



MÁSTER INTERUNIVERSITARIO EN QUÍMICA

MEMORIA DEL TRABAJO FIN DE MÁSTER

CURSO ACADÉMICO:

CONVOCATORIA: 1ª

2ª

UNIVERSIDAD:

TÍTULO DEL TRABAJO:

Disolventes supramoleculares con propiedades de acceso restringido para la extracción de bisfenoles y derivados en saliva

ESTUDIANTE:

Encarnación Romera García

TUTOR(es):

Soledad Rubio Bravo

Fecha: 09/12/2015

VºBº Tutor(es)

Fdo: Soledad Rubio Bravo

El Estudiante

Fdo: Encarnación Romera García

Índice general

Índice de figuras	4
Índice de tablas	5
Resumen	6
Palabras clave	7
Abstract	8
Keywords	8
1. Introducción	9
1.1 Objetivos.....	16
2. Materiales y métodos	18
2.1 Reactivos.....	18
2.2 Disoluciones.....	19
2.3 Equipos y accesorios.....	19
2.4 Método para la determinación de bisfenoles en saliva humana.....	20
2.4.1 Antecedentes.....	20
2.4.2 Disolución de simulación de la saliva humana.....	30
2.4.3 Diagrama de fases de la mezcla ternaria hexanol/tetrahidrofurano/simulante.....	30
2.4.4 Ecuación que predice el volumen de disolvente supramolecular.....	31
2.4.5 Control de la contaminación.....	32
2.4.6 Estudio de selectividad.....	34
2.4.7 Estudio de recuperación.....	34
3. Resultados y discusión	35
3.1 Disolución de simulación de la saliva humana.....	35
3.2 Diagrama de fases de la mezcla ternaria hexanol/tetrahidrofurano/simulante.....	36
3.3 Ecuación que predice el volumen de disolvente supramolecular.....	38
3.4 Control de la contaminación.....	41
3.5 Estudio de selectividad.....	43
3.6 Estudio de recuperación.....	45
4. Conclusiones	47
5. Conclusions	48
6. Bibliografía	49

Índice de figuras

Figura 1. TIC (total ion chromatogram) y XICs (extracted ion chromatograms) para los bisfenoles y derivados clorados investigados (concentración de cada compuesto = $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).....	25
Figura 2. Esquema del método analítico propuesto para la determinación de bisfenoles y derivados.....	29
Figura 3. Esquema de algunos de los tubos de centrifuga empleados para la determinación del diagrama de fases y la ecuación. (d.i.: diámetro interno, d.e.: diámetro externo).....	32
Figura 4. Esquema de las distintas partes del sistema de cromatografía de líquidos...	33
Figura 5. A) Diagrama de fases de la mezcla ternaria hexanol/THF/simulante ($n = 107$). B) Diagrama de fases de la mezcla ternaria hexanol/THF/agua. C) Representación conjunta de A y B.....	36
Figura 6. Representación del volumen de disolvente supramolecular observado frente al predicho por la ecuación propuesta ($n = 58$).....	41
Figura 7. Cromatogramas de blancos analíticos procedentes del extracto reconstituido con: A) agua-metanol (50:50, v:v) y B) metanol-búfer formiato amónico/ácido fórmico (50:50, v:v).....	42
Figura 8. Cromatogramas de muestras de control analítico procedentes del extracto reconstituido con: A) agua-metanol (50:50, v:v) y B) metanol-búfer formiato amónico/ácido fórmico (50:50, v:v).....	43

Índice de tablas

Tabla 1. Estructura de los bisfenoles en estudio.....	11
Tabla 2. Concentraciones de bisfenoles halladas en diferentes matrices biológicas....	13
Tabla 3. Pesos moleculares de los analitos y estándares internos, iones precursor y producto seleccionados para cada uno de ellos y algunos parámetros del espectrómetro de masas dependientes de estos compuestos.....	22
Tabla 4. Parámetros optimizados para la ionización de los bisfenoles y derivados clorados (modo negativo) y de los bisfenoles diglicidil éter (modo positivo).....	23
Tabla 5. Composición de la fase móvil para la separación cromatográfica de los bisfenoles.....	23
Tabla 6. Coeficientes de reparto octanol-agua de los analitos, tiempos de retención de los mismos y algunos parámetros instrumentales dependientes de estos compuestos.....	24
Tabla 7. Composición del simulante.....	30
Tabla 8. Componentes que constituyen el 1% de la saliva humana.....	35
Tabla 9. Volumen de disolvente supramolecular, con su desviación estándar relativa (n=3), que se forma en función del porcentaje de hexanol y tetrahidrofurano usados, y factor de preconcentración que se consigue para cada composición.....	39
Tabla 10. Valores de SSE (%) obtenidos para bisfenoles y sus derivados en función del porcentaje de THF, y su respectiva desviación estándar (n=3).....	44
Tabla 11. Recuperación, con su desviación estándar relativa (n=3), obtenida al emplear simulante fortificado con $4,48 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada uno de los analitos, y límite de cuantificación del método para cada composición.....	46

Resumen

Se ha desarrollado un método para la determinación de bisfenoles, bisfenoles diglicidil éter y sus derivados clorados en saliva artificial. Este se basa en la extracción de los bisfenoles con un disolvente supramolecular (SUPRAS) formado en presencia del simulante, mediante la adición de hexan-1-ol y tetrahidrofurano. Para la separación y determinación de los analitos se emplea cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem, de acuerdo a un procedimiento previamente descrito.

Los SUPRASs basados en alcoholes son líquidos de acceso restringido (SUPRAS-RAM), mediante su utilización se lleva a cabo de manera simultánea la extracción de los compuestos y purificación de la muestra. Esto simplifica enormemente la etapa de pretratamiento de muestra requerida para matrices biológicas, debida a la complejidad de su composición. Además, estos disolventes ofrecen dos microambientes de diferente polaridad que permiten la extracción de una amplia variedad de compuestos.

La determinación del diagrama de fases de la mezcla ternaria hexanol/THF/simulante ha confirmado que las sales favorecen la agregación del tensioactivo y que, por tanto, la región de coacervación es más amplia respecto a cuando se usa agua como agente coacervante. En el intervalo del 4% al 7% de hexanol, el volumen de SUPRAS que se forma sigue una tendencia lineal con respecto al porcentaje de hexanol y exponencial con respecto al porcentaje de tetrahidrofurano. A partir de ello, se ha determinado una ecuación que predice el volumen de SUPRAS en función de los porcentajes de hexanol y tetrahidrofurano, con un coeficiente de determinación del 98,53%.

En el método propuesto, los componentes de la matriz no producen supresión ni aumento de la señal de los analitos, para ninguna de las composiciones de SUPRAS ensayadas. La composición de la mezcla para la formación del SUPRAS que se ha considerado óptima, en base las recuperaciones conseguidas, es: 4% de hexanol, 30% de THF y 66% de saliva artificial (porcentajes expresados en v/v/v).

El interés de este método reside en la necesidad de la multideterminación en muestras biológicas de estos alteradores endocrinos, los bisfenoles, para evaluar el efecto combinado que pueden producir sobre el organismo y así aportar evidencias científicas, para que el uso de estos compuestos sea legislado.

Palabras clave: bisfenoles, bisfenoles clorados, bisfenoles diglicidil éteres, saliva, materiales de acceso restringido, disolventes supramoleculares, cromatografía de líquidos, espectrometría de masas en tándem.

Abstract

A method for the determination of bisphenols, chlorinated bisphenols and their diglycidyl ether derivatives in artificial saliva has been developed. It is based on the extraction of the target compounds with a supramolecular solvent (SUPRAS) obtained *in situ* by addition of hexan-1-ol and tetrahydrofuran to artificial saliva. Separation and determination of analytes is carried out by liquid chromatography tandem mass spectrometry, according to a previously described procedure.

Alkanol-based supramolecular solvents are restricted access liquids (SUPRAS-RAM) able to both extract compounds and remove interferences. So, their use has the potential to greatly simplify sample treatment in biological analysis. Additionally, these solvents provide two different polarity microenvironments, so solutes in a wide polarity range can be solubilized.

The determination of the phase diagram of the mixture hexanol/THF/saliva simulant has confirmed that the salts present in the simulant promote aggregation of the surfactant and therefore the region of coacervation is broader compared to that obtained in the presence of water. In the range from 4% to 7% hexanol, the volume of SUPRAS formed is linearly and exponentially dependent on the percentage of hexanol and tetrahydrofuran, respectively. An equation has been derived for prediction of the volume of SUPRAS as a function of the percentages of hexanol and tetrahydrofuran used in the synthesis. The coefficient of determination for this equation was 98.53%.

In the proposed method, the matrix components did not produce signal suppression or enhancement for any of the target bisphenols. SUPRASs giving the maximal recoveries were those obtained from ternary mixtures of 4% hexanol, 30% THF and 66% artificial saliva (percentages expressed by v/v/v).

This method meets the requirements for the determination of mixtures of bisphenols in saliva and it is able to be used in epidemiological studies intended to determine their effect and thus to obtain scientific evidence to legislate their use.

Keywords: bisphenols, chlorinated bisphenols, diglycidyl ether bisphenols, saliva, restricted access materials, supramolecular solvents, liquid chromatography tandem mass spectrometry.

1. Introducción.

El bisfenol A (BPA) es un compuesto químico que se utiliza principalmente en la síntesis de policarbonatos y resinas epoxi [1-3]. Los policarbonatos, debido a sus usos, se encuentran frecuentemente en contacto con productos alimenticios; son el material base en la producción de botellas para bebidas, envases para alimentos, utensilios de cocina y tuberías conductoras de agua. De forma similar, las resinas epoxi constituyen el revestimiento interno de latas, tapas de recipientes de vidrio, tanques de almacenamiento y tuberías conductoras de agua. Además se usan en selladores dentales. Otro pequeño porcentaje, de la producción total de BPA, se destina a su utilización como revelador del color en papel térmico, antioxidante en la fabricación de poli(cloruro de vinilo) (PVC) y bloque de construcción monomérico de polímeros resistentes al fuego [1-3]. Para poder cubrir la demanda de todas estas aplicaciones, la producción mundial de BPA se espera que supere los 5,4 millones de toneladas en 2015 [4].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define alterador endocrino como cualquier compuesto químico que altera una o varias funciones del sistema hormonal y que causa, de este modo, efectos adversos en la salud, no solo de un organismo intacto sino también de su progeie [5]. El BPA es considerado por la OMS un alterador endocrino ya que exhibe efectos estrogénicos y antiandrogénicos [6]. Numerosos autores han estudiado la correlación que existe entre los niveles de BPA hallados y alteraciones en el sistema reproductor masculino y femenino (pubertad precoz, reducción de la fecundidad), desarrollo de tumores en órganos hormono-dependientes (cáncer de mama o de tiroides), alteraciones en el desarrollo del sistema neurológico, así como enfermedades metabólicas (diabetes, obesidad) [7,8].

Debido a la creciente preocupación por los efectos adversos que el BPA tiene sobre la salud humana, la industria ha comenzado a reemplazarlo por otros bisfenoles [9-13]. Se producen resinas epoxi a partir de bisfenol F (BPF), bisfenol E (BPE), bisfenol P (BPP), bisfenol AP (BPAP) y bisfenol S (BPS). En la fabricación de biberones y otros utensilios para la alimentación infantil, se utiliza BPS como monómero de partida. También, el BPS se usa como revelador del color y el bisfenol Z (BPZ) se emplea como componente de cosméticos y productos de cuidado personal.

Existen muchos más compuestos relacionados que contribuyen a la exposición humana y ambiental a los bisfenoles, como sus derivados clorados y bisfenoles diglicidil éteres. Los bisfenoles diglicidil éteres constituyen los bloques de construcción primarios para las resinas epoxi, lacas basadas en estas resinas y organosoles de resinas vinílicas. Por otro lado, los derivados clorados de los bisfenoles resultan de la reacción de los mismos con hipoclorito de sodio, que se utiliza como agente blanqueante en las fábricas de papel y para la desinfección de agua.

Desafortunadamente, la analogía estructural existente entre estos bisfenoles y el BPA (Tabla 1), hace que sus perfiles de toxicidad también sean similares [14-16]. Diferentes estudios han demostrado que BPF, BPAP, BPS y 2,4-BPS son carcinógenos y provocan los mismos efectos sobre los sistemas reproductor y neurológico que el BPA. Por otro lado, los bisfenoles diglicidil éter parecen tener menor efecto estrogénico, en comparación con los otros bisfenoles, aun así hay estudios que indican que provocan efectos negativos sobre la salud humana [17]. En cuanto a los derivados clorados, se cree que los productos del BPA podrían ser incluso más citotóxicos que el propio BPA [18]. El MCBPA y el DCBPA tienen mayor afinidad por el receptor del α -estrógeno [18] y el TCBPA es un antagonista del receptor X del pregnano [19].

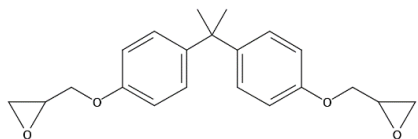
Un hecho importante que hay que tener presente es que los bisfenoles pueden migrar, por contacto directo, desde los productos que los contienen hacia otras matrices. El hecho de que la polimerización no haya sido completa o la degradación del polímero, son factores que favorecen la migración. De igual modo, al emplear los bisfenoles como aditivo, a menudo quedan monómeros sin enlazarse al polímero, lo que facilita su lixiviación. La principal vía de exposición humana a los bisfenoles es la ingesta de alimentos y bebidas [20-23]. Así, numerosos estudios han puesto de manifiesto la migración del BPA desde las botellas y envases hacia las bebidas y alimentos que contienen [24,25], así como la presencia de BPA en alimentos conservados en latas con recubrimiento de resinas epoxi [26,27].

Tabla 1. Estructura de los bisfenoles en estudio.

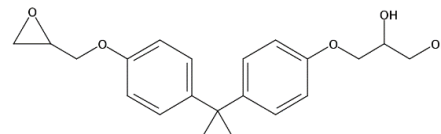
Bisfenoles		
4,4'-Dihydroxydiphenylmethane (BPF)	4,4'-Ethylidenebisphenol (BPE)	2,2'-Bis(4-hydroxyphenyl)propane (BPA)
2,2'-Bis(4-hydroxyphenyl)butane (BPB)	1,1'-Bis(4-hydroxyphenyl)-cyclohexane (BPZ)	1,1'-Bis(4-hydroxyphenyl)-1-phenyl-ethane (BPAP)
2,2'-Bis(4-hydroxyphenyl)hexafluoropropane (BPAF)	Bis(4-hydroxyphenyl)sulfone (BPS)	1,4-Bis(2-(4-hydroxyphenyl)-2-propyl)benzene (BPP)
Derivados clorados del bisfenol A		
2-Chloro-4-[1-(4-hydroxyphenyl)-1-methylethyl]phenol (MCBPA)	4,4'-(1-Methylethylidene)bis[2-chlorophenol] (DCBPA)	2,6-Dichloro-4-[1-(3-chloro-4-hydroxyphenyl)-1-methylethyl]phenol (TCBPA)
4,4'-(1-methylethylidene)bis[2,6-dichloro-phenol] (TeCBPA)		

Tabla 1. Estructura de los bisfenoles en estudio.

