



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ESTUDIO DE UN POLÍMERO DE IMPRESIÓN MOLECULAR  
(MIP) PARA LA DETECCIÓN DE BISFENOL A (BPA) EN UN  
ALIMENTO ENLATADO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUIMICO EN ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**RODRIGO GABRIEL GONZÁLEZ AQUINO**

**CIUDAD UNIVERSITARIA,  
CIUDAD DE MÉXICO**

**2016**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Jurado Asignado**

**Presidente: Miquel Gimeno Seco**

**Vocal: Argelia Sánchez Chinchillas**

**Secretario: Roeb García Arrazola**

**1er. Suplente: Alejandro Zavala Rivapalacios**

**2° Suplente: Nidia Maribel Mariano García**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Facultad de Química Edificio E Departamento de Alimentos y  
Biotecnología Lab-313

**ASESOR DEL TEMA:**

**Dr. Roeb García Arrazola** \_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

**Rodrigo Gabriel González Aquino** \_\_\_\_\_

Índice

<b>1. RESUMEN E INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>7</b>
2.1. CONTAMINANTES EMERGENTES .....	8
2.2. DISRUPTORES ENDÓCRINOS (EDC).....	10
2.3. BISFENOL A (BPA) .....	13
<b>2.3.1. BPA en envases de alimentos.....</b>	<b>13</b>
<b>2.3.2. BPA en el mundo .....</b>	<b>15</b>
<b>2.3.3. Bio-transformación y efectos tóxicos de BPA.....</b>	<b>17</b>
<b>2.3.4. Metodologías para la detección de BPA en alimentos.....</b>	<b>19</b>
2.4. POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR (MIP'S) .....	22
<b>2.4.1. Síntesis de un MIP.....</b>	<b>24</b>
2.4.1.1. Molécula Molde o Plantilla .....	24
2.4.1.2. Monómeros Funcionales.....	24
2.4.1.3. Agente Entrecruzante .....	26
2.4.1.4. Disolvente o Porógeno.....	27
2.4.1.5. Iniciador de Radicales Libres .....	28
2.5. TIPOS DE POLIMERIZACIÓN .....	29
<b>2.5.1. Polimerización por bloque.....</b>	<b>29</b>
<b>2.5.2. Polimerización por precipitación.....</b>	<b>30</b>
2.6. POLÍMERO NO IMPRESO (NIP) .....	31
2.7. MIP'S DE BPA EN MATRICES ALIMENTO .....	31
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....</b>	<b>35</b>
3.1. HIPÓTESIS .....	36
3.2. OBJETIVOS.....	37
<b>3.2.1. Objetivo General .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.2. Objetivos Particulares.....</b>	<b>37</b>
<b>4. MATERIALES E INSTRUMENTACIÓN .....</b>	<b>38</b>
4.1. MATERIALES .....	39
4.2. INSTRUMENTACIÓN .....	39
<b>5. METODOLOGÍA.....</b>	<b>42</b>
5.1. SÍNTESIS DE POLÍMERO DE IMPRESIÓN MOLECULAR .....	44
<b>5.1.1. Síntesis por precipitación .....</b>	<b>44</b>
5.1.1.1 Síntesis .....	44
5.1.1.2 Extracción de molécula molde .....	45
<b>5.1.2. Síntesis por bloques .....</b>	<b>46</b>
5.1.2.1 Síntesis .....	46
5.1.2.2 Extracción de molécula molde .....	47
5.1.2.3 Caracterización .....	47
5.1.2.3.1 Incubación del polímero (Prueba de Re-unión).....	47
5.1.2.3.2 Prueba de re-uso.....	48
5.1.2.3.3 Ensayo de competencia molecular .....	48
5.1.2.3.4 Morfología microscópica .....	48
5.1.2.3.5 FTIR .....	49
5.1.2.3.6 Grado de Hinchazón .....	49

5.2 SÍNTESIS DE POLÍMERO NO IMPRESO .....	49
5.3 PRUEBAS DE ADSORCIÓN DE BPA EN MATRIZ ALIMENTARIA.....	49
5.4 DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DEL BPA .....	50
<b>5.4.1 Derivatización</b> .....	50
<b>5.4.2 Análisis por GC-MS</b> .....	50
<b>6. RESULTADOS Y ANÁLISIS .....</b>	<b>51</b>
6.1. SÍNTESIS DE POLÍMERO DE IMPRESIÓN MOLECULAR.....	52
<b>6.1.1. Polimerización por Precipitación (PP)</b> .....	53
<b>6.1.2. Polimerización por Bloques</b> .....	54
6.2. COMPARACIÓN EN LA SÍNTESIS DE POLIMERIZACIÓN DE BLOQUES Y PRECIPITACIÓN .....	55
6.3 CARACTERIZACIÓN DEL POLÍMERO .....	60
<b>6.3.1 Prueba de re-unión</b> .....	60
<b>6.3.2 Prueba de Re-uso</b> .....	61
<b>6.3.3 Ensayo de competencia molecular</b> .....	62
<b>6.3.4. Caracterización Morfológica</b> .....	66
<b>6.3.5 Grado de hinchazón</b> .....	68
<b>6.3.6 FTIR</b> .....	69
6.4.- PRUEBAS DE ADSORCIÓN DE BPA EN MATRIZ ALIMENTARIA .....	74
<b>7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>77</b>
7.1 CONCLUSIONES.....	78
7.2 RECOMENDACIONES.....	79
<b>8. ANEXO Y BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>80</b>
8.1 ANEXO.....	81
8.2 BIBLIOGRAFÍA .....	83

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Estructura de Bisfenol A.....	13
<b>Figura 2.</b> Síntesis de plásticos de policarbonato y resinas epoxi.....	13
<b>Figura 3.</b> Formas de conjugación de del BPA.....	18
<b>Figura 4.</b> Reactor para la síntesis de MIP y NIP.....	39
<b>Figura 5.</b> Centrifugadora Hemle Z200A.....	40
<b>Figura 6.</b> CG-MS, Instituto de Ingeniería, UNAM.....	40
<b>Figura 7.</b> Microscopio electrónico de barrido y FTIR.....	41
<b>Figura 8.</b> Proceso de polimerización.....	47
<b>Figura 9.</b> Polímero de impresión molecular por precipitación.....	53
<b>Figura 10.</b> Polímero de impresión molecular por precipitación.....	54
<b>Figura 11.</b> MIP por PP después de los lavados y extracción de la molécula molde.....	54
<b>Figura 12.</b> Polimerización por bloques con diferentes lotes de agente entrecruzante.....	55
<b>Figura 13.</b> Disminución de tamaño de partícula y extracción Soxhlet.....	57
<b>Figura 14.</b> Señal de BPA en los extractos de extracción superficial.....	57
<b>Figura 15.</b> Iones m/z del BPA .....	58
<b>Figura 16.</b> Mecanismos de unión de la piridina y el BPA.....	59
<b>Figura 17.</b> Incubación de MIP y NIP.....	60
<b>Figura 18.</b> Prueba de re-usabilidad del MIP. Concentración inicial de BPA.....	62
<b>Figura 19.</b> Estructura química de los compuestos utilizados en competencia molecular.....	63
<b>Figura 20.</b> Competencia molecular de BPA con moléculas similares.....	65
<b>Figura 21.</b> Espectro IR .....	71
<b>Figura 22.</b> Mecanismo de reacción propuesto de la síntesis del MIP.....	73
<b>Figura 23.</b> Cromatograma de estándar del néctar.....	74
<b>Figura 24.</b> Concentración de BPA después de la adsorción en MIP.....	75
<b>Figura 25.</b> Respuesta cromatográfica de BPA después del ensayo de adsorción en MIP.....	76

**Figura 26.** Cromatograma Curva Patrón.....81

**Figura 27.** Mecanismo de derivatización.....82

**Índice de Tablas**

Tabla 1. Compuestos detectados en aguas residuales (elaboración propia con base a Gil *et al.*, 2012)..... 9

Tabla 2. Alteraciones reportadas por disruptores endocrinos (Adaptado de Mozo, 2002)..... 11

Tabla 3. Plásticos utilizados en el envasado de alimentos (González *et al.*, 2011) 14

Tabla 4. Concentraciones BPA detectadas en diferentes matrices alimentos. (Shaw, 2009)..... 15

Tabla 5. Efectos tóxicos por exposición a BPA. (Adaptada de González *et al.*, 2009) ..... 18

Tabla 6. Metodologías para detección de BPA en matrices alimentarias (Ballesteros-Gómez *et al.*, 2009) ..... 20

Tabla 7. MIP's dirigidos para el área de alimentos. .... 23

Tabla 8. Monómeros más usados en la síntesis de MIP's. (Fuente de López Luna, 2006) ..... 25

Tabla 9. Entrecruzantes más usados en la síntesis de MIP's. (Modificado de López Luna, 2006)..... 27

Tabla 11: MIP's de BPA en matriz alimento ..... 32

Tabla 12.-Metodologías experimentales para la síntesis de polímeros por precipitación y bloques. .... 52

Tabla 13.-Comparación de la síntesis de polimerización por precipitación y por bloques. .... 55

Tabla 14.-Concentración de BPA libre en extracción superficial e interna del MIP. .... 58

Tabla 15.- Prueba de re-unión para comparación entre MIP y NIP. .... 60

Tabla 16.-Prueba de re-uso para la retención de BPA en MIP ..... 61

Tabla 17.- Concentraciones de BPA libre en competencia con otros compuestos. 63

Tabla 18.-Microscopía SEM de los polímeros. .... 67

**Índice de Diagramas**

Diagrama 1: Metodología de MIP por precipitación..... 43

Diagrama 2: Metodología de polimerización por bloques..... 44

Diagrama 3: Diagrama General del proyecto..... 46



## Índice de Abreviaturas

4-VYP.- 4 Vinil Piridina

### A

ABDV.-Azo-bis-dimetilvaleronitrilo

AIBN.-2,2 Azo-iso-butironitrilo

ANSES.- Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria de Alimentación,  
Medioambiente y Trabajo

### B

BPA.-Bisfenol A

BPAG.- Bisfenol A Glucoronido

BPA-DMC.-Bisfenol A Dimetacrilato

BPF.-Bisfenol F

### C

CE.-Contaminantes Emergentes

CINVESTAV.-Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados

### D

DDT.- Dicloro difenil tricloroetano

DES.- dietilestilbestrol

### E

EFSA.- Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

EGDMA.-Etilenglicol Dimetacrilato

EDC.-Disruptores Endocrinos

### F

FTIR.-Infrarrojo de Transformada de Fourier

### G

GC-MS.- Cromatógrafo de gases acoplado a masas

### H

HEX.-Hexestrol

HPLC.- Cromatografía líquida de alta eficacia

### I

IR.-Infrarrojo

### K

K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.-Carbonato de sodio

**L**

LANE.-Laboratorio Avanzado de Nanoscopía Electrónica

LLE.-Extracción Líquido-líquido

**M**

MAA.-Acido Metacrilato

MAE.-Extracción asistida por microondas

MECN.-Acetonitrilo

MEOH.-Metanol

MIP.-Polímero de Impresión Molecular

MISPE.-Polímero impreso de extracción en fase sólida

**N**

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.-Sulfato de Sodio

NIP.- Polímero No Impreso

**O**

OHAc.-Ácido Acético

**P**

PLE.-Extracción líquida por presión

PP.- Polimerización por precipitación

**R**

rpm.- Revoluciones por minuto

**S**

SEM.- Microscopio electrónico de barrido

SPE.-Extracción de fase sólida

SPME.-Micro extracción de fase sólida

**T**

t-IDT.-Ingesta diaria tolerable

TRIM.-Trimetil propano trimetacrilato

**U**

UE.-Unión Europea

UGT.-Uridina difosfato Glucosil Transferasa

UV.-Ultravioleta

*“Si tu intención es describir la verdad, hazlo  
con sencillez y la elegancia déjasela al sastre.”*

*Albert Einstein*

## **1. Resumen e Introducción**

## **RESUMEN**

El Bisfenol A (BPA) es un contaminante emergente y un disruptor endócrino. El BPA es un intermediario usado como monómero esencial en la fabricación de plásticos de policarbonato y producción de resinas epoxi utilizadas en recubrimiento de latas. La principal vía de exposición de BPA es la oral, siendo la Ingesta Diaria Tolerable temporal (t-IDT) de 5 µg/kg de peso corporal al día.

