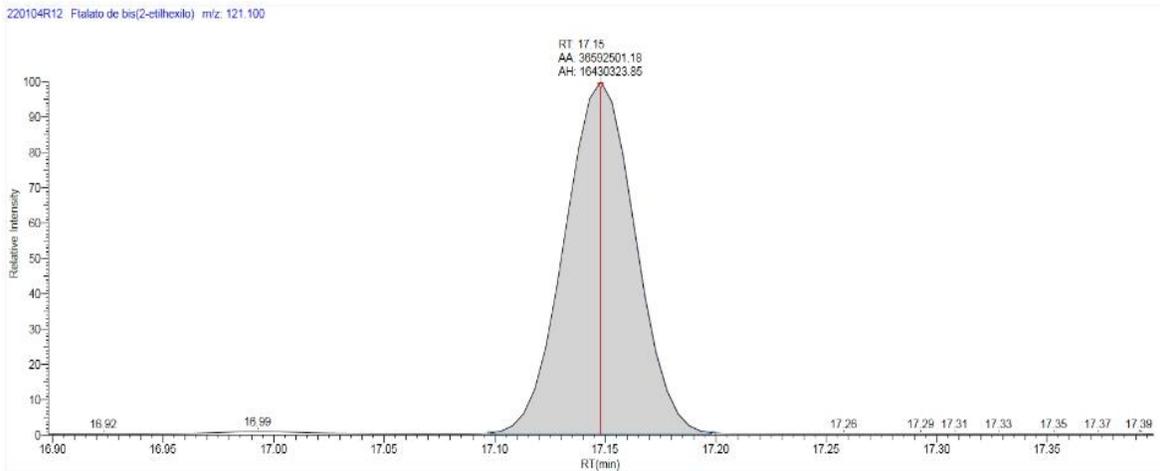


Figura A.4.4 Señal detectada de DEHP en una muestra de piangua.

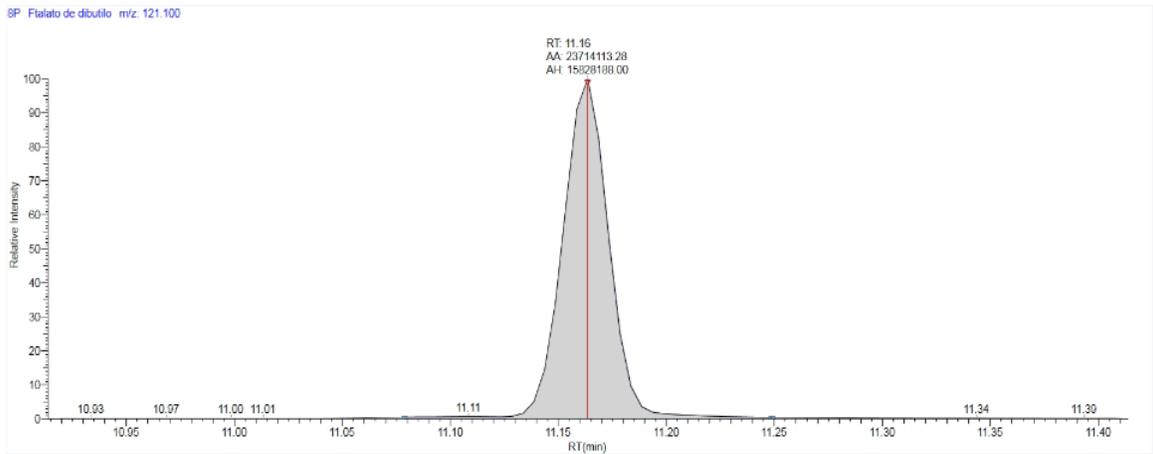


Figura A.4.5 Señal detectada del patrón 8 en la curva de calibración para DBP.