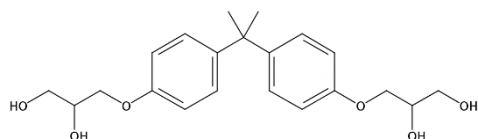
Bisfenoles diglicidil éteres



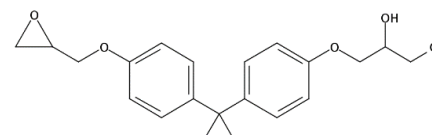
2,2'-Bis[4-glycidyloxyphenyl]propane (BADGE)



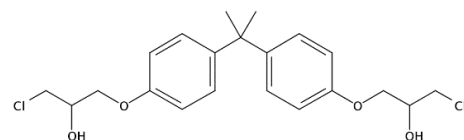
2-[4-(2,3-Dihydroxypropyloxy)phenyl]-2-[4-(glycidyloxy)phenyl]propane (BADGE·H₂O)



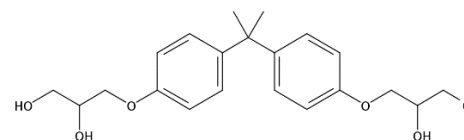
2,2'-Bis[4-(2,3-dihydroxypropoxy)phenyl]propane (BADGE·2H₂O)



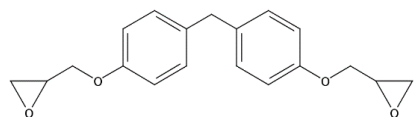
2-[4-(3-Chloro-2-hydroxypropyloxy)phenyl]-2-[4-(glycidyloxy)phenyl]propane (BADGE·HCl)



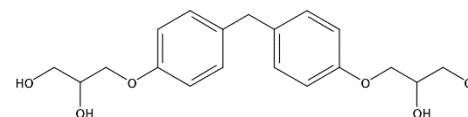
2,2'-Bis[4-(3-chloro-2-hydroxypropoxy)phenyl]propane (BADGE·2HCl)



2-[4-(3-Chloro-2-hydroxypropyloxy)phenyl]-2-[4-(2,3-dihydroxypropyloxy)phenyl]propane (BADGE·HCl·H₂O)



Bis[4-(glycidyloxy)phenyl]methane (BFDGE)



Bis[4-(2,3-dihydroxypropoxy)phenyl]methane (BFDGE·2H₂O)

Otra importante vía de exposición a los bisfenoles es por lixiviación desde los empastes o selladores dentales hacia la saliva. Numerosas investigaciones han puesto de manifiesto el notable aumento de la concentración de bisfenoles en saliva tras recibir estos tratamientos dentales [28-30]. Otras fuentes de exposición son: la absorción dérmica al aplicar productos de higiene personal y cosméticos [31,32], la inhalación de polvo [33] e incluso los filtros de los cigarrillos [34].

Ante las numerosas fuentes de bisfenoles a las que estamos expuestos, cabe esperar su presencia en matrices biológicas como la orina o los tejidos adiposo y placentario. En la Tabla 2 se recogen las concentraciones de distintos bisfenoles halladas en estas matrices biológicas, expresadas como media aritmética de las concentraciones encontradas en los diferentes estudios [35-48].

Tabla 2. Concentraciones de bisfenoles halladas en diferentes matrices biológicas.

Bisfenoles	Orina (ng · g⁻¹)	Suero (ng · g⁻¹)	Tejido placentario (ng · g⁻¹)	Leche materna (ng · g⁻¹)	Tejido adiposo (ng · g⁻¹)	Calostro (ng · g⁻¹)
BPA	4,47	2,91	7,49	0,43	5,83	1,87
BPB	0,68	5,15	-	-	-	-
BPS	-	-	-	0,23	-	-
MCBPA	0,055	-	9,45	nd	3,05	nd
DCBPA	0,048	-	23,3	2,53	9,21	1,96
TCBPA	0,047	-	11,3	0,68	0,74	0,17
TeCBPA	-	-	nd	-	nd	-
BADGE	2,63	-	-	-	-	-
BADGE·H ₂ O	0,221	-	-	-	-	-
BADGE·2H ₂ O	6,59	-	-	-	-	-
BADGE·HCl	< 2	-	-	-	-	-
BADGE·HCl·H ₂ O	0,138	-	-	-	-	-

nd: no detectado

La legislación sobre bisfenoles es muy escasa. La Unión Europea (EU) únicamente ha establecido límites de migración para: BPA (0,6 mg · kg⁻¹) [49], bisfenol A diglicidil éter (BADGE) y sus productos de hidrólisis (9 mg · kg⁻¹) [50], y derivados clorados de BADGE (1 mg · kg⁻¹) [50]. En 2011 prohibió la producción y comercialización de biberones hechos de policarbonato basado en BPA [51]. Por otro lado, la Agencia de Protección Medioambiental de los EEUU (EPA) y la U.S Food and Drugs Administration (FDA) no han regulado el uso de BPA, en espera de evidencias científicas de que estos compuestos provoquen daños en la salud a bajos niveles de exposición [52,53], limitando

su actuación a la elaboración de disposiciones para la eliminación de BPA de algunos productos, como los biberones [53].

Sin embargo, estas restricciones se centran en los bisfenoles sin tener en cuenta el efecto sinérgico y/o aditivo que puede aparecer como consecuencia de la exposición simultánea de bisfenoles a la que los humanos están sometidos. Este fenómeno, denominado efecto cóctel, ocurre con numerosos compuestos químicos. De hecho, para las mezclas de alteradores endocrinos los factores determinantes de la adición son bien conocidos y se han caracterizado [54-56]. Así, alteradores que en un principio a bajos niveles de exposición no se espera que causen daño alguno, pueden trabajar conjuntamente con otros generando un efecto combinado que sí puede resultar negativo.

Teniendo presente lo anteriormente expuesto, se hace imprescindible el desarrollo de metodologías que permitan la identificación y cuantificación simultánea de los bisfenoles y sus derivados clorados y diglicidil éteres, en matrices biológicas. La composición de las matrices biológicas es muy compleja, tienen un alto contenido de proteínas y otras macromoléculas, lípidos, glúcidos, etc. y a menudo presentan gran variabilidad. Como consecuencia, las metodologías analíticas desarrolladas incluyen complejos tratamientos de muestra como la precipitación, la extracción en fase sólida y las columnas de inmunoafinidad, entre otras.

Recientemente, nuestro grupo de investigación, FQM-186, ha desarrollado un método para la determinación simultánea de los 21 bisfenoles y derivados incluidos en la Tabla 1. El método se basa en la microextracción de los bisfenoles con un disolvente supramolecular volátil con propiedades de acceso restringido (V-SUPRAS-RAM) de micelas inversas de hexan-1-ol, seguido de la cuantificación de los mismos mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem.

Los disolventes supramoleculares son líquidos nanoestructurados constituidos por agregados de tensioactivos. Se sintetizan a partir de disoluciones acuosas o hidro-orgánicas de sustancias anfífilas mediante un proceso de autoensamblado inducido por un estímulo externo (modificación del pH o la temperatura, o adición de una sal o disolvente). Se forman espontáneamente nanoestructuras de tensioactivo con diferente densidad que la disolución y se separan de la misma mediante un proceso denominado coacervación [57].

El coacervado contiene una elevada concentración de moléculas anfifílicas ($\text{mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), lo que se traduce en una gran cantidad de sitios de unión para los analitos y, en consecuencia, una alta eficacia de extracción. Además, presenta microambientes de diferente polaridad, uno no polar en las cadenas hidrocarbonadas y otro polar en los grupos alcoholes, lo que hace posible la solubilización de compuestos en un amplio intervalo de polaridad. A estos dos aspectos positivos que conlleva la utilización de SUPRASs, hay que sumar el bajo volumen de reactivo necesario, lo que reduce tanto el impacto ambiental como el coste del proceso.

Los materiales de acceso restringido (RAMs) se han utilizado ampliamente, en las últimas décadas, como adsorbentes para el enriquecimiento de fármacos, sustancias endógenas y xenobióticos, en fluidos biológicos. Mediante su utilización se consigue eliminar interferentes como las proteínas y otros componentes de la matriz, que son excluidos por fenómenos físicos, químicos o físico-químicos [58]. El uso de RAMs, en combinación con la cromatografía de líquidos, simplifica las etapas de pretratamiento de muestra [59,60], agilizando el procedimiento analítico y reduciendo el coste por análisis.

Recientemente, se ha demostrado que los disolventes supramoleculares (SUPRASs), basados en alcoholes, se comportan como líquidos de acceso restringido (SUPRAS-RAM) [61]. Mediante la utilización de estos disolventes, se lleva a cabo de manera simultánea la extracción de los compuestos y purificación de la muestra.

Para obtener en el espectrómetro de masas una señal lo suficientemente intensa para la cuantificación de los bisfenoles diglicidil éter, éstos deben formar aductos. Sin embargo, las sales utilizadas para ello (generalmente sales de amonio añadidas como aditivos a la fase móvil) disminuyen la señal de los bisfenoles [62-64]. Por lo tanto, no puede determinarse simultáneamente la mezcla de bisfenoles y derivados con suficiente sensibilidad, y la determinación secuencial (bisfenoles + bisfenoles clorados y bisfenoles diglicidil éteres) no es aconsejable desde un punto de vista práctico ya que requiere múltiples etapas de lavado para eliminar completamente el ion amonio antes de determinar la mezcla bisfenoles + bisfenoles clorados. En los estudios en los que se han determinado tanto bisfenoles como derivados diglicidil, el análisis se ha tenido que realizar por separado, empleando fases móviles de diferente composición y programas de elución adaptados a cada uno de ellos [65,66].

En el método desarrollado por nuestro grupo de investigación, la formación de los aductos se realiza durante la etapa de tratamiento de la muestra y esto permite la determinación secuencial de bisfenoles + bisfenoles clorados y bisfenoles diglicidil éteres utilizando la misma fase móvil y gradiente de elución, sin tener que realizar etapas de lavado intermedias. De esta forma se consigue la máxima sensibilidad para la cuantificación de todos los analitos, se reduce considerablemente el tiempo de análisis y los costes del mismo.

Un aspecto clave a tener en cuenta es la posible contaminación del material y muestras durante el proceso analítico, debido a la ubicuidad de los bisfenoles; lo que hace que se requieran medidas adicionales para controlar esta contaminación, asegurando la veracidad de los resultados obtenidos.

1.1 Objetivos.

El objetivo general de este trabajo ha sido el desarrollo de un método para la determinación, en saliva, de todos los bisfenoles recogidos en la Tabla 1. La saliva es una matriz biológica, de fácil acceso, para la que no existen estudios acerca de la presencia y niveles de estos compuestos. Se utilizará el disolvente supramolecular volátil con propiedades de acceso restringido (V-SUPRAS-RAM) de micelas inversas de hexan-1-ol para la microextracción de los bisfenoles y purificación de la muestra. La determinación de la mezcla de bisfenoles se llevará a cabo mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

- Selección de un simulante representativo de la saliva humana.
- Síntesis de un V-SUPRAS-RAM y optimización para la extracción de bisfenoles y derivados en saliva artificial.
- Caracterización de las condiciones ambientales para la formación del V-SUPRAS-RAM en presencia de saliva artificial.
- Estudio de la influencia de la composición del SUPRAS en la selectividad de la extracción.

- Estudio de la influencia de la composición del SUPRAS en el rendimiento absoluto de la extracción.
- Establecimiento de las condiciones óptimas de extracción.

2. Materiales y métodos.

2.1 Reactivos.

A continuación se detallan los reactivos empleados, especificando el número CAS, entre paréntesis, y la casa comercial. Todos poseen calidad analítica.

Los compuestos: BPA (80-05-7), BPF (87139-40-0), MCBPA (74192-35-1), DCBPA (79-98-1), TCBPA (40346-55-2), BADGE (1675-54-3), BPAF (1478-61-1), BPAP (1571-75-1), BPP (2167-51-3), BPS (80-09-1), BPZ (843-55-0) y BFDGE·2H₂O (72406-26-9) han sido adquiridos en Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania). BPB (77-40-7) y BPE (2081-08-5) son de TCI Europe N.V. (Zwijndrecht, Bélgica) y TeCBPA (79-95-8) es de Tokyo Chemical Industry Co. Ltd. (Tokio, Japón). BADGE·H₂O (76002-91-0), BADGE·2H₂O (5581-32-8), BADGE·HCl·H₂O (227947-06-0), BADGE·HCl (13836-48-1), BADGE·2HCl (4809-35-2) y BFDGE (2095-03-6) han sido suministrados por Fluka Chemika (Suiza).

El estándar interno ¹³C-BPA (263261-65-0) ha sido adquirido en Cambridge Isotope Laboratories (EEUU) y el estándar interno BADGE-d₆ en Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada).

El agua utilizada para la fase móvil se preparó usando un sistema de purificación Milli-Q® de Millipore (Madrid, España). El metanol (CH₃OH; 67-56-1), usado tanto para la fase móvil como para la preparación de disoluciones, es de calidad gradiente HPLC y ha sido suministrado por VWR (Bois, Francia); al igual que el hexan-1-ol (CH₃(CH₂)₅OH; 111-27-3) y el tetrahidrofurano (C₄H₈O; 109-99-9), empleados en la formación del SUPRAS.

Para la preparación del simulante el dihidrógeno fosfato de potasio (KH₂PO₄; 7778-77-0), ácido clorhídrico (HCl; 7647-01-0) e hidrógeno carbonato de sodio (NaHCO₃; 144-55-8) son de Panreac (Barcelona, España). El dihidrógeno fosfato de sodio monohidrato (NaH₂PO₄·H₂O; 10049-21-5), ácido cítrico (HOC(COOH)(CH₂COOH)₂ (77-92-9) y cloruro de sodio (NaCl; 7647-14-5) han sido adquiridos en Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania). Hidróxido de sodio (NaOH; 1310-73-2) y cloruro de calcio (CaCl₂·2H₂O; 10035-04-8) han sido suministrados por Merck (Darmstadt, Alemania).

El agua (7732-18-5) que se ha utilizado para la preparación del simulante, otras disoluciones y blancos de control de la contaminación es agua Lichrosolv® de Merck (Darmstadt, Alemania). De los componentes del buffer, el formiato de amonio (HCO_2NH_4 ; 540-69-2) ha sido adquirido en Sigma Aldrich (St. Louis, EEUU) y el ácido fórmico (HCOOH ; 64-18-6) en Panreac (Barcelona, España).

2.2 Disoluciones.

Se han preparado disoluciones individuales de los bisfenoles de concentraciones comprendidas entre $1\text{-}2,5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, en metanol. A partir de estas, por dilución, semanalmente se han preparado: disoluciones de bisfenoles y derivados clorados, de concentración $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, en metanol, y disoluciones de bisfenoles diglicidil éter de concentraciones análogas, también en metanol.

Para los estándares internos, ^{13}C -BPA y BADGE- d_6 , se han preparado disoluciones individuales de concentraciones $1,2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente, en metanol. A partir de estas, por dilución, se ha preparado semanalmente una disolución mezcla de ambos estándares internos de concentración $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, en metanol.

En el estudio de recuperación, las disoluciones intermedias se han preparado en simulante. De este modo, se ha conseguido adicionar a la muestra un porcentaje mínimo de metanol de tal forma que no se altere la composición del disolvente supramolecular.

Los patrones de calibración se han preparado diariamente en el intervalo de concentración de $0\text{-}250\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, en agua-metanol (50:50, v:v) en el caso de los bisfenoles y sus derivados clorados y en agua-buffer formiato amónico/ácido fórmico, 25mM, pH 3.75 (50:50, v:v), para los bisfenoles diglicidil éter.

Todas las disoluciones se han conservado refrigeradas a $4\text{ }^\circ\text{C}$.

2.3 Equipos y accesorios.

El sistema de LC-MS empleado ha sido un Agilent 1200 Series LC (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EEUU) acoplado a un AB Sciex 4000 QTrap MS (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU) con Turbospray como fuente de ionización. El software de adquisición utilizado ha sido Analyst v.1.5.1 con Mass Spectrometry Toolkit v.3.3.