La metodología de polímeros de impresión molecular representa una opción para la extracción y detección de BPA en el área de alimentos debido a su selectividad, reusabilidad y versatilidad en la síntesis.

En este proyecto de tesis se sintetizó un polímero de impresión molecular (MIP) por la metodología de bloques para la detección de BPA en una matriz alimenticia.

Se comparó la polimerización por bloques y precipitación con base en su conversión de polimerización. La polimerización por bloques fue mayor en un 31% respecto a la polimerización por precipitación. Además, ofrece mayores ventajas en cuanto a menor uso de reactivos y por lo tanto menor generación de residuos. Por lo anterior, se propuso utilizar la síntesis de polimerización por bloques para las pruebas de adsorción de BPA en medio acuoso, así como los ensayos de detección selectiva de BPA en una matriz alimenticia.

El MIP adsorbe 93% de BPA en un medio ideal con respecto a un 62% de un NIP (Polímero no impreso). Lo anterior se atribuye a que el MIP es diseñado para comportarse selectivamente y tener una fuerte afinidad hacia el BPA, en cambio el NIP tiene una unión no específica y por lo tanto no es selectivo. El MIP sintetizado es una alternativa para la detección rápida (un día) de BPA en un medio acuoso y puede ser re-utilizado; no así para la remoción de BPA total.

El ensayo de competencia molecular con el MIP de BPA fue realizado frente a las siguientes moléculas por su similaridad: hexestrol (HEX), Bisfenol F (BPF) y, Bisfenol A dimetacrilato (BPA-DMC). El MIP presentó una afinidad en tamaño y forma hacia el BPF (Peso Molecular: 200) y HEX (Peso Molecular: 270), sin perder su memoria de reconocimiento hacia el BPA. Sin embargo, en competencia con BPA-DMC (Peso Molecular: 364), las cavidades del polímero puedan ser heterogéneas en forma, y se presume que el impedimento estérico es un factor que dificulta la unión a las cavidades selectivas específicamente diseñadas para el BPA.

Se caracterizó la morfología del MIP mediante una microscopia electrónica de barrido (SEM). La espectroscopia infrarroja por transformada de fourier (FTIR) confirmó un buen grado de entrecruzamiento del polímero obteniendo un material semi-cristalino y rígido.

Se logró detectar una concentración de 440 ng/mL de BPA en una bebida comercial enlatada y se consiguió con éxito adsorber en el MIP el 80 % del bisfenol A.

## INTRODUCCIÓN

Los contaminantes emergentes alimentarios se definen como *“Las sustancias que no han sido adicionadas intencionalmente a los alimentos y las formas de exposición son muy diversas, siendo la vía oral la principal ruta de exposición para el hombre”* (Cameán-Fernández, 2009).

En lo particular, se refieren a los contaminantes que actualmente no están contemplados en una regulación o normatividad, ya sea porque no se han estudiado antes o que hasta ahora no se han dado evidencias científicas suficientes sobre sus daños a la salud y al medio ambiente (Eljarrat y Barceló, 2003). Recientemente, en la industria de alimentos, ha surgido controversia con respecto a los contaminantes emergentes y su forma de exposición al ser humano, siendo la principal la vía oral para el hombre (Cameán-Fernández, 2009).

Entre los contaminantes emergentes de mayor interés se encuentra el Bisfenol A (BPA), del cual se han estudiado y comprobado sus efectos de disrupción endócrina. Este compuesto es usado en la industria de alimentos como precursor de resinas epoxi de recubrimientos internos de latas y en envases de alimentos como plásticos de policarbonato. Sin embargo, la baja eficiencia durante la síntesis de las resinas resulta en moléculas de BPA residual con el potencial de migrar al alimento (Kang *et al.*, 2006).

Debido a que la principal vía de exposición a contaminantes emergentes es la oral, se han establecido límites de ingesta sin causar un efecto dañino a largo plazo. Al respecto, la Ingesta Diaria Tolerable (t-IDT) del BPA es de 5 µg /Kg de peso corporal al día (EFSA, 2010).

Las concentraciones de BPA encontradas en alimentos están en el orden de nanogramos, por lo que es importante emplear técnicas analíticas que sean sensibles y reproducibles. Por ejemplo, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) o la cromatografía de gases acoplada a masas. Sin

embargo, el proceso de extracción del contaminante emergente, por medio de disolventes orgánicos o en fase sólida, para estas técnicas analíticas resulta laboriosa (Ballesteros-Gómez *et al.*, 2009).

Actualmente, se han desarrollado nuevas metodologías de extracción que mejoren la reproducibilidad y reduzcan la cantidad de insumos empleados. Entre éstas, se encuentran extracción asistida por microondas (MAE), extracción líquida por presión (PLE), la microextracción de fase sólida (SPME) y los polímeros de impresión molecular (MIP).

Los Polímeros de Impresión Molecular (MIP's por sus siglas en inglés) es una metodología que se basa en el reconocimiento molecular, donde una especie química es reconocida e identificada selectivamente por un receptor adecuado. Entre sus ventajas más importantes están el re-uso, y la versatilidad del proceso de síntesis del polímero. Los MIP's se han empleado en estudios de aguas residuales debido a su selectividad (Murray *et al.*, 2012) e inclusive, en la detección de BPA en agua (Ren *et al.*, 2012). En el área de alimentos se han usado en la detección de cloramfenicol en leche (Shi *et al.*, 2007), cafeína en bebidas (Farrington *et al.*, 2006), triazina en papa (Cacho *et al.*, 2006) y BPA en alimentos enlatados (Martin-Esteban y Tadeo, 2006).

Por lo anterior, en este proyecto de investigación se propone estudiar el desempeño de un MIP para detectar BPA en una bebida enlatada. Particularmente, examinar su síntesis, morfología, re-uso y selectividad por competencia molecular.



## **2. Marco Teórico**

## **2.1. Contaminantes Emergentes**

Actualmente en la industria de alimentos se ha mencionado el término de “*contaminantes emergentes alimentarios*”. Éste término es poco conocido debido a que la línea de investigación es reciente y generalmente el estudio de disruptores endócrinos solía enfocarse en agua principalmente. (Navarro, 2009).

Por definición: “*Los contaminantes emergentes (CE) son compuestos de distinto origen y naturaleza química cuya presencia en el medio ambiente, o las posibles consecuencias de la misma, han pasado en gran parte inadvertidas*” (Stuart et al., 2012).

Otra definición es: “*Son compuestos de los cuales relativamente se sabe poco o nada acerca de su presencia e impacto en los distintos compartimientos ambientales y en el hombre y que, por tanto, precisan investigación*” (Barceló, 2007).

Los contaminantes emergentes (CE) se encuentran en el medio ambiente, siendo las aguas residuales (domesticas e industriales) la principal fuente de contaminación (Gil et al., 2012). Dado su carácter de emergente la mayoría de estos contaminantes detectados no están contemplados en una regulación o normatividad (Kang et al., 2006).

La *tabla 1* muestra los principales contaminantes emergentes y algunos ejemplos característicos.

**Tabla 1.** Compuestos detectados en aguas residuales (elaboración propia con base a Gil *et al.*, 2012)

<b>Compuestos</b>	<b>Ejemplos</b>
<b>Pesticidas o Plaguicidas</b>	DDT, atrazina, endosulfan, malatión, arsénico pentóxido, paraquat, carbaryl, fenvalerato
<b>Productos Farmacéuticos</b>	Naproxeno, ibuprofeno, diclofenaco, metoprolol, alquifenol, triclosan, anfetaminas, cocaína, morfina
<b>Hormonas Esteroideas</b>	Testosterona, cortisol, estradiol, progesterona, 17 $\beta$ -estradiol
<b>Compuestos de Cuidado personal y estilo de vida</b>	N,N-dietiltoluidina, benzofenona, metilbenzildenecámbor, cafeína, nicotina, triclosan
<b>Retardantes de llamas</b>	Cloroisopropilfosfato (TCCP), tris 2-cloro etil fosfato (TCEP), hexabromociclodecano (HBCD), decabromodifeniletano (DBDFE)

En la industria de los alimentos, la presencia de los contaminantes emergentes en los alimentos puede producirse:

- A lo largo de la cadena de la producción primaria:

Las materias primas pueden contener contaminantes ambientales, tales como: metales pesados, residuos de plaguicidas, agentes químicos industriales y productos procedentes de la combustión. Esta contaminación se da en mayor frecuencia para los alimentos de origen vegetal (Fernández *et al.*, 2012).

En los productos de origen animal, pueden estar presentes residuos de medicamentos veterinarios y agentes promotores del crecimiento (Navarro, 2009).

- Procesado tecnológico:

Durante el envasado y almacenamiento, los alimentos pueden sufrir una contaminación por parte del envase a partir de monómero (Martin-Esteban *et al.*, 2006; Ballesteros-Gómez *et al.*, 2007; Navarro, 2009).

## **2.2. Disruptores Endócrinos (EDC)**

Por definición son:

*“Sustancias de origen natural o artificial que pueden imitar o interferir con la función de las hormonas, en particular los estrógenos, andrógenos y las hormonas tiroideas en el cuerpo. Pueden encender, apagar o modificar señales que hormonas llevan y por lo tanto afectan a las funciones normales de los tejidos y órganos”* (Shaw, 2009).

Los disruptores endócrinos (EDC) no presentan un patrón lineal (a mayor dosis, mayor efecto negativo) sino que presentan curvas de toxicidad cuadráticas de forma que a concentraciones bajas pueden observarse efectos tóxicos no observables a dosis más altas o viceversa (Shaw, 2009).