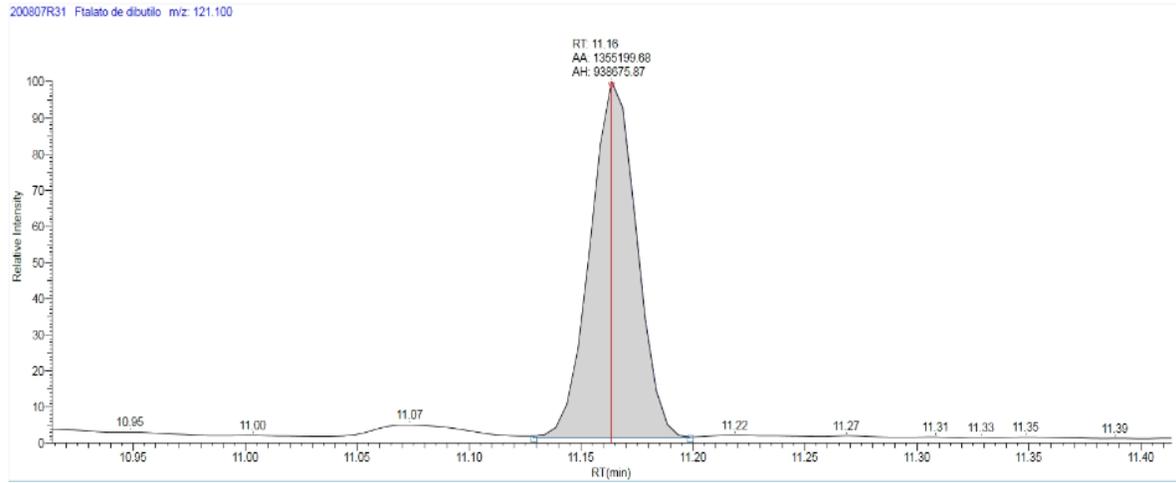


Figura A 4.6 Señal detectada de DBP en una muestra de piangua.

Apéndice 5: Resultados de concentraciones de BPA, DEHP y DBP para cada muestra

Cuadro A 5.1 Resultados de concentraciones de BPA, DEHP y DBP en muestras de animales marinos.

Especie	Número de muestra	Concentración (± 0.006 $\mu\text{g BPA} / \text{g muestra}$)	Concentración (± 0.01 $\mu\text{g DEHP} / \text{g muestra}$)	Concentración (± 0.002 $\mu\text{g DBP} / \text{g muestra}$)
Piangua	1	0,018	0,09	0,008
Piangua	2	0,039	0,08	0,018
Piangua	3	0,015	0,02	0,016
Piangua	4	0,015	0,02	ND
Piangua	5	0,010	0,06	0,017
Piangua	6	0,009	0,01	0,013
Piangua	7	0,010	0,02	ND
Piangua	8	0,011	0,03	0,009
Piangua	9	0,015	0,01	ND
Piangua	10	0,016	0,02	ND
Piangua	11	0,008	0,03	ND
Piangua	12	0,011	0,02	ND
Piangua	13	0,013	0,04	ND
Piangua	14	0,011	1,40	0,011
Piangua	15	0,011	0,06	ND
Jaiba	16	0,076	0,10	0,059
Jaiba	17	0,038	0,01	ND
Jaiba	18	0,013	0,01	ND
Jaiba	19	0,007	0,01	ND
Jaiba	20	0,009	0,02	ND
Corvina	21	ND	0,07	0,015
Corvina	22	ND	0,04	0,021
Corvina	23	ND	0,05	0,022
Corvina	24	ND	0,06	0,021
Corvina	25	ND	0,07	0,020
Corvina	26	0,006	0,07	0,022
Corvina	27	0,009	0,08	ND
Corvina	28	0,018	0,02	ND
Corvina	29	0,007	0,01	ND
Corvina	30	0,008	0,02	0,009
Corvina	31	0,010	0,02	0,010
Corvina	32	0,008	0,01	ND

Apéndice 6: Distribución de las concentraciones de los analitos en las muestras de animales marinos de consumo.