Como columna analítica se ha usado una ACE 3, C₁₈-PFP (3 μm, 3.0 x 150 mm). Con el fin de proteger la columna analítica, reteniendo posibles compuestos que podrían dañarla, se ha utilizado como precolumna una ACE 3, C₁₈ (3 μm, 3.0 x 4.6 mm). Además, se ha empleado una columna Waters® Symmetry® C₁₈ (3.5 μm, 4.6 x 75 mm), para retrasar la elución de los bisfenoles procedentes de los disolventes de la fase móvil con respecto a los bisfenoles de la muestra.

Para la formación del SUPRAS y extracción de las muestras se ha utilizado: un agitador tipo vórtex REAX Top equipado con un cabezal para 10 microtubos (ref. 549-01000-00) de Heidolph (Schwabach, Alemania), una centrífuga de alta velocidad MPW-350R con un rotor 36 x 2,2/1,5 mL (ref. 11462) de MPW Med-Instruments (Warschaw, Polonia) y una centrífuga Mixtasel equipada con un rotor 4 x 100 mL (ref. 7001326) de JP-Selecta (Abrera, España). Los extractos se han evaporado en un concentrador SBHCONC/1 con placa calefactora SBH130D/3 de Stuart (Paris, Francia).

2.4 Método para la determinación de bisfenoles en saliva humana.

2.4.1 Antecedentes.

A fin de mantener la coherencia de esta Memoria, en el apartado 2.4.1 Antecedentes, se detallarán estudios preliminares llevados a cabo, en el grupo de investigación FQM 186, para el desarrollo de un método que ha sido adaptado en este TFM para su aplicación a saliva artificial.

Formación de aductos de los bisfenoles diglicidil éter para su determinación por espectrometría de masas.

Como ya se ha indicado en la introducción, para obtener en el espectrómetro de masas una señal intensa de los bisfenoles diglicidil éter es necesario la formación de aductos. Por estudios existentes en bibliografía, se han decidido formar aductos de amonio (M+NH₄) para la determinación de estos analitos. La novedad que se ha introducido es que, en lugar de adicionar la sal de amonio en la fase móvil, los aductos se han formado durante el tratamiento de muestra. Para ello, tras la solubilización de los componentes de interés en el V-SUPRAS-RAM, se divide el extracto en dos alícuotas; en una se lleva a cabo la determinación de los bisfenoles y sus derivados clorados, mientras que en la otra se forman los aductos necesarios para la determinación de los bisfenoles diglicidil éteres.

Para la formación de los aductos se ha empleado un tampón de formiato amónico/ácido fórmico, de concentración 25 mM y pH 3,75. Esta concentración se ha seleccionado tras ensayar con tampones de diferente concentración (15–100 mM), teniendo en consideración dos criterios: la intensidad de la señal obtenida y el nivel de ruido producido. Tampones con una concentración inferior producen resultados irreproducibles, mientras que tampones con una concentración superior dan lugar a cromatogramas con altos niveles de ruido.

Optimización de la detección de los bisfenoles en el espectrómetro de masas.

Los bisfenoles se optimizaron en el espectrómetro de masas. Los parámetros seleccionados para la fuente de ionización fueron: (\pm) 4500V para el voltaje de la fuente, 600 °C para la temperatura de la fuente, 27 psi para el curtain gas y 50 psi para el gas nebulizador, siendo nitrógeno el gas utilizado en ambos casos. La resolución para los cuadrupolos Q1 y Q3 es la unidad. El modo de adquisición seleccionado es MRM (multiple reaction monitoring).

Para cada analito se seleccionó el ion precursor y sus dos iones producto con mayor abundancia, los cuales están recogidos en la Tabla 3. Cuando se emplea electrospray como fuente de ionización para la determinación de bisfenoles y sus derivados clorados, el espectro de masas del ion precursor se corresponde con la pérdida de un hidrógeno, $[M-H]^-$; y el de los diglicidil éteres se corresponde con la ganancia de una molécula de amonio, $[M+NH_4]^+$. La transición de mayor intensidad se ha utilizado para la cuantificación de los bisfenoles y la segunda más intensa para su identificación. También se obtuvieron los valores óptimos, para cada uno de los bisfenoles, del: potencial de fragmentación (DP, declustering potential), energía de colisión (CE, collision energy) y potencial de salida de la celda (CXP, cell exit potential), los cuales se indican en la Tabla 3.

Tabla 3. Pesos moleculares de los analitos y estándares internos, iones precursor y producto seleccionados para cada uno de ellos y algunos parámetros del espectrómetro de masas dependientes de estos compuestos: DP, CE y CXP.

Analito	MW	Ion precursor (m/z)	Iones producto (m/z)	DP (V)	CE (V)	CXP (V)
BPA	228,29	227	212	-100	-25	-15
			133	-100	-40	-5
BPA- ¹³ C	240,20	239	224	-95	-26	-5
			139	-95	-40	-15
BPB	242,31	241	212	-50	-25	-15
			93	-50	-70	-15
BPE	214,26	213	198	-50	-25	-15
			119	-50	-40	-15
BPF	200,23	199	93	-50	-25	-15
			105	-50	-25	-15
BPP	346,46	345	330	-100	-40	-15
			133	-100	-70	-25
BPS	250,27	249	108	-100	-40	-5
			92	-100	-55	-5
BPZ	268,35	267	173	-100	-40	-15
			145	-100	-55	-5
BPAF	336,23	335	265	-100	-40	-15
			69	-100	-70	-15
BPAP	290,36	289	274	-100	-25	-15
			195	-100	-40	-15
MCBPA	262,73	261	182	-100	-40	-15
			246	-100	-25	-15
DCBPA	297,18	295	244	-100	-24	-5
			216	-100	-28	-5
TCBPA	331,62	330	252	-85	-44	-11
			280	-85	-36	-21
TeCBPA	366,07	365	314	-85	-36	-17
			286	-85	-44	-17
BADGE	340,41	358	191	51	21	10
			135	51	43	24
BADGE-d ₆	346,45	364	197	51	19	18
			141	51	47	8
BADGE·H ₂ O	358,43	376	209	56	19	12
			191	56	27	10
BADGE·2H ₂ O	376,44	394	209	61	23	12
			135	61	45	22
BADGE·HCl	376,87	394	227	56	19	12
			135	56	43	22
BADGE·2HCl	413,33	431	227	56	21	12
			135	56	49	22
BADGE·HCl·H ₂ O	394,89	412	227	61	21	14
			135	61	45	22
BFDGE	312,36	330	163	51	19	8
			133	51	23	22
BFDGE·2H ₂ O	348,39	366	181	51	21	10
			107	51	41	18

MW (molecular weight): peso molecular.
CE (collision energy): energía de colisión.

DP (declustering potential): potencial de fragmentación.
CXP (cell exit potential): potencial de salida de la celda.

Los parámetros óptimos de la fuente de ionización y el espectrómetro de masas, para la ionización de los analitos se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros optimizados para la ionización de los bisfenoles y derivados clorados (modo negativo) y de los bisfenoles diglicidil éter (modo positivo).

	Modo negativo	Modo positivo
Voltaje fuente de ionización (V)	- 4500	4500
Temperatura fuente de ionización (°C)	650	600
Curtain gas (psi)	10	27
Gas nebulizador (psi)	40	50
Turbo gas (psi)	60	70

Separación cromatográfica de los bisfenoles.

Los disolventes seleccionados para la fase móvil fueron el metanol y el agua. La proporción de estos componentes se optimizó para obtener un programa de elución que pudiera ser utilizado para la determinación de los bisfenoles y sus derivados clorados y los diglicidil éteres. Se probó con varios gradientes y flujos hasta obtener el programa de elución definitivo, que se esquematiza en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición de la fase móvil para la separación cromatográfica de los bisfenoles.

Tiempo (min)	0 → 2	2 → 4	4 → 22	22 → 23	23 → 23,5	23,5 → 27
% Metanol	50 → 60	60 → 80	80 → 90	90 → 100	100	100 → 50
% Agua	50 → 40	40 → 20	20 → 10	10 → 0	0	0 → 50

El programa de elución comienza con un 50% de metanol que aumenta linealmente hasta alcanzar el 60% a los 2 minutos. A continuación, un gradiente lineal durante 2 minutos aumenta el metanol hasta el 80%, para posteriormente alcanzar el 90% en el minuto 22. Durante el minuto posterior, la fase móvil se hace completamente orgánica (100%). Esta composición se mantiene durante medio minuto, a partir del cual el sistema comienza a disminuir el porcentaje de orgánico, recuperándose la composición de partida (50% metanol) a los 27 minutos.

En la Tabla 6 pueden verse los tiempos de retención, el coeficiente de reparto octanol-agua y los parámetros analíticos obtenidos para los bisfenoles y sus derivados. La resolución obtenida es suficiente para asegurar la correcta cuantificación de los componentes. En aquellos casos donde la resolución es baja (BADGE·H₂O y

BADGE·HCl·H₂O), la cuantificación no se ve afectada, ya que para cada uno de ellos se siguen transiciones completamente diferentes, tanto para la cuantificación como para la identificación.

Tabla 6. Coeficientes de reparto octanol-agua de los analitos, tiempos de retención de los mismos y algunos parámetros instrumentales dependientes de estos compuestos.

Analito	Log(K_{ow})	t_R (min)	Linealidad (µg·L⁻¹)	LOD (µg·L⁻¹)
BPA	3,64	11,13	0,04-250	0,02
BPB	4,15	11,62	0,02-250	0,007
BPE	3,23	10,70	0,04-250	0,016
BPF	2,76	10,33	0,09-250	0,06
BPP	6,56	15,75	0,04-250	0,018
BPS	2,14	8,64	0,03-250	0,011
BPZ	4,87	12,76	0,03-250	0,016
BPAF	3,98	13,21	0,04-250	0,016
BPAP	4,33	12,50	0,04-250	0,014
MCBPA	4,34	12,12	0,08-250	0,037
DCBPA	5,03	13,43	0,05-250	0,02
TCBPA	5,72	14,76	0,03-250	0,011
TeCBPA	6,41	16,25	0,04-250	0,017
BADGE	3,71	14,72	0,02-250	0,07
BADGE·H ₂ O	3,19	11,82	0,01-250	0,04
BADGE·2H ₂ O	2,52	10,35	0,09-250	0,04
BADGE·HCl	4,03	14,49	0,13-250	0,05
BADGE·2HCl	4,34	14,27	0,13-250	0,05
BADGE·HCl·H ₂ O	3,50	11,88	0,1-250	0,04
BFDGE	2,45	13,58	0,15-250	0,05
BFDGE·2H ₂ O	1,25	9,51	0,11-250	0,04

K_{ow}: coeficiente de reparto octanol-agua.

t_R: tiempo de retención.

LOD (limit of detection): límite de detección.

En las Figura 1 se han recogido los cromatogramas de los compuestos de interés a una concentración de 5 µg·L⁻¹.

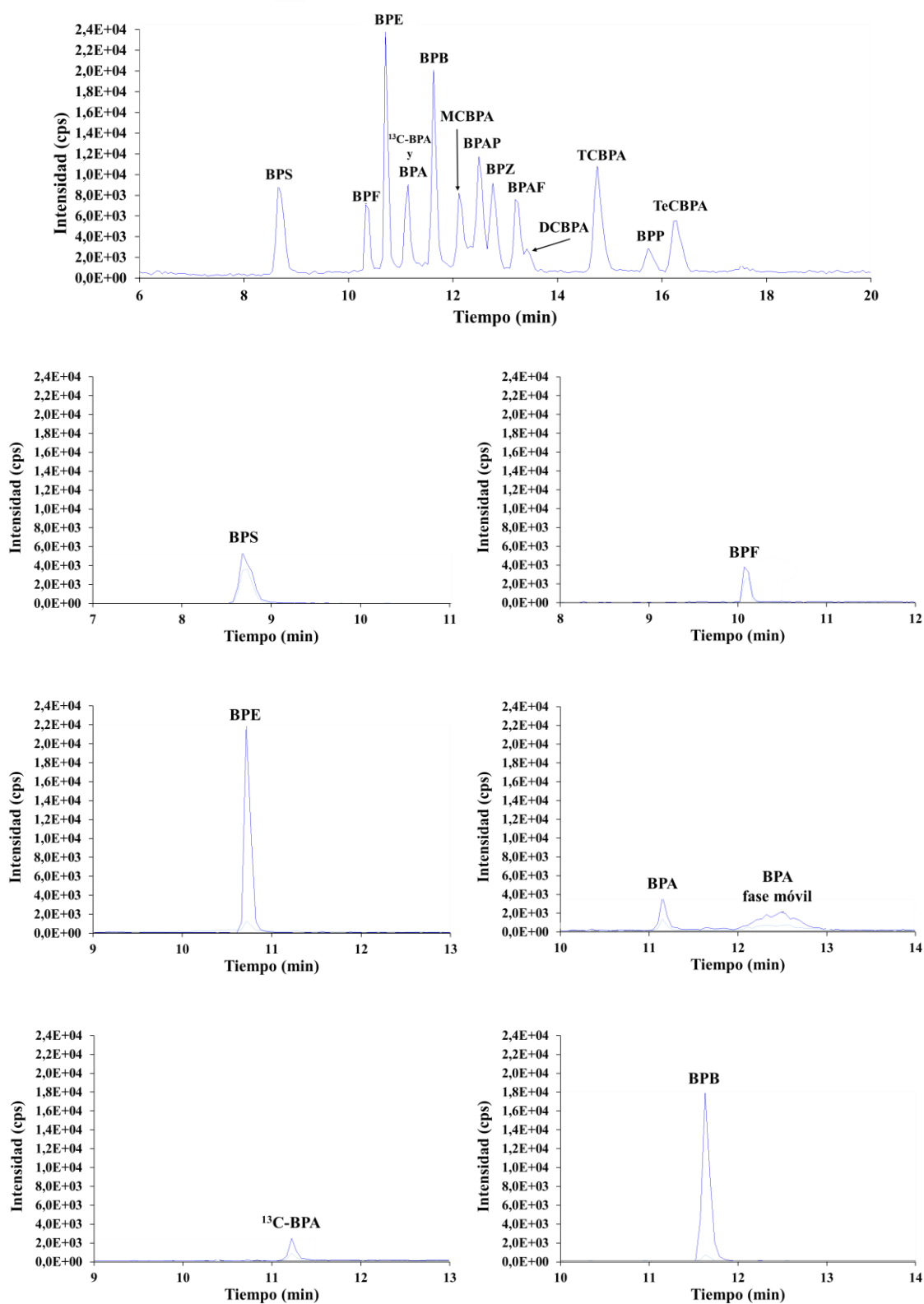


Figura 1. TIC (total ion chromatogram) y XICs (extracted ion chromatograms) para los bisfenoles y derivados clorados investigados (concentración de cada compuesto = 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