Las concentraciones reportadas con un efecto adverso están en el rango de nano a micro molar (Vandermeersch *et al.*, 2015), pudiendo afectar el funcionamiento del sistema hormonal mediante cuatro mecanismos (Rivas *et al.*, 2004):

- mimetizando la acción de las hormonas naturales.
- bloqueando y/o antagonizando la acción de las hormonas.
- alterando el patrón de síntesis y metabolismo en las hormonas.
- aumentando o disminuyendo los niveles de los receptores hormonales correspondientes.

Se han detectado EDC en alimentos que se consumen diariamente, tales como: queso carne, bebidas embotelladas, vegetales, frutas, cereales (Petersen *et al.*, 2000; Boti *et al.*, 2009; Maffini *et al.*, 2009). Entre estos disruptores se encuentran sustancias persistentes, bio-acumulativas y órgano-halógenas, que incluyen

algunos plaguicidas (fungicidas, herbicidas e insecticidas), bifenilos-policlorados similares a las dioxinas (PCB), estireno, ftalatos, compuestos orgánicos de estaño y nonilfenol (NP), así como BPA (Shaw, 2009).

Habitualmente se puede interactuar con muchos de estos compuestos en la vida cotidiana por ejemplo:

- Alquilfenolesetoxilados.- Usados en productos de limpieza, aerosoles para plantas, plásticos y cosméticos.
- Organoclorados.- Empleados como insecticidas como el DDT y similares que están prohibidos en la Unión Europea (UE) sin embargo, se siguen utilizando ilegalmente.
- BPA.- Empleado en la elaboración de botellas de plástico para agua y biberones; forma parte de barnices epóxicos y para plásticos entre otros (Gil *et al.*, 2012).

Generalmente, los EDC pueden interactuar directamente con la proteína receptora de la hormona o sobre una que controla la síntesis o transporte de la hormona, por lo que podría interferir en el proceso de control hormonal, interactuar con varios receptores simultáneamente o sinérgicamente produciendo efectos que no se ven al actuar individualmente (Bergman *et al.*, 2012). Actualmente, se han realizado diversos estudios científicos donde se afirman los efectos sobre la salud humana. La *tabla 2* presenta las principales alteraciones reportadas:

**Tabla 2.** Alteraciones reportadas por disruptores endocrinos (Adaptado de Mozo, 2002)

<b>Daños a la salud reproductora</b>	
<i>Sistema reproductor masculino</i>	<i>Sistema reproductor femenino</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminución de la calidad del semen                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Criptoquidia</li> <li>• Hipospadias</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reducción de fecundidad y fertilidad                             <ul style="list-style-type: none"> <li>• Síndrome de Ovarios Poliquísticos</li> <li>• Endometriosis</li> </ul> </li> </ul>

### **Tumores en órganos hormono dependientes**

- Cáncer de testículo y
- Cáncer de próstata
- Cáncer de tiroides
- Cáncer de mama
- Cáncer de Ovario
- Cáncer de tiroides

---

### **Alteraciones en el desarrollo del sistema neurológico**

- Cognitivos del aprendizaje y memoria.
- Agresividad
- Deficits sensoriales
- Deterioro motor, pérdida de memoria y cambios en el comportamiento.
- Autismo
- Defectos del desarrollo embriológico

---

### **Enfermedades Metabólicas**

- Diabetes y obesidad
- 

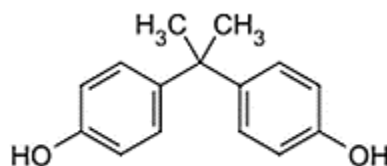
Los efectos de los EDC son distintos sobre el embrión, el feto, el organismo perinatal o el adulto. En muchos casos puede haber un gran periodo de latencia entre el momento de la exposición y el momento en el que los efectos se ponen de manifiesto pero si actúan durante un periodo crítico (desarrollo embrionario), las manifestaciones obvias pueden no producirse hasta la madurez y el impacto puede ser irreversible (Andrade-Ribeiro *et al.*, 2006).

Como se observa en la *tabla 2*, los EDC pueden causar diversos efectos adversos que están relacionados a problemas de fertilidad, daños congénitos, alteraciones en el sistema neurológico, enfermedades metabólicas y tumores en órganos homodependientes que son asociados a compuestos como: dietilestilbestrol (DES), plomo, plaguicidas organofosforados, compuestos organoclorados (DDT, pentaclorofenol), bifenilos polibromados (PBB) y BPA (Mozo, 2012).

## 2.3. Bisfenol A (BPA)

### 2.3.1. BPA en envases de alimentos

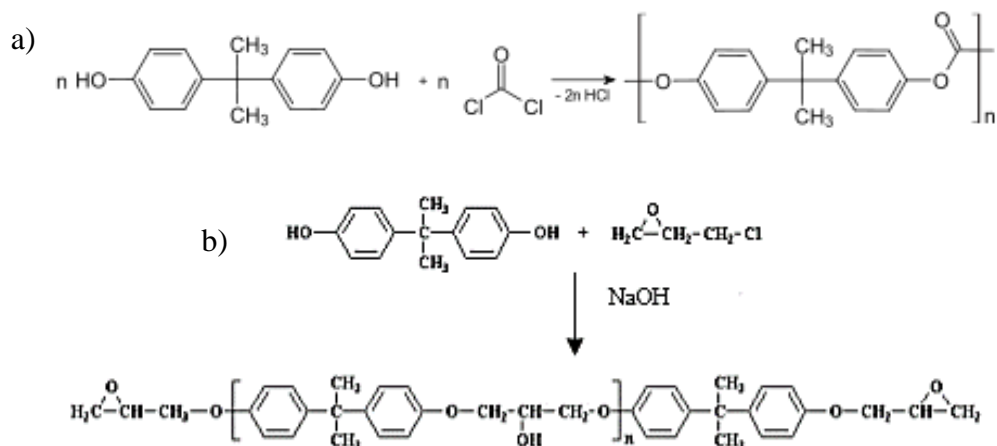
El BPA [2,2-bis (4-hidroxyfenol) propano] (Fig. 1) es un compuesto químico orgánico que se obtiene por la condensación de un fenol y una acetona catalizada por un ácido o un compuesto alcalino (Kang *et al.*, 2006). Es un intermediario que es usado como monómero esencial en la fabricación de plásticos de policarbonato, poliésteres y producción de resinas epoxi (Plastics Europe, 2014).



**Figura 1.** Estructura de BPA.

La demanda global de BPA sigue creciendo. En el 2006, se produjeron 3.9 millones de toneladas, aumentando su producción a 5 millones de toneladas en el 2013. Los países que más destacan en la producción de BPA son: Alemania, Holanda, Estados Unidos y Japón (Ballesteros-Gómez *et al.*, 2009).

Los plásticos de policarbonato y resinas epoxi son sintetizados con BPA (fig. 2).



**Figura 2.** Síntesis de plásticos (a) de policarbonato tomado de Areizaga 2002 (b) resinas epoxi.

En general, los plásticos de policarbonato, son materiales utilizados en el envasado de alimentos por las ventajas que presentan: son químicamente inertes, de peso ligero, resistentes contra el impacto, con amplia gama de diseños en forma y tamaño (García Díaz y Macías Matos, 2008). Las resinas epoxi son utilizadas como recubrimiento en tapas metálicas (Sungur *et al.*, 2014). Sin embargo, estos productos pueden contener trazas de monómero residual o BPA adicional (García Díaz y Macías Matos, 2008). Diversos estudios sugieren que la migración al alimento puede ser influenciada por diversos factores: durante el proceso de fabricación, tiempo de almacenamiento, deterioro mecánico del envase, tiempos de esterilización (Kang *et al.*, 2003; Munguía-López *et al.*, 2005; Thompsom y Grounds, 2005; Lim *et al.*, 2009).

Actualmente, los envases de plásticos se identifican por una etiqueta de reciclaje en cuya interior figura un número del 1-7. En la siguiente tabla se indican los tipos de plástico y cuál de ellos contiene BPA.

**Tabla 3.**Plásticos utilizados en el envasado de alimentos (González *et al.*, 2011)

Tipo	Composición	Posible contenido de BPA
1	PET (Polietilentereftalato)	X
2	PEAD ( Polietileno de alta densidad)	X
3	PVC (Policloruro de vinilo)	.
4	PEBD ( Polietileno de baja densidad)	X
5	PP (Polipropileno)	X
6	PS ( Poliestireno)	X
7	Otros (Policarbonato y resinas epoxi )	.

X.- No contiene BPA

. - Sí contiene BPA

Aunque estudios como los realizados por Sax, 2010 y Bach *et al.*, 2012, han detectado BPA en envases de PET esto se relaciona a que el reciclaje de este polímero se mezcla con plásticos que tienen BPA o a una contaminación del agua.



### 2.3.2. BPA en el mundo

La Ingesta Diaria Tolerable (IDT) de Bisfenol A es de 5 µg/kg de peso corporal al día (EFSA, 2010). La concentración de BPA en los alimentos y bebidas puede variar; sin embargo, se ha establecido un límite de migración de 0.6 mg/kg (Lok *et al.*, 2009). En la *tabla 4* se puede observar algunos estudios relacionados con las concentraciones detectadas de BPA en diversas matrices de alimentos.

**Tabla 4.** Concentraciones BPA detectadas en diferentes matrices alimentos. (Shaw, 2009)

Alimento	Numero de Muestras	Mínimo (ng/g o ng/mL)	Máximo (ng/g o ng/mL)	País
<b>Vegetales y leguminosas</b>				
Thompson y Grounds(2005)	27	<10	24	Nueva Zelanda, Australia, Italia, Tailandia, España, Austria
Goodson <i>et al.</i> , (2002)	15	9	48	Inglaterra, Holanda, Bélgica, Italia, Canadá
Mungia-Lopez <i>et al.</i> , (2002)	8	>0.20	5.59	México
<b>Frutas</b>				
Thompson y Grounds (2005)	16	>10	>10	Nueva Zelanda, Australia, China, Filipinas
Goodson <i>et al.</i> , (2002)	3	19	38	Grecia, Italia
Braunrath <i>et al.</i> , (2005)	4	5	24	Indonesia, Tailandia, Sudáfrica
<b>Pescado</b>				
Thompson y Grounds(2005)	8	>20	109	Canadá, EUA, Tailandia
Goodson <i>et al.</i> (2002)	20	ND	44	Portugal, EUA, Canadá, Dinamarca
<b>Bebidas</b>				
Thompson y Grounds(2005)	5	>10	>10	Nueva Zelanda
Goodson <i>et al.</i> , (2002)	16	ND	>7	Reino Unido
Kang y Kondo (2002)	3	14.1	84	Japón

<b>Otros líquidos</b>				
Thompson y Grounds(2005)	3	>20	192	Tailandia, Sri Lanka
Inoue <i>et al.</i> , (2003)	107	Nd	33.3	España, China, México, EUA, Argentina, Italia
Yoshida <i>et al.</i> , (2001)	14	>5	>5	Japón, EUA, Indonesia
<b>Leche, formula infantil</b>				
Goodson <i>et al.</i> , (2002)	6	ND	ND	Reino Unido, Francia
Kuo y Ding (2004)	5	44	113	Taiwan

La Autoridad Europea para la Seguridad de los Alimentos (EFSA, por su siglas en inglés), ha examinado más de 800 estudios y ha confirmado su posición mencionando: *“El policarbonato y las resinas epoxi en contacto con los alimentos a base de BPA son seguros ya que la exposición al BPA está muy por debajo de la ingesta IDT (Ingesta Diaria Tolerable), 5 µg/kg de peso corporal al día y con un factor de seguridad de 100 no hay ningún problema, basado en un estudio de 3 generaciones en rata (NOAEL= 5 mg/kg. día)”* (EFSA,2010).