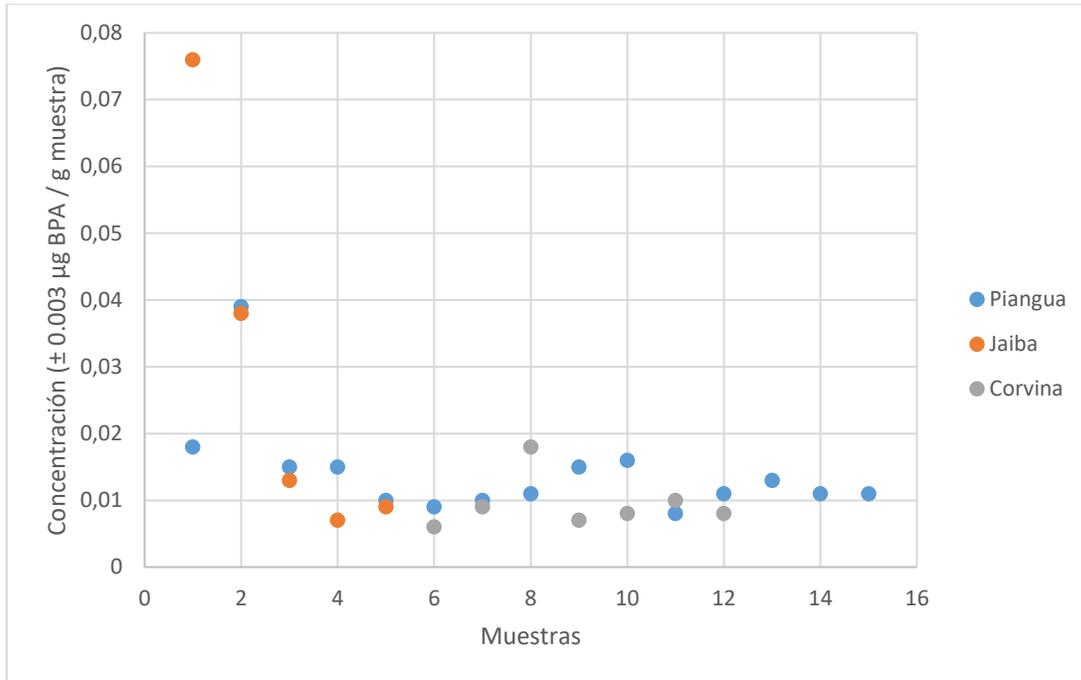


Figura A 6.1 Dispersión de la concentración de BPA en muestras de especies marinas.