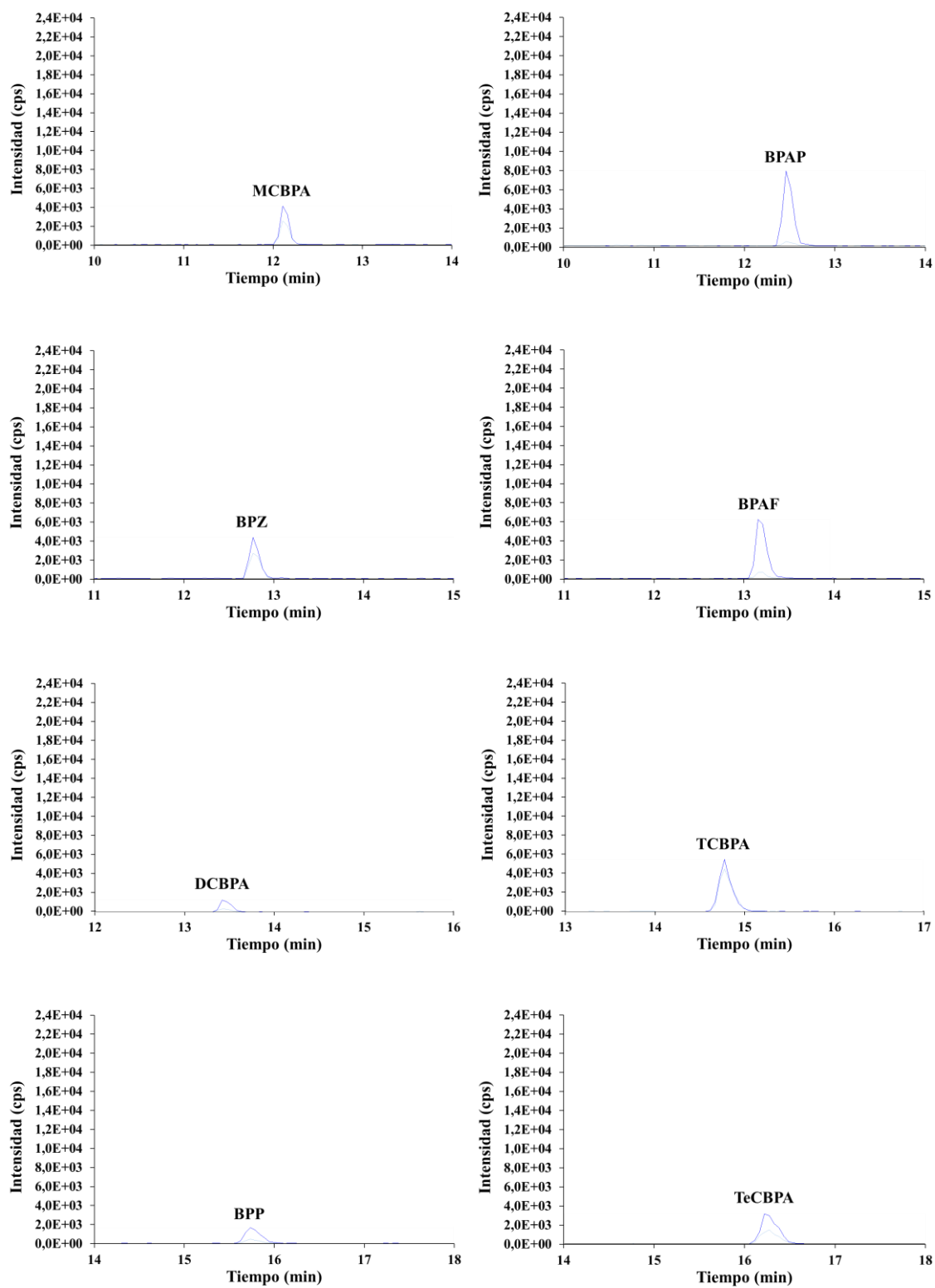


Figura 1. TIC (total ion chromatogram) y XICs (extracted ion chromatograms) para los bisfenoles y derivados clorados investigados (concentración de cada compuesto = $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

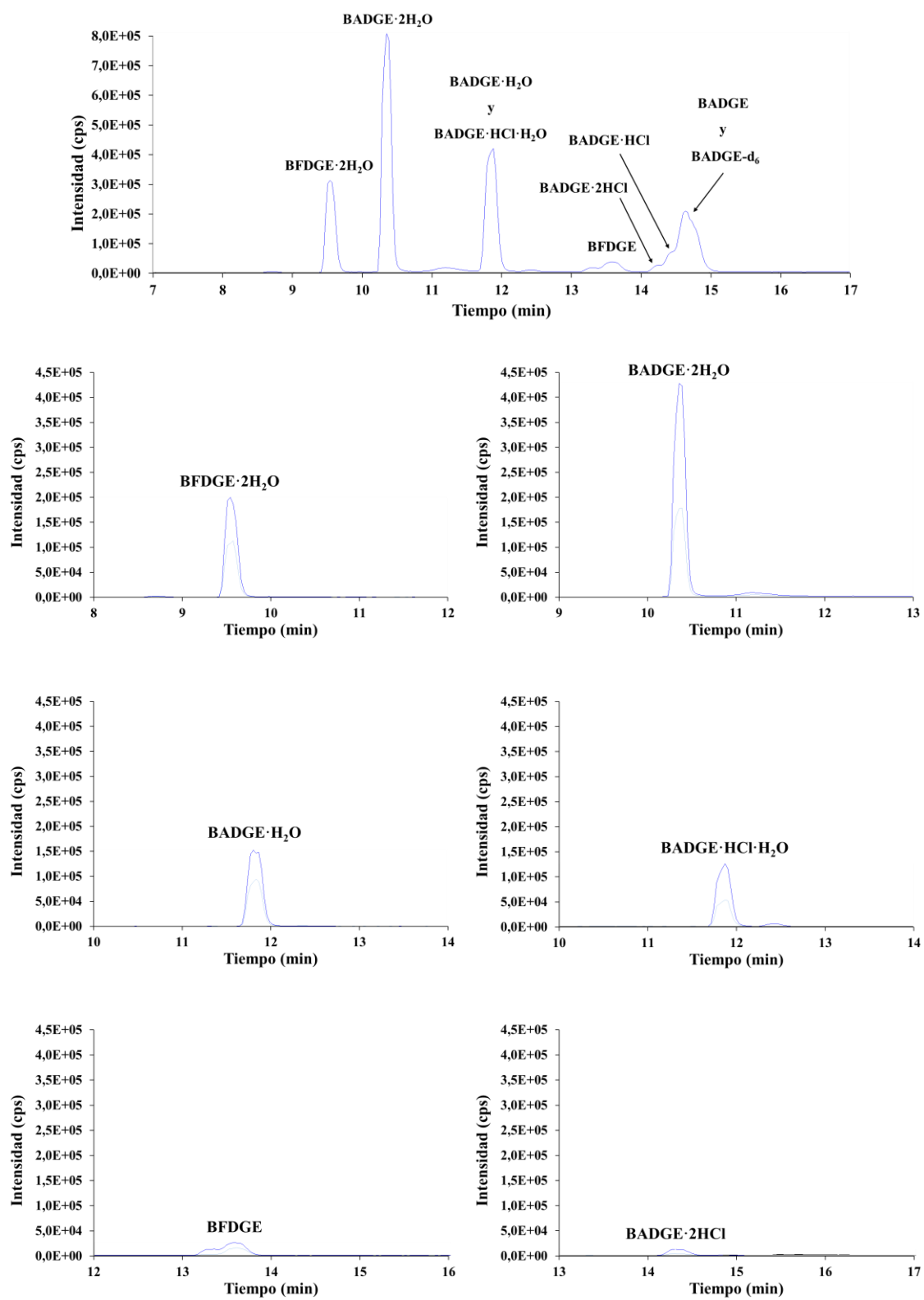


Figura 1. TIC (total ion chromatogram) y XICs (extracted ion chromatograms) para los bisfenoles y derivados clorados investigados (concentración de cada compuesto = 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

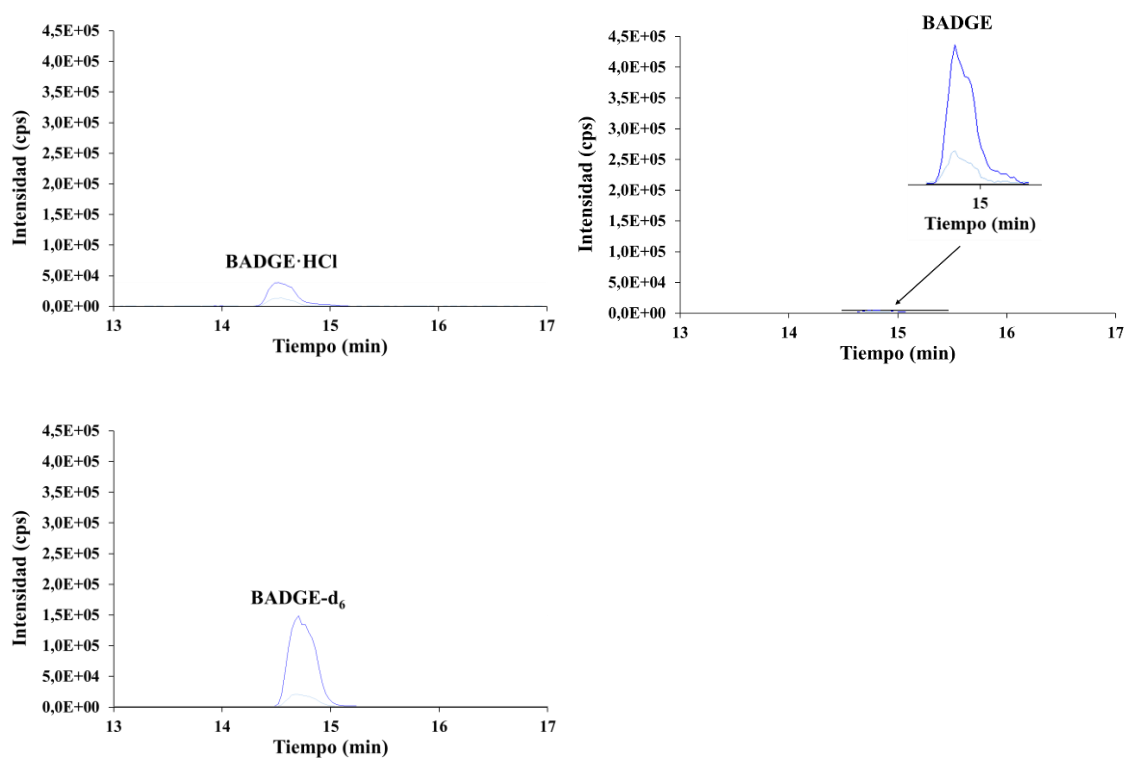


Figura 1. TIC (total ion chromatogram) y XICs (extracted ion chromatograms) para los bisfenoles y derivados clorados investigados (concentración de cada compuesto = $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Disolvente supramolecular empleado para la extracción.

El SUPRAS-RAM elegido, para la extracción de los bisfenoles, es aquel que se forma a partir de la mezcla de hexanol, tetrahidrofurano y agua. La ventaja que presenta usar como tensioactivo el hexanol es que permite introducir en el proceso una etapa de evaporación, ya que debido a su corta cadena hidrocarbonada puede ser fácilmente evaporado mediante una corriente de nitrógeno. Ello evita la coelución del tensioactivo con los compuestos de interés, reduciendo los problemas de supresión de la señal en la fuente de ionización del espectrómetro de masas. Esto resulta de gran interés en matrices biológicas, debido a la complejidad de su composición.

En el SUPRAS utilizado, las moléculas de tensioactivo se agregan en estructuras hexagonales inversas, creando dos ambientes de diferente polaridad. Los grupos hidroxilo de las moléculas de hexanol se encuentran dispuestas hacia el interior de los agregados, estabilizados por el agua allí presente. En tanto que las cadenas hidrocarbonadas se encuentran dispuestas hacia el exterior de los agregados, inmersos en una fase continua de tetrahidrofurano. De este modo, el SUPRAS ofrece la posibilidad de que los analitos

se unan tanto por puentes de hidrógeno e interacciones dipolo-dipolo con los grupos polares y el agua del interior de los agregados, como por fuerzas de dispersión con las cadenas hidrocarbonadas.

Esquema general del método analítico.

Las etapas generales del método utilizado para la determinación de bisfenoles, derivados clorados y bisfenoles diglicidil éter se esquematizan en la Figura 2.

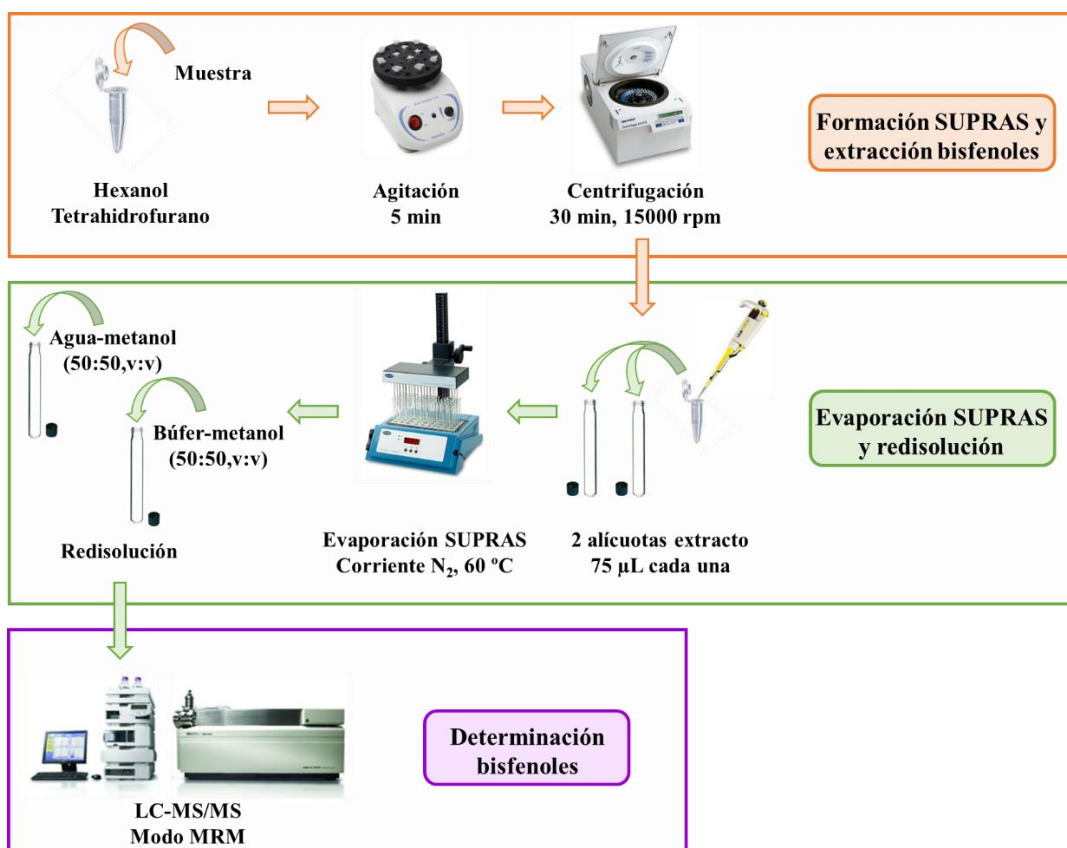


Figura 2. Esquema del método analítico propuesto para la determinación de bisfenoles y derivados.

Para la formación del SUPRAS y extracción de los analitos, a un microtubo se adiciona hexan-1-ol, tetrahidrofurano y agua, por este orden. La proporción en la que se emplea cada uno de ellos debe ser optimizada para cada matriz, en este trabajo se ha optimizado para su uso en saliva. A continuación, se agita para favorecer la extracción y se centrifuga para acelerar el proceso de separación del SUPRAS del resto de la disolución. Los tiempos de agitación y centrifugación también deben ser estudiados para cada matriz.

Posteriormente, con ayuda de una micropipeta, se toman dos alícuotas de 75 µL y se depositan en dos tubos de vidrio que se llevan a un concentrador para la evaporación del

V-SUPRAS-RAM a 60 °C y corriente de nitrógeno. Cuando el extracto se ha secado por completo, los bisfenoles y sus derivados clorados se redisuelven en una mezcla agua-metanol (50:50, v:v) y los bisfenoles diglicidil éteres en una mezcla metanol-búfer formiato amónico/ácido fórmico (50:50, v:v). Ambas muestras, se introducen en el cromatógrafo de líquidos acoplado al espectrómetro de masas para su determinación.