Además, importantes organizaciones internacionales han respaldado la postura de la EFSA sobre la seguridad del BPA, afirmando que los seres humanos están expuestos a niveles mucho más bajos de BPA, alrededor de 0.04-0.08 µg/kg/día. Entre las cuales se encuentran:

- Japanese National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Julio, 2011)
- Swiss Federal Office of Public Health (Junio 2011, Febrero 2009)
- Food Standards Australia New Zealand (Julio 2011, Noviembre 2010)
- German Society of Toxicology, Advisory Committee (Abril 2011)
- German Federal Institute for Risk Assessment (Julio 2010)
- U.S. Food and Drug Administration (Enero 2010)
- WHO and FAO (Noviembre 2010)
- Health Canada (Marzo 2010, Octubre 2008)
- European Union (Junio 2008)

Sin embargo, hay países que desaprueban el BPA en su totalidad, tales como Francia, España, Austria, Suecia, Dinamarca y Bélgica pues han prohibido su uso para la producción en biberones y en envases para alimentos.

En el 2012, Francia adoptó una legislación donde suspende la fabricación, importación, exportación y venta de cualquier material que contenga BPA en la industria de alimentos afirmando: *“La evidencia científica disponible muestra que el BPA, incluso en dosis muy pequeñas, actúa como disruptor endócrino y puede afectar a la reproducción”*. Agencia Francesa de Seguridad Sanitaria, de Alimentación, Medioambiente y Trabajo (ANSES, 2011).

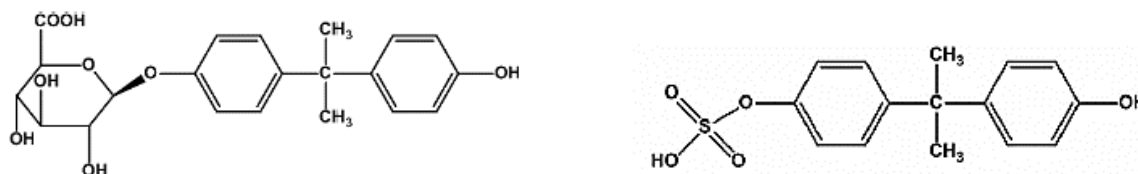
### **2.3.3. Bio-transformación y efectos tóxicos de BPA**

La principal ruta de absorción del BPA es la vía oral, aunque también se ha demostrado la presencia de BPA absorbido por las vías respiratoria y dérmica (Kang *et al.*, 2006).

El ser humano tiene la capacidad de biotransformarlo eficientemente en sus derivados toxicológicamente inactivos por lo que es muy difícil su acumulación después de la ingestión (Pritchett *et al.*, 2002); así, derivados del BPA llegan a la circulación sanguínea (Matthews, 2001).

Tras la ingesta, el BPA es absorbido y biotransformado a través de dos vías (Fig. 3), una de ellas, en mayor proporción, es la forma hidrosoluble, BPA-glucoronido (BPAG) (Lim *et al.*, 2009). El principal sitio de conjugación de ésta se da en el hígado por la enzima uridina difosfato glucosiltransferasa (UGT). La segunda vía de biotransformación ocurre en menor proporción, mediante el BPA-sulfato (Vandenberg *et al.*, 2007). Esta ruta es llevada a cabo por sulfotransferasas en el hígado, donde la sulfatación reduce drásticamente la absorción de BPA y su actividad al receptor de estrógeno (Snyder *et al.*, 2000). Sin embargo esta

sulfatación del BPA es reversible por lo que no garantiza la inactivación del BPA por esta vía (Stowell *et al.*, 2006).



**Figura 3.** Formas de conjugación de del BPA: Glucoronada (Izq), Sulfatada (Der).

La eliminación de estos productos de biotransformación difiere en los distintos seres vivos (Kang *et al.*, 2006). En el ser humano la excreción de BPA hidrosoluble se da vía heces y orina con un tiempo de eliminación menor a 6 h (Lang *et al.*, 2008). Sin embargo, estudios realizados en seres humanos han demostrado que el BPA libre estaría presente en la sangre humana, uniéndose a la albúmina y ejerciendo un efecto estrogénico (Shaw, 2009).

Como se mencionó anteriormente, la toxicidad del BPA se ha relacionado con diversos efectos negativos al ser humano (Rochester, 2013). En la *tabla 5*, se muestran algunos de estos efectos.

**Tabla 5.** Efectos tóxicos por exposición a BPA. (Adaptada de González *et al.*, 2009)

Efectos Tóxico	Referencia
<b>Cambios en el comportamiento</b>	Von Saal <i>et al.</i> , 2007
<b>Diabetes y obesidad</b>	Lang <i>et al.</i> , 2008 , Von Saal <i>et al.</i> , 2007
<b>Pubertad temprana</b>	Shelby <i>et al.</i> , 2010
<b>Espermatogénesis</b>	Von Saal <i>et al.</i> , 2007 , Shelby <i>et al.</i> , 2010, Rochester, 2013
<b>Enfermedades de próstata</b>	Von Saal <i>et al.</i> , 2007 , Shelby <i>et al.</i> , 2010, Rochester, 2013
<b>Embarazos prematuros</b>	Rochester, 2013, Shelby <i>et al.</i> , 2010
<b>Cáncer de Mama</b>	Rochester, 2013, Keri <i>et al.</i> , 2007

<b>Alteraciones Cromosómicas</b>	Von Saal <i>et al.</i> , 2007
<b>Daño cerebral</b>	MacLusky <i>et al.</i> , 2005
<b>Disminución de los niveles de antioxidantes</b>	Yi <i>et al.</i> , 2011

#### **2.3.4. Metodologías para la detección de BPA en alimentos**

Al ser los alimentos la primera ruta de exposición de BPA en el ser humano, su detección es de gran importancia. Las concentraciones en las que se detecta el BPA en alimentos normalmente se dan en el rango de microgramo ( $\mu\text{g}$ ) e inclusive nanogramo (ng), lo que dificulta su detección y cuantificación. Sin mencionar que el pre-tratamiento de la muestra resulta laboriosa (Ballesteros-Gómez *et al.*, 2009).

Las técnicas analíticas más representativas para su detección y cuantificación son los métodos de cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (GC-MS), cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) acoplados a detectores ultravioleta (UV), fluorescencia o de masas y recientemente algunos métodos inmunoquímicos (Ballesteros-Gómez *et al.*, 2009; Cela-Pérez, 2015).

Estas técnicas analíticas requieren un pre-tratamiento, extracción, limpieza, concentración y derivatización de la muestra (Ballesteros-Gómez *et al.*, 2009). La extracción con disolventes orgánicos y de fase sólida son las técnicas más utilizadas para el aislamiento de BPA a partir de muestras sólidas y líquidas, respectivamente, pues son simples y aplicables con relativa facilidad (Xu *et al.*, 2011).

La selección de la técnica de extracción depende del tipo de alimento analizado. Por ejemplo, la extracción líquido-líquido (LLE), por disolventes (SE) o de fase sólida (SPE) requieren un volumen de 10 a 50 mL de muestra y 0.5-30 g en muestras sólidas. Sin embargo, estas extracciones consumen mucho tiempo para lograr la sensibilidad y selectividad deseada (Ballesteros-Gómez *et al.*, 2009; Uzurriaga *et al.*, 2016).

Existen otras extracciones tales como la asistida por microondas (MAE), extracción líquida a presión (PLE) y la micro extracción de fase sólida (SPME) que se han utilizado para mejorar la extracción de BPA en factores como el tamaño de la

muestra, la automatización y el consumo de disolvente (Ballesteros-Gómez *et al.*, 2009). Sin embargo, se prefieren seguir utilizando las extracciones líquido-líquido, por solvente y de fase sólida debido a sus resultados bibliográficos y a su simplicidad con respecto a las técnicas modernas (Uzurriaga *et al.*, 2016). En la *tabla 6*, se muestran las metodologías empleadas para la determinación de BPA en alimentos en diferentes presentaciones: frescos, enlatados, sólidos o líquidos.

**Tabla 6.** Metodologías para detección de BPA en matrices alimentarias (Ballesteros-Gómez *et al.*, 2009)

<p><b>Muestras de Alimentos</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Solidas (Fórmulas infantiles, pasta, carne, vegetales, frutas, pescado)</li> <li>• Líquidas (Bebidas, agua, leche, sopas, simulantes de comida)</li> </ul>
<p><b>Pre-tratamiento de Muestra</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Solidas (Homogenización, Secar en frío)</li> <li>• Líquidas (Filtración, Centrifugación, Precipitación de Proteína)</li> </ul>
<p><b>Extracción</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Solidas Extracción por solventes (SE), Extracción por microondas (MAE), Extracción por presión líquida (PLE)</li> <li>• Líquidas Extracción líquido-líquido (LLE), Extracción por fase sólida (SPE), Microextracción por fase sólida (SPME)</li> </ul>
<p><b>Limpieza</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Extracción por fase sólida, Extracción líquido-líquido, Filtración lipídica por congelación.</li> </ul>
<p><b>Análisis Instrumental</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Métodos Inmunoquímicos</li> <li>• Cromatografía de Gases-Masas</li> <li>• Cromatografía de Líquidos-Masas</li> </ul>

Dentro de los procesos de extracción en fase sólida se encuentran los polímeros de impresión molecular (MIP's) que han recibido una mayor atención desde la década pasada (Ballesteros-Gómez *et al.*, 2009). Se propone a los MIP's como una

alternativa atractiva para la etapa de extracción porque son materiales sintetizados con una selectividad para una molécula en particular.

En medios complejos; además, los MIP's pueden re-usarse para extracciones secuenciales, lo que es una ventaja respecto a otras metodologías convencionales (Jiang *et al.*, 2008).

En la actualidad, se aplican los MIPS's para la detección de BPA en agua de río (Xie *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2008) y en algunos alimentos (Wang *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2014). Así como para la detección de otros contaminantes en el área de alimentos (Baggiani *et al.*, 2007; Ballesteros-Gómez *et al.*, 2009).

#### **2.4. Polímeros de Impresión Molecular (MIP's)**

Los MIP's se basan en el reconocimiento molecular, que es el fenómeno mediante el cual una especie química es reconocida e identificada selectivamente por un receptor adecuado (González, 2007).