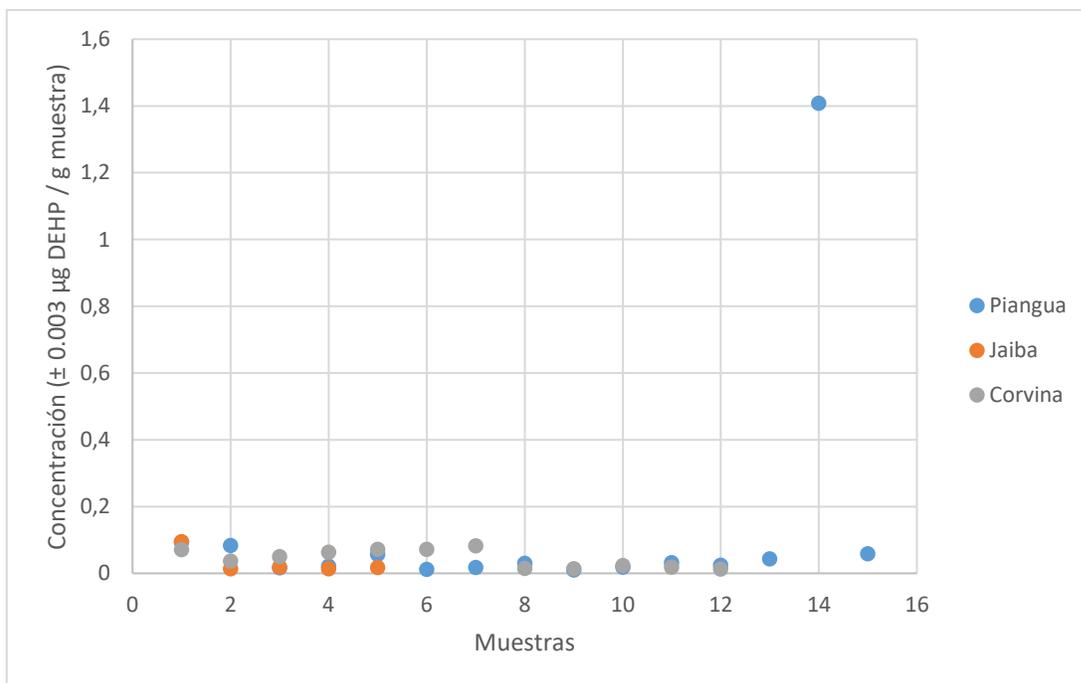


Figura A 6.2 Dispersión de la concentración de DEHP en muestras de especies marinas.

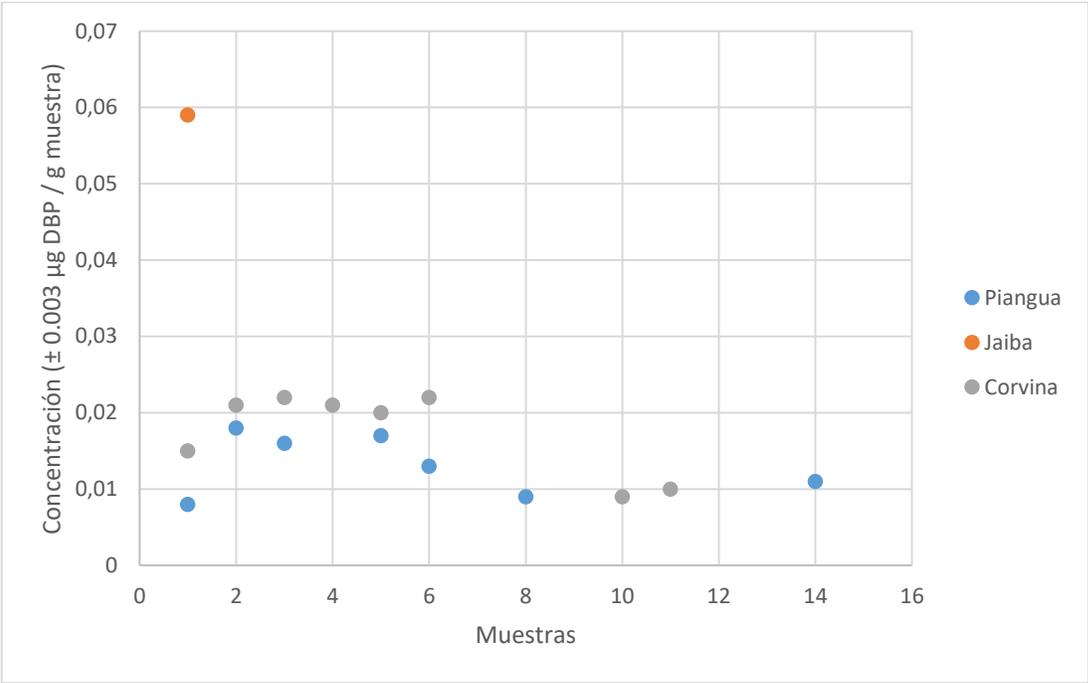


Figura A 6.3 Dispersión de la concentración de DBP en muestras de especies marinas.