2.4.2 Disolución de simulación de la saliva humana.

La composición de la saliva varía entre individuos y para un mismo individuo depende de factores como la hora del día o la ingesta reciente de alimentos o bebidas. En este estudio se ha seleccionado el simulante propuesto por V. Samanidou et al. [28], cuya composición se muestra en la Tabla 7. Se trata de una disolución acuosa cuyo valor de pH se encuentra dentro del intervalo 6-7.

Tabla 7. Composición del simulante.

Compuesto	Fórmula	Concentración (mM)
Dihidrógeno fosfato de potasio	KH_2PO_4	7,5
Hidrogeno fosfato de sodio	Na_2HPO_4	7,5
Hidrogeno carbonato de sodio	NaHCO_3	15
Cloruro de calcio	CaCl_2	1,5
Ácido cítrico monohidrato	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,9
Cloruro de sodio	NaCl	10

El simulante se ha conservado a temperatura ambiente, 25 °C, puesto que se observó que si se conservaba refrigerado a 4 °C la solubilidad de las sales disminuye y como consecuencia de ello algunas precipitan.

2.4.3 Diagrama de fases de la mezcla ternaria hexanol/tetrahidrofurano/simulante.

Una vez seleccionado el simulante, debe estudiarse cómo afecta la composición del mismo a la formación del SUPRAS, ya que éste se sintetiza *in situ*. El diagrama de fases de la mezcla ternaria hexanol/tetrahidrofurano/agua ya ha sido anteriormente elucidado por nuestro grupo de investigación. En este estudio, se sustituye agua por simulante y, dado que las sales favorecen generalmente la agregación de sustancias anfifílicas, es de prever cambios en el diagrama de fases comparado con el obtenido en agua.

El nuevo diagrama de fases se estudió para porcentajes de hexanol comprendidos entre el 1 % y el 12% y porcentajes de tetrahidrofurano comprendidos entre el 10% y el 90%. Para ello, se adicionó hexanol, tetrahidrofurano y simlante, por este orden, a un tubo de centrífuga. Se agitó durante 5 minutos, en un agitador magnético, y se centrifugó durante 30 minutos a 3500 rpm. La existencia de dos fases se utilizó como indicativo de la formación del SUPRAS.

2.4.4 Ecuación que predice el volumen de disolvente supramolecular.

Durante la realización del anterior experimento, también se midió el volumen de disolvente supramolecular producido, con objeto de elucidar una ecuación que permita la predicción del volumen de disolvente supramolecular obtenido, en función de los porcentajes de hexanol y de tetrahidrofurano empleados. Para ello, se midió el diámetro interno del tubo y la altura alcanzada por el SUPRAS y, puesto que los tubos usados tienen forma cilíndrica, se aplicó la fórmula del volumen del cilindro:

$$V_c = \pi \cdot r^2 \cdot h \quad (r = \text{radio}, h = \text{altura})$$

Cabe destacar que los tubos de centrífuga empleados han sido especialmente diseñados, para tal fin, por el grupo de investigación FQM-186 y han sido fabricados por Pobel S.A. (Madrid, España). Algunos de ellos se representan esquemáticamente en la Figura 3. Cada mezcla se ha preparado en un tubo de capacidad adecuada al volumen de SUPRAS esperado, de forma que el disolvente ocupase la parte estrecha del tubo con el fin de reducir el error cometido en la medida.

Tras conocer el volumen de SUPRAS obtenido para cada composición ensayada, los datos se trataron mediante el programa estadístico Statgraphics Centurion XV.II. Con ayuda de esta herramienta se pretendía encontrar la ecuación a la que se ajustan los datos y que permita predecir el volumen de disolvente formado en función de los porcentajes de hexanol y tetrahidrofurano usados.

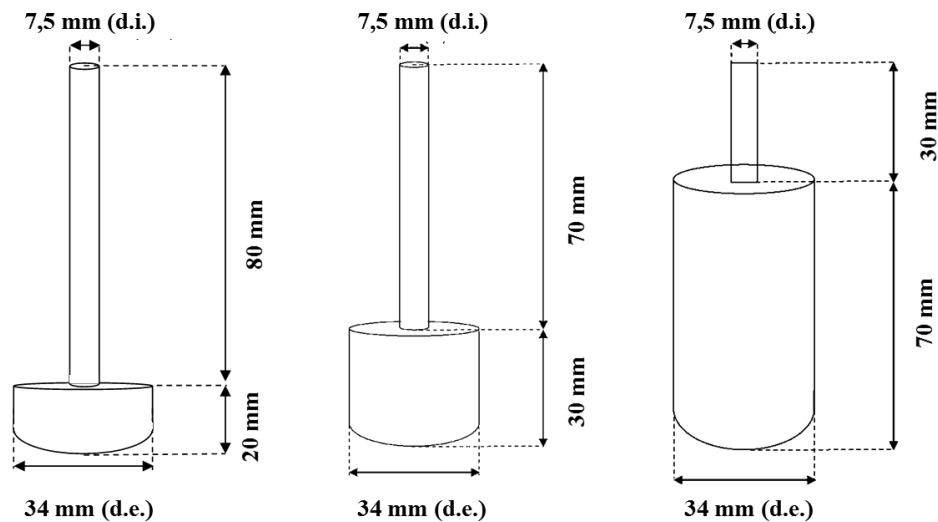


Figura 3. Esquema de algunos de los tubos de centrifuga empleados para la determinación del diagrama de fases y la ecuación. (d.i.: diámetro interno, d.e.: diámetro externo)

2.4.5 Control de la contaminación.

Debido a la ubicuidad de dichos compuestos, se ha respetado en todas las sesiones de trabajo un estricto protocolo para el control de la contaminación. Todos los experimentos se han realizado en una sala dedicada exclusivamente al trabajo con bisfenoles. Al inicio de cada sesión y cada vez que se ha requerido, se ha limpiado con metanol el puesto de trabajo, así como cualquier superficie susceptible de acumular polvo. Sobre la poyata de trabajo se ha colocado papel de aluminio, como sustituto del papel de filtro. En lugar de guantes de látex o vinilo, en los que existen evidencias de la existencia de BPA [67,68], se han utilizado guantes de nitrilo que han sido desechados tras cada etapa del proceso analítico.

Al ser una de las aplicaciones de los bisfenoles la fabricación de polímeros plásticos, solo se ha hecho uso del material de plástico imprescindible: puntas de micropipeta y microtubos. Como las muestras están en contacto con los microtubos durante al menos 35 minutos, el material plástico del que están hechos no debe tener bisfenoles en su estructura ya que pueden migrar; por lo que, los que se han utilizado son de polipropileno. Aun así, puntas y microtubos muestran contaminación por BPA y BPF, probablemente adherido durante el proceso de fabricación. Por ello, se han enjuagado dos veces con metanol antes de su uso.

En relación al material de vidrio, diariamente y antes de ser utilizado, se ha limpiado con: agua y jabón, agua destilada y metanol, repitiendo cada operación dos veces.

Posteriormente, para comprobar que la limpieza ha sido efectiva, se ha testado el material. Para ello, se ha tomado una alícuota del metanol del último lavado, de un número representativo del material, y se ha analizado por espectrometría de masas. Para estas inyecciones, el programa cromatográfico utilizado tiene una duración de 10 minutos. Se ha conseguido reducir el tiempo de elución de los analitos aumentando el porcentaje de disolvente orgánico de la fase móvil (98%). En caso de que se detectase la presencia de bisfenoles, se ha procedido de nuevo al lavado del material con metanol.

El agua purificada, utilizada como disolvente de la fase móvil, contiene BPA que ha migrado desde las tuberías, filtros y tanques que constituyen el sistema de purificación Milli-Q. Durante la cromatografía, para evitar la contaminación de las muestras, se ha incorporado una columna entre la bomba cromatográfica y el inyector automático, tal como se muestra en la Figura 4. Los bisfenoles de la fase móvil deben atravesar una columna más y, por tanto, su elución se retrasa con respecto a los bisfenoles de la muestra.

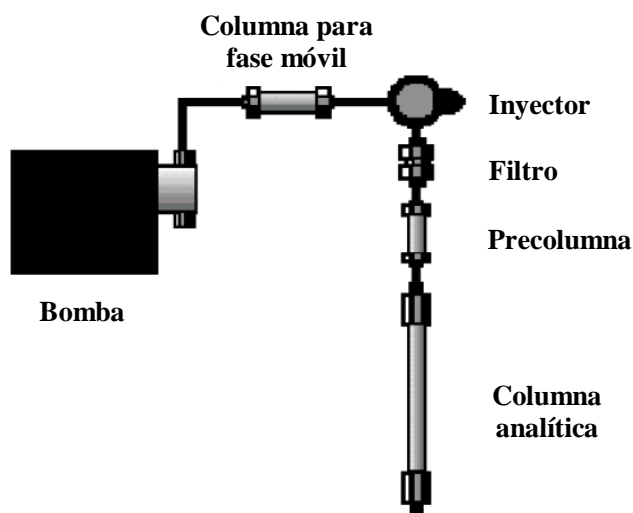


Figura 4. Esquema de las distintas partes del sistema de cromatografía de líquidos.

En todos los ensayos realizados, se ha analizado un blanco analítico para cada composición de SUPRAS estudiada. Estos blancos se han preparado de forma simultánea a las muestras, siguiendo el mismo procedimiento pero sin ser fortificados (sí contienen los estándares internos). Además, cada 6 muestras se ha intercalado una muestra de control, preparada con agua en lugar de simulante y sin fortificar (sí contienen los estándares internos).

2.4.6 Estudio de selectividad.

Para el estudio de selectividad se sintetizaron SUPRAS de diferente composición mediante el procedimiento descrito en el apartado 2.4.1 (Esquema general del método analítico), pero sustituyendo el agua por simulante. El porcentaje de hexanol se mantuvo constante (4% v/v/v) mientras que el porcentaje de tetrahidrofurano se varió dentro del intervalo del 25 – 40% (v/v/v).

Las muestras, se fortificaron durante la etapa de reconstitución con $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de todos los bisfenoles en estudio y $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de los estándares internos. Posteriormente, tras analizar las muestras, se integraron los picos y se interpolaron las áreas obtenidas en las rectas de calibrado, para calcular las concentraciones de los analitos. La selectividad se evaluó en términos de supresión o aumento de la ionización (SSE); porcentajes superiores a 100 indican aumento de la señal, mientras que porcentajes inferiores a 100 indican supresión de la ionización.

2.4.7 Estudio de recuperación.

Tras obtener los resultados del estudio de selectividad, se llevó a cabo el estudio de recuperación. Para ello, se realizaron extracciones de los compuestos, en saliva artificial, con SUPRAS de diferente composición, mediante el procedimiento descrito en el apartado 2.4.1 (Esquema general del método analítico). El porcentaje de hexanol se mantuvo constante (4% v/v/v) mientras que el porcentaje de tetrahidrofurano se varió dentro del intervalo del 25 – 40% (v/v/v), la selección de estas concentraciones se justifica en el apartado 3.5 Estudio de selectividad.

El simulante se fortificó con $4,48 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de todos los bisfenoles en estudio, además a cada una de las muestras se le adicionó una cantidad determinada de ambos estándares internos, de forma que sus concentraciones al final del proceso fuesen de $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Posteriormente, tras analizar las muestras, se integraron los picos y se interpolaron las áreas obtenidas en las rectas de calibrado. Las concentraciones encontradas se compararon con las concentraciones que teóricamente había en las muestras, para determinar las recuperaciones conseguidas.

3. Resultados y discusión.

3.1 Disolución de simulación de la saliva humana.

La saliva humana está formada en su mayoría por agua, aproximadamente en un 99%. El 1% restante lo constituyen: electrolitos (sodio, potasio, calcio, bicarbonato, fosfatos, etc.), proteínas (enzimas, inmunoglobulinas, albúmina, etc.) y otras pequeñas moléculas (glucosa y productos del nitrógeno entre otros) [69]. El pH de la saliva se encuentra en el intervalo de 6–7. La Tabla 8 muestra la composición detallada de la saliva.

Tabla 8. Componentes que constituyen el 1% de la saliva humana.

Electrolitos	Proteínas	Otras moléculas
Amoniac	Albúmina	Ácido siálico
Bicarbonato	Amilasa	Ácido úrico
Calcio	Cistatinas	Creatinina
Cloruro	Fibronectina	Glucosa
Fosfatos	Gustatina	Urea
Magnesio	Histamina	
Potasio	Inmunoglobulina A, G, M	
Sodio	Lactoferina	
	Lipasa	
	Deshidrogenasa láctica	
	Lizosima	
	Mucina	
	Peptidasas	
	Fosfatasas	
	Ribonucleasas	
	Peroxidasas salivales	

Se seleccionó el simulante utilizado por V. Samanidou et al. [28], cuya composición se ha detallado en la Tabla 7. Los principales motivos que llevaron a su elección fueron que esta disolución contiene la mayoría de electrolitos presentes en la saliva humana y ha sido utilizada por este autor en un método en el que se determina BPA, entre otros compuestos, con éxito.

Es de prever que las proteínas no interfieran en la determinación de los bisfenoles. El motivo de ello es que durante el proceso de extracción, el THF provoca la desnaturalización de las proteínas y el hexanol su floculación. De esta forma, tras la

centrifugación, las proteínas quedan separadas del SUPRAS, como un precipitado blanco en el fondo del microtubo [70]. Al no incorporarse al extracto, no interfieren en la determinación de los analitos y, por tanto, no es necesario que estén presentes en el simulante.

Por el contrario, sí es de prever que los electrolitos influyan en la formación del SUPRAS, ya que los electrolitos disminuyen la solubilidad del tensioactivo y facilitan su agregación.

3.2 Diagrama de fases de la mezcla ternaria hexanol/tetrahidrofurano/simulante.

Las condiciones ambientales bajo las cuales se produce la coacervación en mezclas ternarias de hexanol, THF y simulante se han representado mediante un diagrama de fases (Figura 5.A). Aunque es un diagrama binario en el cual el simulante no está representado, su concentración puede ser fácilmente calculada restando a 100 la suma de los porcentajes de hexanol y tetrahidrofurano.