Consecuentemente, la tecnología de impresión molecular se basa en utilizar una molécula como molde para crear un sitio de reconocimiento interaccionado con monómeros funcionales. Estos monómeros se entrecruzan alrededor de la molécula molde con ayuda de un agente que maximiza las interacciones entre la molécula molde seleccionada y la matriz (Thommes, 2007), formando un MIP.

La aplicación de los MIP's es muy variada y atractiva por lo que ha evolucionado con los años a través de la publicación de diversos estudios (Elsevier, 2015). Entre los usos más frecuentes se reportan sensores (Laskova *et al.*, 2009; Ragavan *et al.*, 2013), dispositivos de fase estacionaria en cromatografía (He *et al.*, 2007), anticuerpos artificiales (Lavignac *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2015), adsorbentes para fase sólida (Jiang *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2011; Uzurriaga-Sanchez *et al.*, 2016), entre otros.

En la industria de los alimentos, la detección de contaminantes es de alta importancia por lo que frecuentemente se realizan ensayos prácticos y efectivos que permitan confirmar la ausencia de contaminantes y/o agentes microbianos e indicar la seguridad en el consumo del alimento (Lok *et al.*, 2009; Ragavan *et al.*, 2013). La *tabla 7* muestra ejemplos de algunos MIP's que se han utilizado en el área de alimentos.



Tabla 7. MIP's dirigidos para el área de alimentos.

<b>Molécula Objetivo</b>	<b>Matriz</b>	<b>Molécula molde</b>	<b>Monómero/EC/ Disolvente</b>	<b>Sistema Analítico</b>	<b>Referencia</b>
<b>Atrazina</b>	Cebolla, arroz	Atrazina	MAA/EGDMA/ MeCN	GC,GC- MS	Djozan y Ebrahimi, 2008
<b>β-agonista</b>	Leche, pescado bovino	Clembute -rol	MAA/EGDMA/ MeCN	HPLC LC-MS	Brambilla <i>et al.</i> , 2001 Kootstra <i>et al.</i> , 2005.
<b>BPA</b>	Comida enlatada	BPA-d16, p- terbutilfeo I	MAA o 4- VP/EGDMA /MeCN o Tolueno	HPLC	Martin- Esteban y Tadeo, 2006
<b>Cafeína</b>	Bebidas bajas	Cafeína	MAA /EGDMA/MeCN	HPLC	Farrington <i>et al.</i> , 2006
<b>Cloramfeni- col</b>	Leche y camarón	Cloramfe ni-col	MAA o 4- VP/EGDMA/ Tolueno	HPLC	Shi <i>et al.</i> ,2007
<b>Fenuron</b>	Papa, zanahoria	Fenuron	MAA/EGDMA/ MeCN	HPLC	Tamayo <i>et al.</i> , 2003
<b>Malaquita verde</b>	Pescado	Malaquita verde	MAA/EGDMA/ MeCN	HPLC	Yan <i>et al.</i> , 2007; Li <i>et al.</i> , 2008
<b>Sudan I</b>	Polvo de chile rojo	Sudan I	MAA o 4 VP/EGDMA/Clo roformo	HPLC	Pucci <i>et al.</i> , 2005
<b>Sulfametazi- na</b>	Leche	Sulfameta zi-na	MAA o 4 VP /EGDMA/MeCN	Voltáme -tro	De prada <i>et al.</i> , 2005
<b>Triazina</b>	Maíz, papa	Propazina	Propazina metacrilato /EGDMA/ Tolueno	HPLC	Cacho <i>et al.</i> ,2006

### **2.4.1. Síntesis de un MIP**

Entre las principales variables para la síntesis de un polímero de impresión molecular se encuentran (Vicente, 2009):

#### 2.4.1.1. Molécula Molde o Plantilla

La selección de la molécula molde es crucial en la síntesis de polímeros de impresión molecular, ya que a partir de ésta se podrán elegir el resto de los reactivos (Pichon, 2007; González *et al.*, 2007). Generalmente es mucho más fácil estampar moléculas con bajo peso molecular pues la extracción de moléculas de mayor tamaño resulta más complicado debido a impedimentos estéricos (Vicente, 2009).

#### 2.4.1.2. Monómeros Funcionales

Los monómeros funcionales son los responsables de actuar con la molécula molde formando un pre-polímero. Normalmente, en la síntesis de polímeros de impresión molecular se usa un solo monómero. El cual interacciona con la molécula molde para generar una pre-organización alrededor de ella y así aumentar la afinidad por cavidades selectivas (González *et al.*, 2007; Lasáková, 2009).

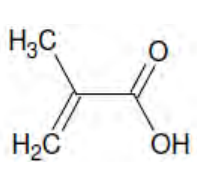
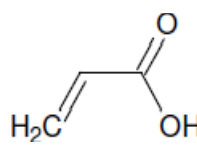
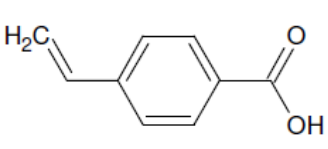
Con el fin de que se garantice la formación del complejo, se debe de trabajar con una mayor cantidad de monómero con respecto a la molécula molde (Vicente, 2009). La concentración empleada influye en la selectividad del polímero ya que si se utiliza poco monómero disminuirán los sitios de unión en el polímero debido a un menor complejo molécula molde-plantilla (Chen *et al.*, 2011). Mientras que un exceso de monómero residual conduce a la formación de sitios de enlace no específicos (Vicente, 2009; Lasáková, 2009).

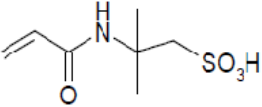
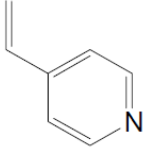
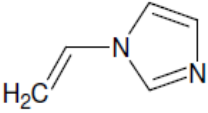
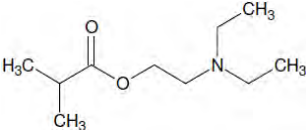
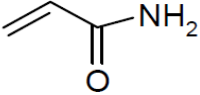
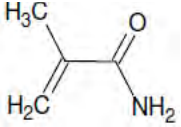
En los polímeros por enlaces covalentes, es necesario emplear monómeros que sean capaces de formar un enlace covalente reversible con la molécula molde el cual pueda romperse durante la elución de éste (Vicente, 2009).

En los polímeros no-covalentes, el número de monómeros que se usan forman enlaces por puentes de hidrógeno, formación de enlaces dipolo-dipolo y de pares iónicos generando diferentes naturalezas (ácida, básica o neutra). Por ejemplo: si se utiliza una molécula molde ácida es recomendable emplear monómeros básicos (Vicente, 2009).

Cabe señalar que cuando se utiliza más de un monómero es necesario conocer las reactividades relativas de los monómeros, así como el agente entrecruzante que se usará para que pueda formar el complejo eficientemente. En la *tabla 8*, se observan los principales monómeros funcionales con base en su naturaleza:

**Tabla 8.** Monómeros más usados en la síntesis de MIP's. (Fuente de López Luna, 2006)

Monómero	Fórmula	Tipo de interacción
<b>Ácidos</b>		
<b>Ácido metacrílico</b>		Cargas iónicas, Enlaces de hidrógeno
<b>Ácido Acrílico</b>		Cargas iónicas, Enlaces de hidrógeno
<b>Ácido p-vinilbenzoico</b>		Cargas iónicas, Enlaces de hidrógeno

Monómero	Fórmula	Tipo de interacción
Ácidos Acrilamid sulfónicos		Cargas iónicas
4-Vinilpiridina	<b>Básicos</b> 	Transferencias de carga, Cargas iónicas, Enlaces de hidrógeno
1-vinilimidazol		Coordinación metálica, Cargas iónicas, Enlaces de hidrógeno
Dietilaminoetilmetacrilato		Cargas iónicas
Acrilamida	<b>Neutros</b> 	Enlaces de hidrógeno
Metacrilamida		Enlaces de hidrógeno

#### 2.4.1.3. Agente Entrecruzante

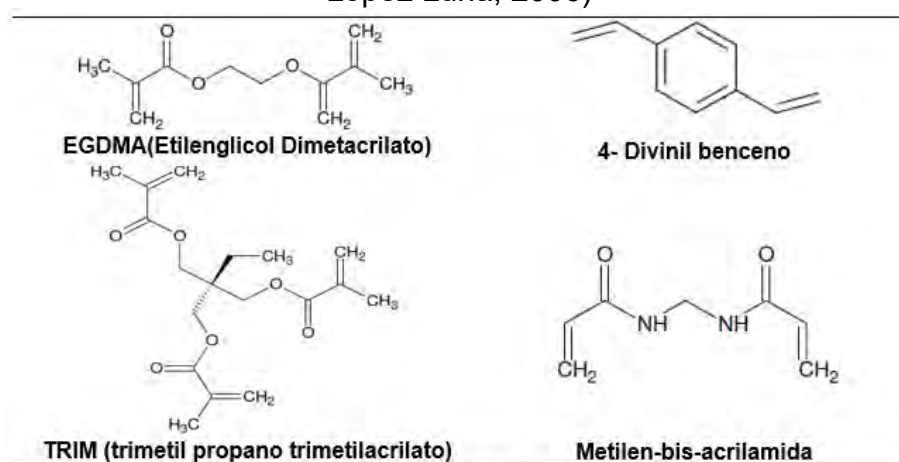
El agente entrecruzante interacciona con el complejo de pre-polimerización ayudando a la morfología de la matriz polimérica, estabilizando los sitios de unión

para conferirle resistencia mecánica y térmica al polímero, así como porosidad (González *et al.*, 2007).

Comúnmente se emplean relaciones de entrecruzante altas para generar un grado de entrecruzamiento adecuado y con ello favorecer la creación de sitios de enlace o cavidades de tamaño y forma deseados para enlazar o permitir el paso de la molécula molde (Lasáková *et al.*, 2009).

Si el polímero tiene un grado de entrecruzamiento bajo, la longitud efectiva entre puntos de entrecruzamiento puede ser demasiado grande causando cavidades grandes provocando un estampado poco exitoso que no será selectivo. Sin embargo, si la longitud efectiva entre puntos es muy pequeña provocará una cavidad reducida que termine en un MIP inservible (López Luna, 2006). Los agentes entrecruzantes más usados se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 9.** Entrecruzantes más usados en la síntesis de MIP's. (Modificado de López Luna, 2006)



#### 2.4.1.4. Disolvente o Porógeno

El disolvente también se denomina porógeno pues además de ser el medio de reacción, influye en la morfología final del MIP, esto es, en su tamaño, distribución de poros y área superficial (Spivak, 2005; López Luna, 2006).

Una baja porosidad o poca área superficial influye en el reconocimiento de la plantilla por un difícil acceso de la molécula molde hacia los sitios activos.

Consecuentemente, se evita el reconocimiento de la molécula molde a detectar (González *et al.*, 2007).