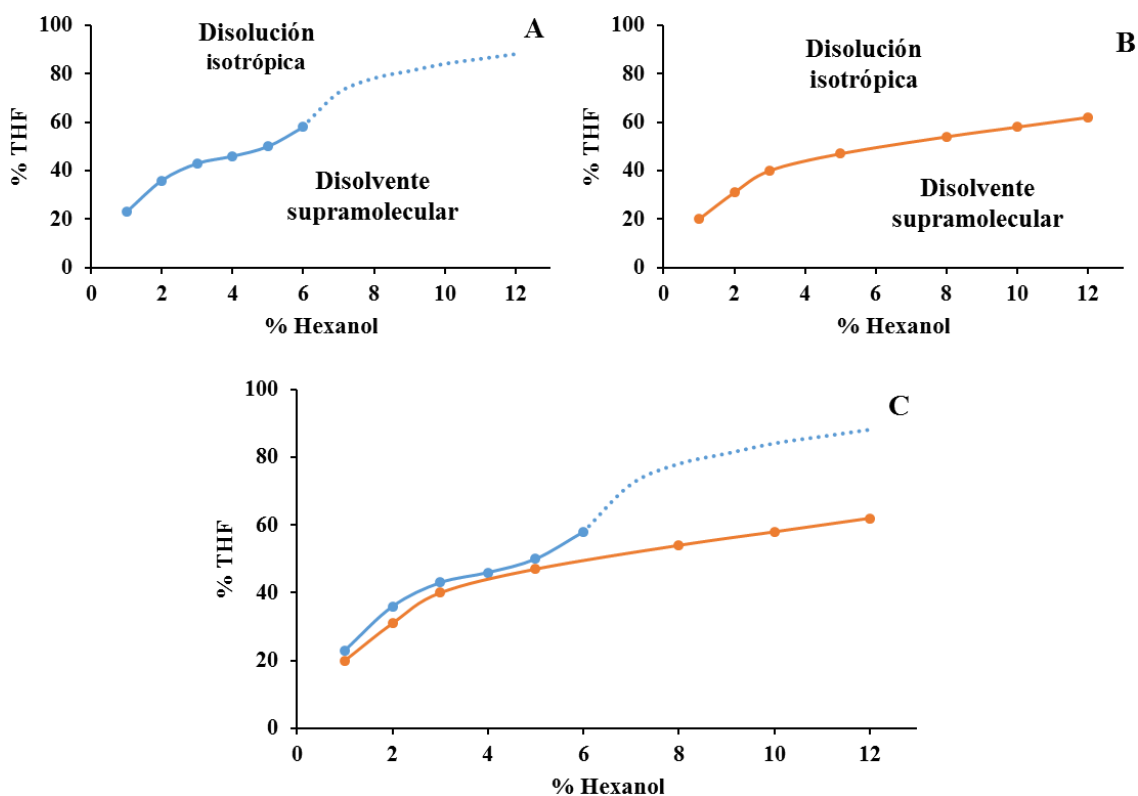


Figura 5. A) Diagrama de fases de la mezcla ternaria hexanol/THF/simulante ($n = 107$). B) Diagrama de fases de la mezcla ternaria hexanol/THF/agua. C) Representación conjunta de A y B.

En el diagrama de la Figura 5.A, por debajo de la curva, al añadir el simulante al hexanol disuelto en el tetrahidrofurano, se produce la coacervación espontánea y la consiguiente formación del SUPRAS. Por encima de la curva, el hexanol permanece disuelto en el tetrahidrofurano que a su vez es miscible en el agua, resultando una disolución isotrópica.

Dentro de la región de coacervación, a porcentajes superiores al 7% de hexanol, se produce un gran incremento en el volumen de fase líquida que se separa del seno de la disolución. Este inusual incremento de volumen de coacervado debería estar relacionado con un cambio en la composición del disolvente supramolecular producido y probablemente un cambio en las estructuras de los agregados que lo constituyen. En este trabajo se decidió delimitar nuestros estudios a la región de porcentajes de hexanol inferiores a 6% (curva con línea continua) ya que es la región donde el volumen de disolvente producido es menor y además puede utilizarse mayor volumen de simulante. Ambos factores permitirán aumentar el factor de preconcentración teórico obtenido.

A diferencia de los diagramas de fases de tensioactivos sólidos a temperatura ambiente, que presentan tres regiones, este diagrama solo presenta dos. La tercera región, aquella en la cual el porcentaje de tetrahidrofurano es tan bajo que parte del tensioactivo queda insolubilizado apareciendo un precipitado, no puede ser determinada tan fácilmente en el caso del hexanol. El motivo es que este alcohol, a temperatura ambiente, se presenta como un líquido inmiscible en agua que no puede diferenciarse del SUPRAS a simple vista. Para delimitar esta tercera región habría que analizar la composición de las fases que se forman, lo cual no se ha considerado pertinente en este trabajo puesto que no va a ser posible trabajar a porcentajes de tetrahidrofurano tan bajos, debido al pequeño volumen de SUPRAS que se forma.

En la Figura 5, también se ha incluido el diagrama de fases de la mezcla ternaria hexanol/tetrahidrofurano/agua (Figura 5.B) y una representación conjunta de ambos diagramas (Figura 5.C), donde puede verse claramente que la composición de la saliva artificial modifica el diagrama de fases. Cuando se utiliza el simulante como agente coacervate, la región de coacervación se amplía, respecto a la obtenida en agua. Como ya se ha explicado anteriormente, la presencia de las sales disminuye la solubilidad del hexanol y su agregación resulta favorable incluso a altos porcentajes de tetrahidrofurano.

3.3 Ecuación que predice el volumen de disolvente supramolecular.

El diagrama de fases de la Figura 5.A puede dividirse en tres tramos, dentro de los cuales los datos siguen una determinada tendencia: del 1-4%, del 4-7% y del 7-12%, refiriéndonos en todos los casos al porcentaje de hexanol. Para la determinación de la ecuación se ha seleccionado uno de estos intervalos.

Para la selección del intervalo del porcentaje de hexanol se han seguido dos criterios. En primer lugar, se ha tenido en cuenta el volumen mínimo de SUPRAS que tiene que formarse para poder analizar una muestra mediante este método analítico. Como se detalló en el apartado 2.4.1 (Esquema general del método analítico), del extracto obtenido hay que coger dos alícuotas de 75 μL , en total 150 μL de SUPRAS. Como puede comprobarse en la Tabla 9, esto descarta el primer intervalo, ya que del 1-3% de hexanol no se cumple este requisito. El segundo criterio que se ha tenido en cuenta es el factor de preconcentración. En la Tabla 9 puede observarse que a medida que aumenta el porcentaje de tensioactivo empleado, disminuye el factor de preconcentración conseguido. Por este motivo se ha elegido el intervalo del 4-7% de hexanol para la determinación de la ecuación.

Tras tratar los datos mediante el programa Statgraphics, se comprobó que el volumen de SUPRAS sigue una tendencia lineal con respecto al porcentaje de hexanol y exponencial con respecto al porcentaje de tetrahidrofurano. La ecuación que mejor se ajusta a los datos y que predice el volumen de SUPRAS formado, en el intervalo del 4-7% de hexanol, se muestra a continuación:

$$V_{\text{SUPRAS}} = (15,1 \pm 0,5) \cdot H \cdot e^{(0,0356 \pm 0,0007) \cdot \text{THF}}$$

En la cual, el volumen de SUPRAS (μL) está expresado por volumen de disolución (mL), H es el porcentaje de hexanol (v/v/v) y THF es el porcentaje de tetrahidrofurano (v/v/v). El coeficiente de determinación del ajuste es del 98,53%, demostrándose así la buena capacidad de predicción de la ecuación, tal y como se muestra en la Figura 6.

Con esta ecuación se ha conseguido simplificar el proceso de optimización de este método, ya que no es necesario medir el volumen de SUPRAS formado en cada muestra analizada, sino que es calculado mediante esta ecuación.

Tabla 9. Volumen de disolvente supramolecular, con su desviación estándar relativa ($n=3$), que se forma en función del porcentaje de hexanol y tetrahidrofurano usados, y factor de preconcentración que se consigue para cada composición.

% Hexanol (v/v)	% THF (v/v)	$V_{\text{SUPRAS}} \pm \text{RSD}^a$ ($\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ disolución)	Factor Preconcentración Teórico	% Hexanol (v/v)	% THF (v/v)	$V_{\text{SUPRAS}} \pm \text{RSD}^a$ ($\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ disolución)	Factor Preconcentración Teórico
1	10	9,6±0,3	92,71	5	10	112±6	7,59
1	15	10,0±0,3	84,00	5	20	164,4±0,2	4,56
1	17	10,3±0,2	79,61	5	30	214±1	3,04
1	18	10,7±0,3	75,70	5	40	321,9±0,8	1,71
2	10	48±3	18,33	5	45	373±2	1,34
2	20	52±1	15,00	5	48	423±5	1,11
2	22	54±1	14,07	5	49	476±1	0,97
2	24	55±1	13,45	5	50	478±1	0,94
3	10	62±1	14,03	6	10	133±3	6,32
3	20	87,7±0,5	8,78	6	20	184±4	4,02
3	30	124±1	5,40	6	30	259±4	2,47
3	32	126±1	5,16	6	40	342,6±0,6	1,58
3	34	131,1±0,9	4,81	6	50	537±1	0,82
4	10	107±5	8,04	6	55	660±6	0,59
4	20	154±3	4,94	7	10	147±5	5,65
4	30	171,7±0,9	3,84	7	20	206±1	3,54
4	40	233±3	2,40	7	30	292±8	2,03
4	45	295±7	1,73	7	40	371±2	1,43
4	46	316±1	1,58	7	50	583,3±0,8	0,74

^a Volumen de disolvente supramolecular \pm desviación estándar relativa.

Tabla 9. Volumen de disolvente supramolecular, con su desviación estándar relativa ($n=3$), que se forma en función del porcentaje de hexanol y tetrahidrofurano usados, y factor de preconcentración que se consigue para cada composición.

% Hexanol (v/v)	% THF (v/v)	V_{SUPRAS}±RSD^a ($\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ disolución)	Factor Preconcentración Teórico	% Hexanol (v/v)	% THF (v/v)	V_{SUPRAS}±RSD^a ($\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ disolución)	Factor Preconcentración Teórico
8	10	162±2	5,06	10	40	454,1±0,5	1,10
8	20	214,7±0,3	3,35	10	50	622±4	0,64
8	30	305,1±0,7	2,03	10	60	843,9±0,2	0,36
8	40	399,1±0,3	1,30	11	10	177,2±0,2	4,46
8	50	587,3±0,8	0,72	11	20	239±2	2,89
8	60	810,08±0,08	0,40	11	30	370,4±0,1	1,59
9	10	173,6±0,9	4,67	11	40	493±3	0,99
9	20	234±2	3,03	11	50	666,3±0,8	0,59
9	30	318,4±0,4	1,92	11	60	846±1	0,34
9	40	441,8±0,2	1,15	12	10	176,9±0,6	4,41
9	50	621,0±0,8	0,66	12	20	252±1	2,70
9	60	784,6±0,4	0,40	12	30	373,3±0,9	1,55
10	10	180±2	4,44	12	40	529,80±0,08	0,91
10	20	238±2	2,94	12	50	674±4	0,56
10	30	349±1	1,72				

^a Volumen de disolvente supramolecular ± desviación estándar relativa.

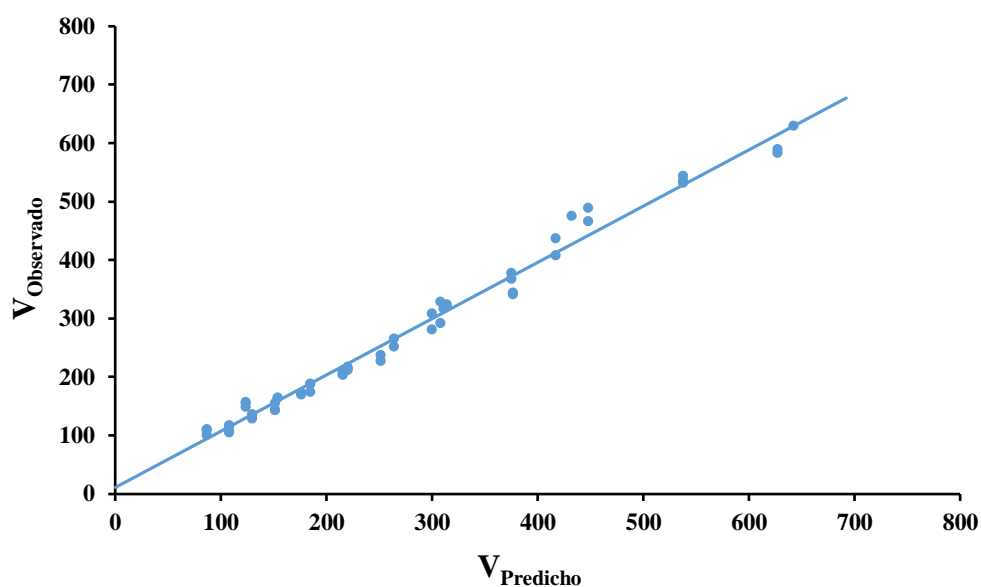


Figura 6. Representación del volumen de disolvente supramolecular observado frente al predicho por la ecuación propuesta ($n = 58$).

3.4 Control de la contaminación.

En la Figura 7 se muestran dos cromatogramas correspondientes a blancos analíticos, uno procedente del extracto reconstituido con agua-metanol (50:50, v:v) (Figura 7.A), y otro procedente del extracto reconstituido con metanol-búfer formiato amónico/ ácido fórmico (50:50, v:v) (Figura 7.B). Ambos blancos se han fortificado con los estándares isotópicamente marcados. En el cromatograma A, se observa un pico en el minuto 11,03 correspondiente al ^{13}C -BPA y un segundo pico en el minuto 12,42 debido al BPA procedente de la fase móvil. En el cromatograma B, solo hay un pico en el minuto 14,60 perteneciente al BADGE- d_6 . En ninguno de los dos casos, se observan señales a los tiempos de retención de los analitos.

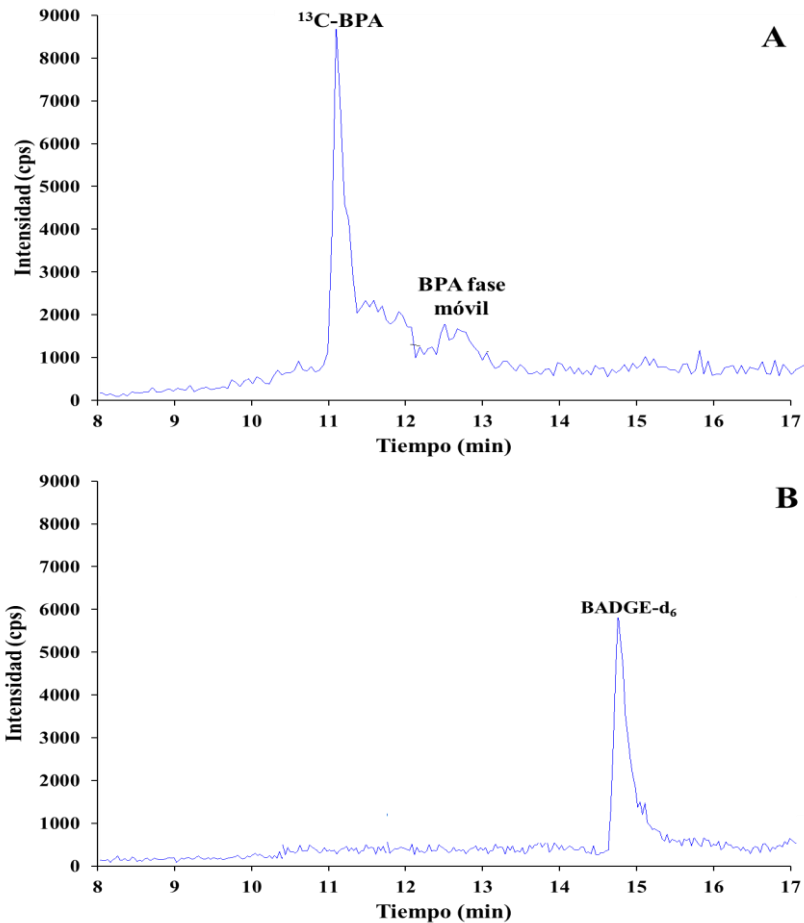


Figura 7. Cromatogramas de blancos analíticos procedentes del extracto reconstituido con: A) agua-metanol (50:50, v:v) y B) metanol-búfer formiato amónico/ácido fórmico (50:50, v:v).

En la Figura 8 se recogen dos cromatogramas de dos muestras de control analítico una procedente del extracto reconstituido con agua-metanol (50:50, v:v) (Figura 8.A), y otra procedente del extracto reconstituido con metanol-búfer formiato amónico/ ácido fórmico (50:50, v:v) (Figura 8.B). Al igual que en el caso anterior, solo se observan los picos pertenecientes al $^{13}\text{C-BPA}$, BPA procedente de la fase móvil y BADGE-d₆.

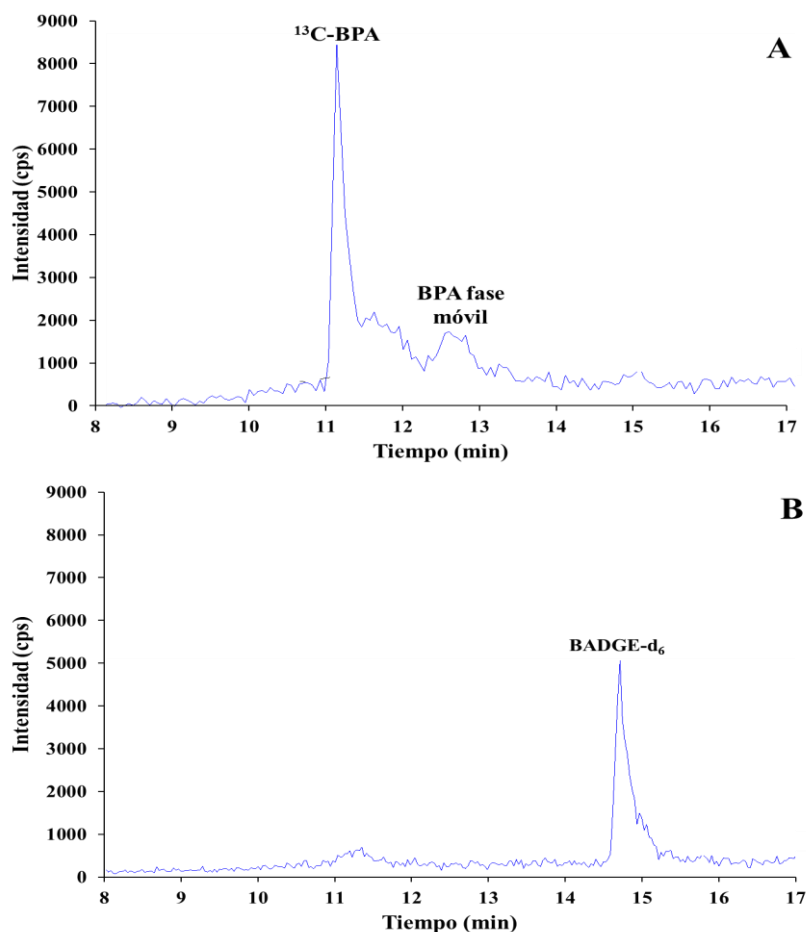


Figura 8. Cromatogramas de muestras de control analítico procedentes del extracto reconstituido con: A) agua-metanol (50:50, v:v) y B) metanol-búfer formiato amónico/ácido fórmico (50:50, v:v).

La ausencia de señales, a los tiempos de retención de los analitos, es indicativo de que los blancos y muestras de control analítico no contienen bisfenoles, a concentraciones superiores al límite de detección. Esto demuestra la eficacia del protocolo seguido para el control de la contaminación.

3.5 Estudio de selectividad.

Para el estudio de selectividad se sintetizaron SUPRAS de diferente composición de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 2.4.1. (Esquema general del método analítico). El porcentaje de hexanol se mantuvo constante (4% v/v/v) mientras que el porcentaje de tetrahidrofurano varió en el intervalo del 25 al 40% (v/v/v). La razón por la que se ha seleccionado esa concentración de hexanol es porque da lugar a la mínima cantidad de SUPRAS que se requiere para analizar una muestra mediante este método (son necesarias dos alícuotas de SUPRAS, de 75 μ L cada una); por tanto, es con el que

se consiguen mejores factores de preconcentración, como se pone de manifiesto en la Tabla 9. Por otro lado, los porcentajes de tetrahidrofurano estudiados se eligieron teniendo presente el diagrama de fases de la mezcla hexanol/THF/simulante (Figura 5.A) y los volúmenes de SUPRAS que se forman (Tabla 9).

La supresión o aumento de la señal, en la fuente de ionización, se ha calculado por comparación de la señal obtenida con la señal de un patrón de igual concentración. Los resultados se han recogido en la Tabla 10, donde se han expresado como porcentaje (%). Esto quiere decir que porcentajes superiores al 100% indican que existe un aumento de la señal, mientras que existe supresión para los porcentajes inferiores al 100%.

Tabla 10. Valores de SSE (%) obtenidos para bisfenoles y sus derivados en función del porcentaje de THF, y su respectiva desviación estándar (n=3).

Analito	25% THF	30% THF	35% THF	40% THF
BPA	107±2	104±2	100±3	99,4±0,4
BPB	102,1±0,7	108±6	112±8	100±5
BPE	106±9	113±9	116±4	115±9
BPF	99±3	98±3	119±1	104±2
BPP	92±3	101±9	97±5	102±9
BPS	101±3	107,9±0,8	106±5	105±2
BPZ	103±6	108,6±0,2	104±2	105±3
BPAF	89±8	107±9	100±5	104±4
BPAP	100±3	100±9	106±2	101±8
MCBPA	95±8	91±5	113±10	97±5
DCBPA	100±4	103±1	103±1	106±1
TCBPA	95±3	100±5	87±4	80±10
TeCBPA	100±2	99±8	105±8	101±4
BADGE	100±3	99,9±0,8	98±9	100±7
BADGE·H ₂ O	98,5±0,4	93±9	95,1±0,9	90±2
BADGE·2H ₂ O	101±5	100±7	100±2	107±4
BADGE·HCl	100±3	99,1±0,5	99±6	91±5
BADGE·2HCl	103±3	109±9	108±4	103±3
BADGE·HCl·H ₂ O	104±9	91±7	98±1	87±3
BFDGE	84±1	100±1	95±2	98±2
BFDGE·2H ₂ O	106±2	98±2	99,4±0,6	96±5

Se ha considerado que la supresión o aumento de la ionización son asumibles si se encuentran en el intervalo 80-120%. Para todas las composiciones de disolvente supramolecular investigadas, las señales obtenidas para los analitos se encuentran en el intervalo 80-119% (Tabla 10), lo cual es indicativo de la gran eficacia de los mismos para eliminar los efectos derivados de los componentes de la matriz de la muestra. Por tanto, desde el punto de vista de la selectividad, todos los disolventes investigados, independientemente de la composición de los mismos, son efectivos para la purificación de la muestra.

3.7 Estudio de recuperación.

La eficiencia de extracción del método fue calculada a partir de la extracción de muestras fortificadas ($4,48 \mu\text{g L}^{-1}$), empleando SUPRAS de diferente composición (4% hexanol y 25-40% THF). Los resultados de recuperación (%) obtenidos se han recogido en la Tabla 11, así como su correspondiente desviación estándar ($n=3$).

Las recuperaciones se han considerado cuantitativas si se encuentran dentro del intervalo del 80-120%. Para la mayoría de los analitos y composiciones ensayadas las recuperaciones son cuantitativas, a excepción de: BADGE·H₂O, BADGE·2HCl y BADGE·HCl·H₂O al 25% de tetrahidrofurano, BADGE·2HCl al 30% de tetrahidrofurano, TCBPA y TeCBPA al 35% de tetrahidrofurano, y TCBPA, TeCBPA, BADGE·H₂O y BADGE·HCl·H₂O al 40% de tetrahidrofurano.

De acuerdo a estos resultados, se proponen las siguientes condiciones experimentales para la extracción de bisfenoles y derivados en muestras de saliva: 4% de hexanol, 30% de THF y 66% de saliva. En estas condiciones, sólo uno de los analitos no se extrae dentro del intervalo de recuperación considerado 80-120% (BADGE·2HCl) y además los límites de cuantificación son menores que para disolventes sintetizados en mezclas conteniendo mayores porcentajes de THF.

Tabla 11. Recuperación, con su desviación estándar relativa ($n=3$), obtenida al emplear simulante fortificado con $4,48 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada uno de los analitos, y límite de cuantificación del método para cada composición.

Analito	25% THF ^a		30% THF ^b		35% THF ^c		40% THF ^d	
	R±RSD ^e (%)	MQL ^f ($\mu\text{g}/\text{L}$)	R±RSD ^e (%)	MQL ^f ($\mu\text{g}/\text{L}$)	R±RSD ^e (%)	MQL ^f ($\mu\text{g}/\text{L}$)	R±RSD ^e (%)	MQL ^f ($\mu\text{g}/\text{L}$)
BPA	100±1	0,024	98±1	0,031	99,9±0,8	0,039	99±1	0,032
BPB	103±1	0,009	97±4	0,012	101.0±0.9	0,014	100.9±0.5	0,012
BPE	99.6±0.3	0,018	91±4	0,025	100.0±0.7	0,029	100±1	0,024
BPF	100.1±0.6	0,053	100.0±0.9	0,068	98.8±0.3	0,088	97.5±0.4	0,074
BPP	88,4±0.9	0,048	104.5±0.9	0,043	100±1	0,057	109.4±0.9	0,052
BPS	99±1	0,034	90±8	0,048	101±6	0,056	99.8±0.9	0,057
BPZ	105.9±0.7	0,010	102±2	0,015	101±3	0,019	108±4	0,015
BPAF	82.2±0.2	0,036	85±2	0,044	83.2±0.5	0,058	85±1	0,051
BPAP	99,0±0,6	0,024	89,7±0,5	0,034	101±2	0,038	98.0±0.5	0,033
MCBPA	106±1	0,051	82.7±0.6	0,082	93±3	0,093	103±2	0,070
DCBPA	102.1±0.1	0,000	98±2	0,000	94±4	0,000	100.9±0.9	0,000
TCBPA	92.1±0.6	0,022	104.3±0.2	0,025	53±2	0,063	66±3	0,042
TeCBPA	100.9±0.4	0,032	103±8	0,034	60±3	0,113	75.1±0.9	0,075
BADGE	82.5±0.2	0,219	82±1	0,252	97.3±0.2	0,252	86±4	0,250
BADGE·H ₂ O	76±4	0,139	86.5±0.9	0,165	100±5	0,221	72±9	0,244
BADGE·2H ₂ O	100.0±0.8	0,049	101±7	0,048	112.4±0.2	0,050	100±3	0,083
BADGE·HCl	103±2	0,167	99.4±0.2	0,218	102±2	0,146	109.7±0.3	0,179
BADGE·2HCl	66±4	0,180	65±3	0,239	99±2	0,128	100±4	0,189
BADGE·HCl·H ₂ O	69.9±0.9	0,115	87±4	0,111	99.6±0.3	0,100	71±4	0,199
BFDGE	81.5±0.3	0,109	80±1	0,148	96±1	0,172	98.8±0.9	0,129
BFDGE·2H ₂ O	100.0±0.6	0,051	104±5	0,050	105±1	0,056	98.6±0.6	0,089

^a 25% THF: 60 μL hexanol, 500 μL THF, 1420 μL simulante.

^b 30% THF: 60 μL hexanol, 450 μL THF, 990 μL simulante.

^c 35% THF: 60 μL hexanol, 525 μL THF, 915 μL simulante.

^d 40% THF: 60 μL hexanol, 600 μL THF, 840 μL simulante.

^e R±RSD (relative standard deviation): recuperación ± desviación estándar relativa.

^f MQL (method quantification limit): límite de cuantificación del método.

4. Conclusiones.

Las condiciones ambientales bajo las cuales se produce la coacervación se ven modificadas al formar el SUPRAS en presencia del simulante, en comparación a cuando se emplea agua como agente coacervante. Las sales presentes en la saliva artificial favorecen la agregación del tensioactivo y, a consecuencia de ello, la región de coacervación se amplía. Esto se ha puesto de manifiesto mediante la determinación del diagrama de fases de la mezcla ternaria hexanol/tetrahidrofurano/simulante (Figura 5.A).

En el intervalo del 4% al 7% de hexanol, el volumen de SUPRAS que se forma sigue una tendencia lineal con respecto al porcentaje de hexanol y exponencial con respecto al porcentaje de tetrahidrofurano. Este comportamiento ha quedado plasmado en la ecuación que predice el volumen de SUPRAS que se forma en función de los porcentajes de hexanol y tetrahidrofurano empleados, válida en el intervalo del 4% al 7% de hexanol y con un coeficiente de determinación del 98,53%:

$$V_{\text{SUPRAS}} (\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ disolución}) = (15,1 \pm 0,5) \cdot \%H \cdot e^{(0,0356 \pm 0,0007) \cdot \%THF}$$

En el método propuesto para la determinación de bisfenoles y derivados en saliva artificial, los componentes de la matriz no producen supresión ni aumento de la señal de los analitos, para ninguna de las composiciones de SUPRAS ensayadas. La composición de la mezcla, para la formación del SUPRAS, que permite obtener mejores recuperaciones para todos los analitos y que, por tanto, ha sido seleccionada es: 4% de hexanol, 30% de THF y 66% de saliva artificial (porcentajes expresados en v/v/v).

5. Conclusions.

The determination of the phase diagram of the mixture hexanol/THF/saliva simulant (Figure 6.A) has proved that the salts present in the simulant favor surfactant aggregation and, as a result, extend the region for surfactant coacervation compared to that obtained from mixtures of hexanol, THF and water. .

In the range from 4% to 7% hexanol, the volume of SUPRAS is linearly and exponentially dependent on the percentage of hexanol and THF, respectively. An equation has been derived for prediction of the volume of SUPRAS obtained as a function of the percentages of hexanol and THF used for synthesis of the SUPRAS. The coefficient of determination for this equation is 98.53 % and it is given below:

$$V_{\text{SUPRAS}} (\mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1} \text{ disolución}) = (15,1 \pm 0,5) \cdot \%H \cdot e^{(0,0356 \pm 0,0007) \cdot \%THF}$$

All the SUPRAS compositions tested were effective in removing matrix interferences; no signal suppression or enhancement was detected for any of the bisphenols analyzed. The SUPRAS composition giving the best recoveries for bisphenols was that obtained from the following mixture: 4% hexanol, 30% THF and 66% of artificial saliva (percentages expressed by v/v/v).

6. Bibliografía.

- [1] M. Klar, D. Gunnarsson, A. Prevodnik, C. Hedfors, U. Dahl, Everything you (don't) want to know about plastics, Swedish Society for Nature Conservation (2014). Disponible en <http://www.naturskyddsforeningen.se/sites/default/files/dokument-media/rapporter/Plastic-Report.pdf>, última consulta: 07/09/2015.
- [2] R. U. Halden, Plastics and Health Risks, *Annu. Rev. Publ. Health*, 31 (2010) 179-194.
- [3] Å. Bergman, J. J. Heindel, S. Jobling, K. A. Kidd, R. T. Zoeller, State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals – 2012, United Nations Environment Programme and World Health Organization, 2013. Disponible en <http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/>, última consulta: 08/09/2015.
- [4] Bisphenol A (BPA): 2015 World Market Outlook and Forecast up to 2019, Market Publishers, 2015.
- [5] WHO (World Health Organization) (2012). Possible developmental early effects of endocrine disrupters on child health. Geneva, WHO document production services, 1-84. Disponible en http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75342/1/9789241503761_eng.pdf.
- [6] S. Kitamura, T. Suzuki, S. Sanoh, R. Kohta, N. Jinno, K. Sugihara, S. Yoshihara, N. Fujimoto, H. Watanabe, S. Ohta, Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds, *Toxicol. Sci.*, 84 (2005) 249-259.
- [7] J. R. Rochester, Bisphenol A and human health: a review of the literature, *Reprod. Toxicol.* 42 (2013) 132-155.
- [8] N. Khalil, J. R. Ebert, L. Wang, S. Belcher, M. Lee, S. A. Czerwinski, K. Kannan, Bisphenol A and cardiometabolic risk factors in obese children, *Science of the total environment*, 470 (2014) 726-732.
- [9] Bisphenol A alternatives in thermal paper, Environmental Protection Agency, US (2014). Disponible en http://www2.epa.gov/sites/production/files/2014-05/documents/bpa_final.pdf, última consulta: 08/09/2015.