Frecuentemente, se utilizan disolventes apróticos o de baja constante dieléctrica, por ejemplo, acetonitrilo, tolueno o cloroformo, ya que estabilizan y favorecen las interacciones entre molécula molde y la formación de enlaces por puentes de hidrógeno o fuerzas electrostáticas (Spivak, 2005; González *et al.*, 2007). En contraste, si el disolvente es prótico o de alta constante dieléctrica (ejemplo: metanol o agua), normalmente las uniones son desestabilizadas. Lo anterior se debe a que los monómeros funcionales competirán con el disolvente por los puntos de interacción de la molécula molde (Lasáková, 2009). Sin embargo, es más adecuado favorecer interacciones del tipo hidrofóbicas.

#### 2.4.1.5. Iniciador de Radicales Libres

El iniciador es el agente responsable de inducir radicales libres al sistema para favorecer la polimerización. La selección del iniciador dependerá de la molécula molde y/o el tipo de polimerización, térmica o UV (Tabla 10).

Cuando la molécula molde es térmicamente inestable (enzimas o anticuerpos) se puede generar radicales libres a temperaturas bajas (< 4 °C) mediante cámaras de UV o por medio de un foto-iniciador, como la dimetoxifenil acetofenona (Vicente, 2009).

Si la polimerización se realiza térmicamente se debe considerar el valor de la temperatura necesaria de descomposición del iniciador para que comience el proceso de polimerización (González *et al.*, 2007).

Usualmente, los iniciadores tipo “azo” son los más utilizados para la síntesis de MIP's como el azo-bis-dimetilvaleronitrilo (ABDV) o el 2,2 azobisisobutironitrilo (AIBN) (González *et al.*, 2007; Lasáková *et al.*, 2009).

**Tabla 10.** Iniciadores de radicales libres más usados en la síntesis de MIP's.  
(Extraído de Sellergren, 2000)

Tipo	Iniciador	Temperatura de descomposición
<b>Peróxido</b>	Etilo	110-113°C
	Benzoilo	40-70°C
	Ter-butilo	100-120°C
<b>Persulfat</b>	S2 o8	90°C
<b>Azo</b>	V-70	30°C
	ABDV	50°C
	AIBN	60°C
<b>Radiación Iónica</b>	Rayos-y	15°C

## 2.5. Tipos de polimerización

La metodología para la síntesis de MIP's puede seguir distintas configuraciones: bloque, esferas, emulsiones, entre otras. La selección de la metodología dependerá de la aplicación del material sintetizado considerando las ventajas y desventajas relacionadas con la morfología del polímero. La polimerización por precipitación y bloques son las más recomendadas experimentalmente. (Lasáková 2009).

### 2.5.1. Polimerización por bloque

La polimerización por bloque o monolítica es la técnica general más popular para la síntesis de un MIP (González *et al.*, 2007). Esta técnica se basa en la mezcla de reactivos (molécula molde, disolvente, monómero/os, agente entrecruzante y agente de radicales libres) que se somete a una polimerización (térmica o fotoquímica) con el fin de obtener un bloque monolítico insoluble (González *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2011).

El bloque monolítico se tritura y tamiza hasta obtener partículas amorfas del tamaño deseado. Se lava superficialmente y posteriormente se extrae la molécula molde liberando las cavidades responsables del reconocimiento molecular.

La gran desventaja de esta técnica de polimerización radica en el proceso de tamizado y triturado que afecta en:

- Rendimiento.- Al triturar se suele perder rendimiento en la síntesis de polimerización.
- Tamaño de partícula no deseado. - Al triturar el bloque se obtienen diferentes tamaños de partículas.
- Sitios de enlace no específico. - Al triturar el bloque se dañan los sitios de unión debido a la fricción provocando sitios de enlace no específicos.

Los polímeros sintetizados a partir de esta metodología no se emplean en fases estacionarias debido a que genera heterogeneidad por el tamaño de partícula y a la distribución de los sitios de unión, ambas características originan picos cromatográficos anchos y baja reproducibilidad (Cela-Pérez, 2015).

### **2.5.2. Polimerización por precipitación**

En la polimerización por precipitación, se obtiene un material en forma de microesfera de tamaño  $<1 \mu\text{m}$ . Esta síntesis se lleva a cabo en presencia de un exceso de disolvente y en bajas concentraciones de reactivos (González *et al.*, 2007). Por lo anterior, las cadenas poliméricas durante la polimerización no logran ocupar todo el volumen del disolvente, produciendo la dispersión de las microesferas (Pichon, 2007).

Los rendimientos en la síntesis de polimerización por precipitación son altos ya que no se aplica un proceso de triturado o tamizado, por lo tanto los sitios de unión de las microesferas se mantienen homogéneos (Chen *et al.*, 2011).

En los experimentos de re-unión o anclaje, esta técnica ofrece mejor reconocimiento de la molécula molde. Si los lavados se realizan correctamente, los sitios de unión serán más accesibles y la cinética de enlace y transferencia de masa será más rápida (Vicente, 2009).

La polimerización por precipitación también tiene sus desventajas, tales como:



- El exceso de disolvente.- Un volumen considerable de disolvente residual se obtendrá al final de la técnica por no poder reaccionar completamente con los monómeros.
- Centrifugación.-Si bien se evita procesos como el tamizado o triturado, la centrifugación es indispensable para dispersar las microesferas.
- Lavado del polímero.- Debido a su configuración, suele ser más complicado acceder al centro de la microesfera complicando los lavados para la extracción de molécula molde y pérdida de material.

El uso de microesferas se emplea como fase estacionaria en experimentos de separación y sensores en el área analítica (Lasáková, 2009).

### **2.6. Polímero no impreso (NIP)**

El NIP es un material entrecruzado con macro poros que contiene cavidades de diferente tamaño. Éstos tienen las mismas propiedades químicas que el MIP y se sintetizan bajo el mismo procedimiento pero sin el uso de la molécula molde. (Pichon *et al.*, 2008).

Los NIP tienen una fuerte unión no específica que se atribuye a las interacciones hidrofóbicas entre compuestos orgánicos y polímeros. Frecuentemente se usan las partículas del NIP como control para comparar la selectividad del MIP o para detectar todas las posibles moléculas de un medio, por ejemplo aguas residuales (Murray *et al.*, 2012; Murray *et al.*, 2016).

### **2.7. MIP's de BPA en matrices alimento**

Los estudios de MIP's para la detección de BPA se enfocan en la detección de este contaminante en matriz agua o en medios ideales principalmente (Liu *et al.*, 2011; Murray *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015). Sin embargo, los MIP's se han adaptado e inclusive fusionado a otras metodologías para optimizarlos y poder detectar BPA en matrices alimentarias (Alenazi *et al.*, 2015; Baggiani *et al.*, 2009; Tan *et al.*, 2009).

La *tabla 11* muestra algunos estudios relevantes en el empleo de MIP's en la detección de BPA en una matriz alimentaria.

**Tabla 11:** MIP's de BPA en matriz alimento

<b>Tipo de MIP</b>	<b>Matriz Alimento</b>	<b>Principal aportación</b>	<b>Referencia</b>
<b>Polímero impreso molecularmente tratado (<i>treat</i>) (TMIP)</b>	Agua y Leche enriquecida con BPA	Extracción selectiva en muestras de agua y leche en presencia de ión híbrido (cargada negativamente y positivamente). Supera en selectividad a un MIP comercial.	Alenazi <i>et al.</i> , 2015
<b>Membarnas nanofibrosas molecularmente impresas (nano-MIMs)</b>	Vegetales y Jugos	Preparado mediante la encapsulación de dos tipos de nanopartículas de MIP's en nanofibras de alcohol de polivinilo electrospun para la detección simultánea de BPA y tebuconazol (recuperaciones > 70%).	Wu <i>et al.</i> , 2014
<b>Polímero impreso molecularmente en una superficie (DSMIP)</b>	Bebidas enlatadas y Fruta	Síntesis por primera vez de una técnica de impresión molecular en una superficie de vinil-SiO <sub>2</sub> que tiene una recuperación de 98-105% en bebidas y fruta.	Li <i>et al.</i> , 2014
<b>MIP de hidroquinona</b>	Leche	Para la determinación en leche. El método validado detectó BPA en 1 de 27 muestras.	O'Mahony <i>et al.</i> , 2013
<b>MIP</b>	Leche líquida, Agua	MIP sintetizado por polimerización por metátesis con apertura de anillo que exhibe alta eficiencia, rápida polimerización y buenas propiedades de unión en menores tiempos comparado	Wang <i>et al.</i> , 2011

Tipo de MIP	Matriz Alimento	Principal aportación	Referencia
<b>MIP</b>	Agua embotellada y Leche	con una polimerización en bloque. Aplicación de un MIP vía covalente y no covalente adaptado a un cartucho de fase sólida para la detección de agua y leche	Alexiadou <i>et al.</i> , 2008
<b>Composito de un polímero criogel impreso molecularmente (MISPE)</b>	Vino	Método para la extracción en fase sólida de impresión molecular que tiene recuperaciones cuantitativas de 90-98% en muestras de vino tinto.	Baggiani <i>et al.</i> , 2009
<b>Fibras MIP</b>	Leche líquida y Agua	Las fibras de sílice son homogéneas y porosas mostrando una buena estabilidad química y mecánica. Se utilizaron exitosamente para la extracción e BPA	Tan <i>et al.</i> ., 2009
<b>MIP preparado por precipitación</b>	Leche, orina de cerdo y Carne de pollo	MIP basado en una columna analítica con recuperaciones entre 0.05-0.2 $\mu\text{mol/L}$ ). La leche, orina de cerdo y carne de pollo observaron recuperaciones >70.2 %.	Jiang <i>et al.</i> , 2009
<b>Polímero de impresión molecular (MIP) fijado en una barra de agitación</b>	Agua embotellada	Acoplamiento de una barra de agitación. El MIP-SBSE ( <i>stir bar sorptive extraction</i> ) tuvo alto rendimiento en la detección por HPLC.	Liu <i>et al.</i> , 2014
<b>MISPE-CE (electroforesis capilar)</b>	Bebidas	Uso del MIP como recubrimiento en la separación capilar adaptando el MISPE. Se utilizó para el análisis de cuatro	Zhan <i>et al</i> 2015

Tipo de MIP	Matriz Alimento	Principal aportación	Referencia
<p><b>Polímero impreso molecularmente recubierto de nanopartículas <math>\text{Fe}_3\text{O}_4</math> (<math>\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@MIP}</math>)</b></p>	<p>Naranja enlatada y Leche</p>	<p>muestras adicionadas conBPA, con recuperaciones de 87-108%. Ventajas para la extracción en tiempo real, facilidad de atomización, y bajo consumo de la muestra.</p> <p>Extracción rápida con un límite de detección de 0.1 y 0.3 ng/ml en muestras de naranja y leche en lata, respectivamente. Uso por primera vez de nanopartículas de polímeros de impresión molécula para el tratamiento previo de los alimentos envasados .</p>	<p>Xu <i>et al.</i>, 2011</p>

### **3. Hipótesis y Objetivos**

### **3.1. Hipótesis**

¿El polímero de impresión molecular (MIP por sus siglas en inglés) se puede emplear para la detección de bisfenol A (BPA) en alimentos líquidos enlatados?

### **3.2. Objetivos**

#### **3.2.1. Objetivo General**

Estudiar el comportamiento de selectividad para un polímero de impresión molecular (MIP) para detectar BPA en una bebida enlatada.

#### **3.2.2. Objetivos Particulares**

- Sintetizar un MIP mediante la metodología por bloques y precipitación para seleccionar con base a su rendimiento el más adecuado para caracterizar.
- Caracterizar morfológicamente el MIP seleccionado.
- Comparar el comportamiento del MIP seleccionado con respecto a su respectivo NIP en un sistema modelo para confirmar su eficiencia de extracción y corroborar su selectividad hacia BPA del MIP por competencia molecular.
- Incubar por más de un ciclo el MIP en un sistema modelo para verificar la re-usabilidad del MIP.
- Aplicar el MIP en un matriz alimento para corroborar que se puede usar el MIP como técnica alternativa para la detección de BPA.

## 4. Materiales e Instrumentación



#### 4.1. Materiales

Los reactivos empleados para la síntesis del MIP fueron BPA, como molécula molde. El BPA-DMC, BPF y HEX fueron empleados para evaluar la competencia molecular del polímero. Para la síntesis del MIP se empleó EGDMA como agente entrecruzante; y 4-Vinil Piridina (4-Vyp) como monómero. El iniciador de radicales libres fue el AIBN. Los disolventes utilizados fueron metanol, ácido acético y acetonitrilo grado analítico. Cabe señalar que el acetonitrilo funciona como disolvente y porógeno durante la síntesis. Todos los reactivos fueron adquiridos de Sigma-Aldrich México.

La síntesis del MIP y NIP se realizó en un reactor de vidrio enchaquetado de 25 mL con tapa y septo (Figura 4).



**Figura 4.** Reactor para la síntesis de MIP y NIP.

#### 4.2. Instrumentación

Para la síntesis del MIP se emplearon los siguientes equipos:

- Parrilla IKA modelo RCT Basic con termostato modelo ETS-D4 fuzzy.
- Equipo re-circulante Brookfield Mod. EX-200.
- Centrífuga Hermle Z200A con un rotor de 7 cm de radio. .



**Figura 5:** Centrifugadora Hemle Z200A

Para la cuantificación del BPA se empleó un cromatógrafo de gases acoplado a espectroscopía de masas (GC-MS) Agilent Technologies Modelo 5973 Network disponible en el Edif. 5 del Instituto de Ingeniería-UNAM, a cargo del Dr. Elías Becerril.



**Figura 6:** CG-MS, Instituto de Ingeniería, UNAM

La caracterización microscópica del MIP y NIP se realizó en un microscopio electrónico de barrido HRSEM-AURIGA con una columna tipo GEMINI. Se trabajó con una aceleración de voltaje de 0.8–1.0 kV, un rango de resolución de 1.0  $\mu\text{m}$  y a una distancia de rango de magnificación de 1Kx–500x. Los análisis se realizaron en el LANE del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Zacatenco con el apoyo del Dr. Jorge Roque de la Puente.

El análisis de la estructura del MIP y NIP se realizó en un espectrómetro de infrarrojo de transformada de Fourier por reflectancia ATR con un intervalo de longitudes de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  FTIR/ FIR Spectrum 400 de Perkin-Elmer en el laboratorio de la Unidad de Servicios de Apoyo la Investigación y a la Industria (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM con ayuda la Q. Marisela Gutiérrez Franco. .



**Figura 7.** FTIR Spectrum RXI de Perkin-Elmer (Izq) y Microscopio electrónico de barrido (Der)

## 5. Metodología

Diagrama general

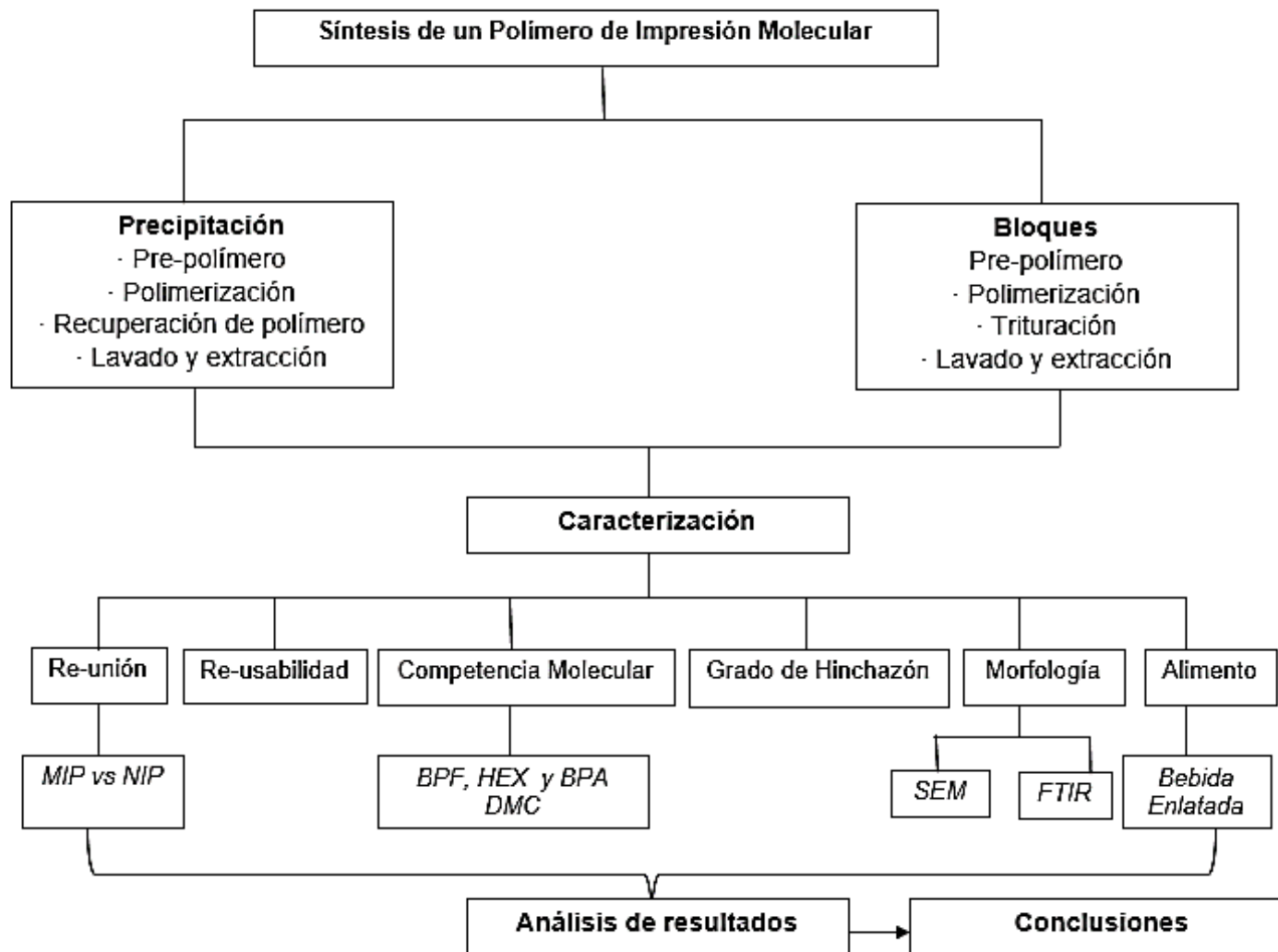


Diagrama 1. Diagrama general de la fase experimental del proyecto de investigación.

## 5.1. Síntesis de Polímero de Impresión Molecular

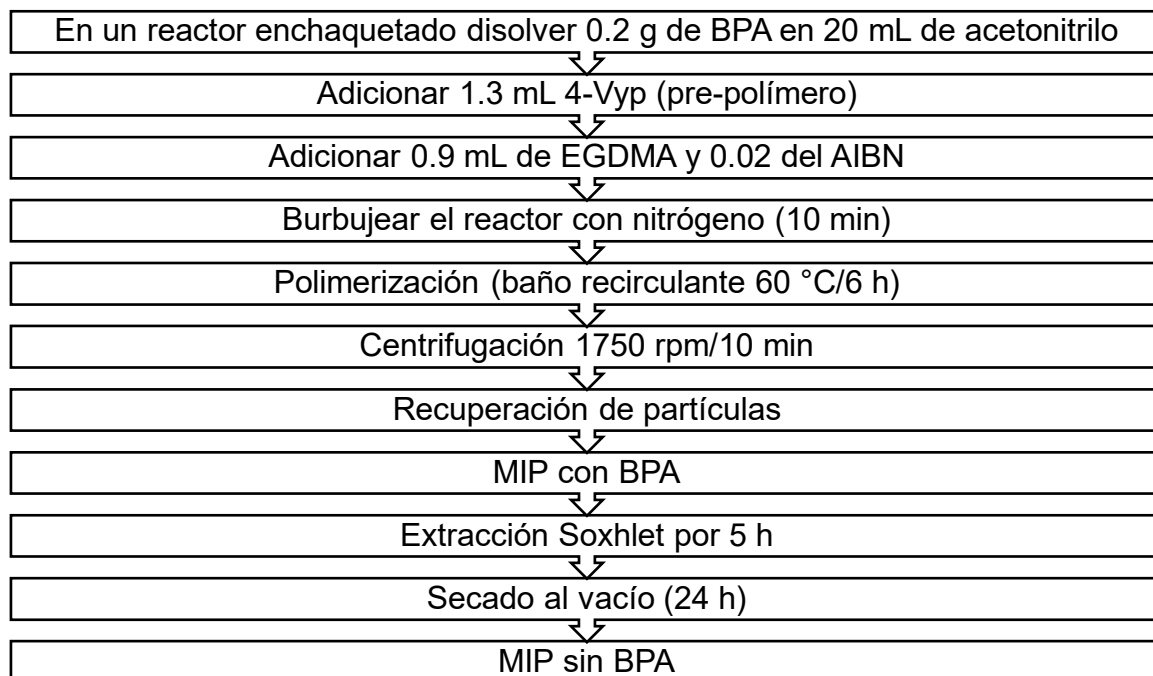
La polimerización por precipitación se basó en la metodología propuesta por Li K *et al.*, (1993) y de Zhang *et al.*, (2006); mientras que, la polimerización en bloques se basó en lo descrito por Navarro-Villoslada, *et al.*, (2003).

La metodología consiste en tres etapas para ambas técnicas de polimerización, principalmente, síntesis, extracción y caracterización del polímero. Así mismo, el proceso de síntesis del MIP por ambas técnicas resulta similar y se divide en tres sub-etapas.