- [10] SUBSPORT Specific Substances Alternatives Assessment – Bisphenol A (2013). Disponible en http://www.subsport.eu/wp-content/uploads/data/bisphenol_A.pdf, última consulta: 08/09/2015.
- [11] OPINION of the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety on the assessment of the risks associated with bisphenol A for human health, and on toxicological data and data on the use of bisphenols S, F, M, B, AP, AF and BADGE (2013). Disponible en <https://www.anses.fr/en/system/files/CHIM2009sa0331Ra-0EN.PDF>, última consulta: 08/09/2015.
- [12] P. Viñas, N. Campillo, N. Martínez-Castillo, M. Hernández-Córdoba, Comparison of two derivatization-based methods for solidphase microextraction-gas chromatography-mass spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and biphenol migrated from food cans, *Anal. Bioanal. Chem.*, 397 (2010) 1, 115-125.
- [13] L. Grumetto, D. Montesano, S. Seccia, S. Albrizio, F. Barbato, Determination of bisphenol A and bisphenol B residues in canned peeled tomatoes by reversed-phase liquid chromatography, *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008) 10633-10637.
- [14] K. Maruyama, M. Nakamura, S. Tomoshige, K. Sugita, M. Makishima, Y. Hashimoto, M. Ishikawa, Structure-activity relationships of bisphenol A analogs at estrogen receptors (ERs): Discovery of an ER α -selective antagonist, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 23 (2013) 4031-4036.
- [15] A. K. Rosenmai, M. Dybdahl, M. Pedersen, B. M. A. Vugt-Lussenburg, E. B. Wedebye, C. Taxvig, A. M. Vinggaard, Are structural analogues to bisphenol A safe alternatives?, *Toxicol. Sci.*, 139 (2014) 1, 35-47.
- [16] M.-Y. Chen, M. Ike, M. Fujita, Acute toxicity, mutagenicity, and estrogenicity of bisphenol-A and other bisphenols, *Environmental toxicology*, 17 (2002) 1, 80-86.
- [17] R. Chamorro-García, S. Kirchner, X. Li, A. Janesick, S. C. Casey, C. Chow, B. Blumberg, Bisphenol A diglycidyl ether induces adipogenic differentiation of multipotent stomal cells through a peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent mechanism, *Environ. Health Perspect.* 120 (2012) 984-989.

- [18] J. H. Kang, D. Asai, Y. Katayama, Bisphenol A in the aquatic environment and its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms, *Crit. Rev. Toxicol.*, 37 (2007) 607-625.
- [19] M. Song, D. Liang, Y. Liang, M. Chen, F. Wang, H. Wang, G. Jiang, Assessing developmental toxicity and estrogenic activity of halogenated bisphenol A on zebrafish (*Danio rerio*), *Chemosphere*, 112 (2014) 275-281.
- [20] H. Zhang, M. Xue, Y. Lu, Z. Dai, H. Wang, Microwave-assisted extraction for the simultaneous determination of Novolac glycidyl ethers, bisphenol A diglycidyl ether, and its derivatives in canned food using HPLC with fluorescence detection, *J. Sep. Sci.*, 33 (2010) 235-243.
- [21] N. Casajuana, S. Lacorte, New methodology for the determination of phthalate esters, bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether, and nonylphenol in commercial whole milk samples, *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 3702-3707.
- [22] Y. Li, Y. Jiao, Y. Guo, Y. Yang, Determination of bisphenol-A, 2,4-dichlorophenol, bisphenol-AF and tetrabromobisphenol-A in liquid foods and their packaging materials by vortex-assisted supramolecular solvent microextraction/high-performance liquid chromatography, *Anal. Methods*, 5 (2013) 5037-5043.
- [23] N. Rastkari, R. Ahmadkhaniha, M. Yunesian, L. J. Baleh, A. Mesdaghinia, Sensitive determination of bisphenol A and bisphenol F in canned food using a solid-phase microextraction fibre coated with single-walled carbon nanotubes before GC/MS, *Food Addit. Contam.* 27 (2010) 1460-1468.
- [24] X. L. Cao, J. Corriveau, Migration of bisphenol A from polycarbonate baby and water bottles into water under severe conditions, *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008) 15, 6378-6381.
- [25] J. E. Cooper, E. L. Kendig, S. M. Belcher, Assessment of bisphenol A released from reusable plastic, aluminium and stainless steel water bottles, *Chemosphere*, 85 (2011) 6, 943-947.

- [26] X. L. Cao, J. Corriveau, S. Popovic, Migration of bisphenol A from can coatings to liquid infant formula during storage at room temperature, *J. Food Prot.*, 72 (2009) 12, 2571-2574.
- [27] X. L. Cao, J. Corriveau, S. Popovic, Sources of low concentrations of bisphenol A in canned beverage products, *J. Food Prot.*, 73 (2010) 8, 1548-1551.
- [28] V. Samanidou, M. Hadjicharalampous, I. P. Palaghias, G. Palaghias, Development and validation of an isocratic HPLC method for the simultaneous determination of residual monomers released from dental polymeric materials in artificial saliva, *J. Liq. Chromatography Relat. Technol.*, 35 (2012) 37-41.
- [29] A. Kingman, J. Hyman, S. A. Masten, B. Jayaram, C. Smith, F. Eichmiller, et al., Bisphenol A and other compounds in human saliva and urine associated with the placement of composite restorations, *J. Am. Dent. Assoc.*, 143 (2012) 1292-1302.
- [30] M. D. Martin, Exposure to Bisphenol A (BPA) from dental sealants is detectable in saliva and urine, and varies significantly between sealant formulations, *J. Evid. Based. Dent. Pract.*, 7 (2007) 79-80.
- [31] J. I. Cacho, N. Campillo, P. Viñas, M. Hernández-Córdoba, Stir bar sorptive extraction with EG-Silicone coating for bisphenols determination in personal care products by GC-MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 78-79 (2013) 255-260.
- [32] A. Ohtta, H. Itayama, M. Tomioka, Hair treatment and method of treating hair using compounded resin containing urethane resin, US Patent 6641804B1 (2003).
- [33] W. Wang, K. O. Abualnaja, A. G. Asimakopoulos, A. Covaci, B. Gevao, B. Johnson-Restrepo, T. A. Kumosani, G. Malarvannan, T. B. Minh, H. Moon, H. Nakata, R. K. Sinha, K. Kannan, A comparative assessment of human exposure to tetrabromobisphenol A and eight bisphenols including bisphenol A via indoor dust ingestion in twelve countries, *Environ. Int.*, 83 (2015) 183-191.
- [34] J. M. Braun, A. E. Kalkbrenner, A. M. Calafat, J. T. Bernert, X. Ye, M. J. Silva, D. B. Barr, S. Sathyanarayana, B. P. Lanphear, Variability and predictors of urinary bisphenol A concentrations during pregnancy, *Environ. Health Perspect.* 119 (2011) 1, 131-137.

- [35] L. Wang, Y. Wu, W. Zhang, K. Kannan, Widespread occurrence and distribution of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) and its derivatives in human urine from the United States and China, *Environ. Sci. Technol.*, 46 (2012) 12968-12976.
- [36] L. Cobellis, N. Colacurci, E. Trabucco, C. Carpentiero, L. Grumetto, Measurement of bisphenol A and bisphenol B levels in human blood sera from healthy and endometriotic women, *Biomed. Chromatogr.* 23 (2009) 1186-1190.
- [37] A. G. Asimakopoulos, N. S. Thomaidis, K. Kannan, Widespread occurrence of bisphenol A diglycidyl ethers, p-hydroxybenzoic acid esters (parabens), benzophenone type-UV filters, triclosan, and triclocarban in human urine from Athens, Greece, *Sci. Total Environ.*, 470-471 (2014) 1243-1249.
- [38] J. Xue, Q. Wu, S. Sakthivel, P. V. Pavithran, J. R. Vasukutty, K. Kannan, Urinary levels of endocrine-disrupting chemicals, including bisphenols, bisphenol A diglycidyl ethers, benzophenones, parabens, and triclosan in obese and non-obese indian children, *Environ. Res.*, 137 (2015) 120-128.
- [39] Y. Deceuninck, E. Bichon, P. Marchand, C. Boquien, A. Legrand, C. Boscher, J. P. Antignac, B. L. Bizec, Determination of bisphenol A and related substitutes/analogues in human breast milk using gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 407 (2015) 9, 2485-2497.
- [40] F. Vela-Soria, O. Ballesteros, F. J. Camino-Sánchez, A. Zafra-Gómez, L. Ballesteros, A. Navalón, Matrix solid phase dispersion for the extraction of selected endocrine disrupting chemicals from human placental tissue prior to UHPLC-MS/MS analysis, *Microchem. J.*, 118 (2015) 32-39.
- [41] S. C. Cunha, J. O. Fernandes, Quantification of free and total bisphenol A and bisphenol B in human urine by dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and heart-cutting multidimensional gas chromatography-mass spectrometry (MD-GC/MS), *Talanta*, 83 (2010) 117-125.
- [42] N. Venisse, C. Grignon, B. Brunet, S. Thévenot, A. Bacle, V. Migeot, A. Dupuis, Reliable quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human urine using UPLC-MS/MS method, *Talanta*, 125 (2014) 284-292.

- [43] C. Liao, K. Kannan, Determination of free and conjugated forms of bisphenol A in human urine and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Environ. Sci. Technol.*, 46 (2012) 5003-5009.
- [44] V. Migeot, A. Dupuis, A. Cariot, M. Albouy-Llaty, F. Pierre, S. Rabouan, Bisphenol A and its chlorinated derivatives in human colostrum, *Environ. Sci. Technol.*, 47 (2013) 13791-13797.
- [45] I. Jiménez-Díaz, A. Zafra-Gómez, O. Ballesteros, N. Navea, A. Navalón, M. F. Fernández, N. Olea, J. L. Vilchez, Determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in placental tissue samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, 878 (2010) 3363-3369.
- [46] M. F. Fernández, J. P. Arrebola, J. Taoufik, A. Navalón, O. Ballesteros, R. Pulgar, J. L. Vilchez, N. Olea, Bisphenol-A and chlorinated derivatives in adipose tissue of women, *Reprod. Toxicol.* 24 (2007) 259-264.
- [47] F. Vela-Soria, O. Ballesteros, A. Zafra-Gomez, L. Ballesteros, A. Navalon, UHPLC-MS/MS method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives, bisphenol S, parabens, and benzophenones in human urine samples, *Anal. Bioanal. Chem.*, 406 (2014) 3773-3785.
- [48] A. Cariot, A. Dupuis, M. Albouy-Llaty, B. Legube, S. Rabouan, V. Migeot, Reliable quantification of bisphenol A and its chlorinated derivatives in human breast milk using UPLC-MS/MS method, *Talanta*, 100 (2012) 175-182.
- [49] Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. *Official J. Eur. Union* (2011) L 12, 1-89.
- [50] European Commission Regulation (EC) No 1895/2005 of 18 November 2005 on the restriction of use of certain epoxy derivatives in materials and articles intended to come into contact with food (2005) L302/28, 1-5.
- [51] EC regulation No 321/2011 of 1 April 2011 amending Regulation (EU) No 10/2011 as regards the restriction of use of Bisphenol A in plastic infant feeding bottles, *Official Journal of the European Union*, L87/1.

- [52] USEPA, U.S. Environmental Protection Agency. Bisphenol A Action Plan (2010). Disponible en http://www.epa.gov/oppt/existingchemicals/pubs/actionplans/bpa_action_plan.pdf, última consulta: 08/09/2015.
- [53] USFDA, U.S. Food and Drug Administration Bisphenol A (BPA): Use in Food Contact Application, (2013). Disponible en <http://www.fda.gov/newsevents/publichealthfocus/ucm064437.htm>, última consulta: 08/09/2015.
- [54] Å. Bergman, J. J. Heindel, S. Jobling, K. A. Kidd, R. T. Zoeller, State of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals – 2012, United Nations Environment Programme and World Health Organization, 2013. Disponible en <http://www.who.int/ceh/publications/endocrine/en/>, última consulta: 08/09/2015.
- [55] A. Kortenkamp, O. Martin, M. Faust, R. Evans, R. McKinlay, F. Orton, E. Rosivatz, State of the art assessment of endocrine disrupters, (2012). Disponible en http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/sota_edc_final_report.pdf última consulta: 17/09/2015.
- [56] A. Kortenkamp, Ten Years of Mixing Cocktails: A Review of Combination Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals, *Environ. Health Perspect.* 115 (2007) 98-105.
- [57] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Potential of supramolecular solvents for the extraction of contaminants in liquid foods, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 3, 530-539.
- [58] P. Sadílek, D. Satínský, P. Solich, Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically-active compounds in complex matrices, *Trends Anal. Chem.*, 26 (2007) 375-384.
- [59] S. Souverain, S. Rudaz, J. L. Veuthey, Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis, *J. Chromatogr. B*, 801 (2004) 141-156.
- [60] N. M. Cassiano, V. V. Lima, R. V. Oliveira, A. C. Pietro, Q. B. Cass, Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of

biological fluid samples via high-performance liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.*, 384 (2006) 1462-1469.

- [61] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, Environment-responsive alkanol-based supramolecular solvents: characterization and potential as restricted access property and mixed-mode extractants, *Anal. Chem.*, 84 (2012) 342-349.
- [62] B. Shao, H. Han, J. Hu, J. Zhao, G. Wu, Y. Xue, S. Zhang, Determination of alkylphenol and bisphenol a in beverages using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry., *Anal. Chim. Acta*, 530 (2005) 2, 245-252.
- [63] N. C. Maragou, E. N. Lampi, N. S. Thomaidis, M. Koupparis, Determination of bisphenol A in milk by solid phase extraction and liquid chromatography mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1129 (2006) 2, 165-173.
- [64] D. Pérez-Palacios, M. Á. Fernández-Recio, C. Moreta, M. T. Tena, Determination of bisphenol-type endocrine disrupting compounds in food-contact recycled-paper materials by focused ultrasonic solid-liquid extraction and ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, *Talanta*, 99 (2012) 167-174.
- [65] J. Yonekubo, K. Hayakawa, J. Sajiki, Concentrations of bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether, and their derivatives in canned foods in Japanese markets, *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008) 6, 2041-2047.
- [66] J. Xue, Q. Wu, S. Sakthivel, P. V. Pavithran, J. R. Vasukutty, K. Kannan, Urinary levels of endocrine-disrupting chemicals, including bisphenols, bisphenol A diglycidyl ethers, benzophenones, parabens, and triclosan in obese and non-obese Indian children, *Environmental Research*, 137 (2015) 120-128.
- [67] K. Aalto-Korte, K. Alanko, M.-L. Henriks-Eckerman, T. Estlander, R. Jolanki, Allergic contact dermatitis from bisphenol A in PVC gloves, *Contact Dermatitis*, 49 (2003) 202-205.
- [68] L. Matthieu, A. F. L. Godoi, J. Lambert, R. Van Grieken, Occupational allergic contact dermatitis from bisphenol A in vinyl gloves, *Contact Dermatitis*, 49 (2003) 281-283.
- [69] P. D. V. De Almeida, A. M. Grégio, M. A. Machado, A. A. De Lima, L. R. Azevedo, Saliva composition and functions: A comprehensive review, *J. Contemp. Dent.*

Pract., 9 (2008) 72-80.

- [70] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, Environment-responsive alkanol-based supramolecular solvents: Characterization and potential as restricted access property and mixed-mode extractants, *Anal. Chem.*, 84 (2012) 342-349.