### 5.1.1. Síntesis por precipitación

#### 5.1.1.1 Síntesis

En el siguiente diagrama se resume la síntesis de un MIP por precipitación:



**Diagrama 2.** Metodología de MIP por precipitación.

#### 1ª Etapa. Formación del pre-polímero

Se disolvieron 200 mg de la molécula molde (BPA) en 20 mL de acetonitrilo dentro de un reactor enchaquetado de 25 mL. Se adicionaron 1.3 mL de 4-Vyp, se agitó durante 5 min a 20 °C para homogeneizar, obteniendo una solución de color rojiza.

En esta etapa se inicia la interacción entre el monómero y la molécula molde, generando un pre-polímero.

### **2ª Etapa. Proceso de Polimerización**

Al pre-polímero se le adicionaron 0.9 mL de EGDMA (agente entrecruzante) y 0.02 g del AIBN (iniciador de radicales libres). La solución se mantuvo en agitación durante 5 minutos a 20 °C. Posteriormente, se removió el oxígeno del medio de reacción con N<sub>2</sub> durante 10 minutos para favorecer el proceso de polimerización. La reacción de polimerización se realizó a una temperatura de 60-65 °C durante 6 horas, cuando se observó la formación de un precipitado.

### **3ª Etapa. Recuperación de polímero**

La recuperación del precipitado se realizó mediante centrifugación a 1750 rpm durante 10 minutos y posteriormente se separó mediante un filtro Whatman 41 de 20-25 µm.

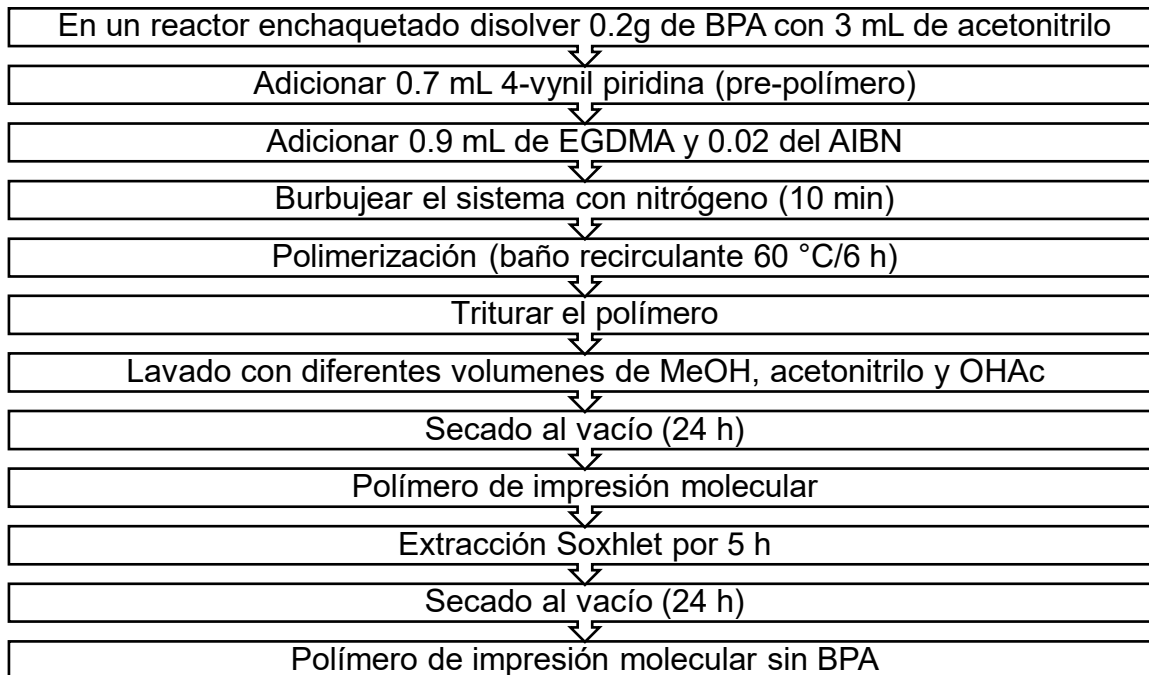
#### *5.1.1.2 Extracción de molécula molde*

La separación de la molécula molde del MIP sintetizado se realizó mediante una extracción tipo Soxhlet durante 5 horas con 250 mL de acetonitrilo como disolvente. Al finalizar la extracción, el MIP fue secado a vacío durante 24 horas a 20 °C.

### 5.1.2. Síntesis por bloques

#### 5.1.2.1 Síntesis

El diagrama 3 resume la metodología de un MIP por bloques.



**Diagrama 3.** Metodología de polimerización por bloques.

#### 1ª Etapa.- Formación del Pre-Polímero

Se disolvieron 230 mg de BPA en 3.5 mL de acetonitrilo en el reactor enchaquetado de 25 mL. Posteriormente, se adicionaron 0.7 mL de 4-Vyp, a agitación constante por 5 min a 20 °C para homogenizar. Durante esta etapa se inicia la interacción entre el monómero y la molécula molde formando un pre-polímero (molécula-monómero).

#### 2ª Etapa.- Proceso de Polimerización

Al complejo de pre-polimerización se adicionaron 0.9 mL de EGDMA y 0.02 g de AIBN. La reacción se agitó durante 5 minutos y después se estableció una atmósfera inerte (desplazamiento de oxígeno con N<sub>2</sub>) durante 10 minutos para favorecer el proceso de polimerización. Posteriormente, el reactor se conectó a un equipo de recirculación a una temperatura de 60-65 °C por 6 horas.





**Figura 8.-**Proceso de polimerización.

### **3ª Etapa.- Trituración y lavado**

Se disminuyó el tamaño de partícula del polímero sintetizado hasta obtener un polvo fino con base en lo descrito por Chen *et al*, 2011. La molienda se realizó en un mortero de manera cuidadosa para reducir pérdidas del material. Para limpiar la superficie del polímero de residuos de síntesis, principalmente monómero y BPA residual, se lavó con una mezcla de metanol/ácido acético (1:4), después con una mezcla acetonitrilo/ácido acético (1:4) y finalmente con una mezcla metanol/ácido acético (1:1). El polímero se secó a temperatura ambiente por 24 h.

#### *5.1.2.2 Extracción de molécula molde*

Para la separación del BPA del interior del MIP se realizó una extracción Soxhlet durante 5 h con 250 mL de acetonitrilo. El polímero se secó por 24 h a temperatura ambiente y fue almacenado en un frasco de vidrio transparente a temperatura ambiente.

#### *5.1.2.3 Caracterización*

##### *5.1.2.3.1 Incubación del polímero (Prueba de Re-unión)*

La prueba de re-unión se realizó para estudiar la funcionalidad y eficiencia de adsorción del BPA-MIP y BPA-NIP. Para la prueba, se incubaron 30 mg de polímero (MIP/NIP) con 5 mg de BPA en 2 mL de acetonitrilo en tubos de ensayo de 20 mL con tapa roscada. La incubación se realizó con agitación a 20° C por 24 h. Posteriormente, se tomó 1 mL del disolvente de incubación para determinar la

concentración de BPA libre (no adsorbido al polímero) por cromatografía de gases acoplado a masas.

#### *5.1.2.3.2 Prueba de re-uso*

Para la prueba se incubaron 30 mg de MIP con 5 mg de BPA y 2 mL de acetonitrilo en tubos de ensayo de 20 mL con tapa roscada. La incubación se hizo con agitación a 20°C muestreándose, al día 1° y 6°, 1 mL del disolvente de incubación para determinar la concentración de BPA libre (no adsorbido al polímero) por cromatografía de gases acoplado a masas. Posteriormente, se realizó una extracción Soxhlet durante 5 horas y con 250 mL de acetonitrilo para extraer el BPA del MIP.

Se repitió la incubación en las mismas condiciones y nuevamente se muestreó al día 1° y 6°, analizando 1 mL del solvente para determinar la concentración de BPA libre (por cromatografía de gases acoplado a masas).

#### *5.1.2.3.3 Ensayo de competencia molecular*

Se incubaron 30 mg del MIP con 5 mg de BPA y 5 mg de BPA-DMC disueltos en 2 mL de acetonitrilo. La incubación se realizó con agitación durante 24 h a 20 °C. Se determinó la concentración de BPA libre por cromatografía de gases acoplado a masas y se realizaron ensayos idénticos frente a BPF y HEX.

#### *5.1.2.3.4 Morfología microscópica*

La caracterización microscópica del polímero se realizó en el Laboratorio Avanzado de Nanoscopia Electrónica (LANE) del CINVESTAV en un microscopio electrónico de barrido con el Dr. Jorge Roque de la Puente. El equipo es un HRSEM-AURIGA con una columna tipo GEMINI. Se trabajó con una aceleración de voltaje de 0.8–1.0 kV, un rango de resolución de 1.0  $\mu\text{m}$  y a una distancia de rango de magnificación de 1 Kx–500x. Se usó el detector secundario.

#### 5.1.2.3.5 FTIR

El análisis de espectroscopía infrarrojo de transformada de Fourier fue realizado en el laboratorio de la USAI de la Facultad de Química de la UNAM con ayuda la Q. Marisela Gutiérrez Franco. El espectrómetro de infrarrojo de transformada de Fourier FTIR/ FIR Spectrum 400 de Perkin se usó con un intervalo de longitudes de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ . Este análisis se llevó a cabo en estado sólido con el fin de determinar los grupos funcionales que están presentes en el MIP sintetizado.

#### 5.1.2.3.6 Grado de Hinchazón

Se incubaron 30 mg del MIP en 2 mL de acetonitrilo a temperatura ambiente durante 24 h. Las partículas del polímero se recuperaron por centrifugación 1750 rpm por 10 minutos y se pesaron. El grado de hinchazón se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Grado de hinchazón} = \frac{\text{Peso de las partículas del polímero antes de la incubación}}{\text{Peso de las partículas del polímero después de la incubación}}$$

### 5.2 Síntesis de Polímero No Impreso

La síntesis del Polímero No Impreso (NIP) se realizó de acuerdo a la metodología 5.1.2 Síntesis por Bloques, sin adicionar BPA como molécula molde y, consecuentemente, sin la extracción Soxhlet.

### 5.3 Pruebas de adsorción de BPA en Matriz Alimentaria

Para la selección del néctar de durazno como matriz alimentaria para las pruebas de adsorción se tomaron en cuenta dos consideraciones:

1. El tipo de envase.- Se escogió la presentación en lata porque el envase tiene como recubrimiento interno una resina epoxi cuya síntesis resulta en moléculas de BPA libres que pueden migrar hacia el alimento (Shaw, 2009).

2. Complejidad del alimento.- Se eligió dicha matriz (néctar de durazno) para facilitar la detección de BPA con el MIP sin mayores interferencias o competencias por el sitio activo selectivo hacia BPA.

Para las pruebas de adsorción se realizó la incubación de 30 mg del MIP en 2 mL del néctar de durazno en tubo de ensayo de 20 mL de tapa roscada. La incubación se realizó en agitación durante 24 h a 20 °C. Se analizó el BPA libre en el néctar mediante cromatografía de gases acoplado a masas.

#### **5.4 Detección y cuantificación del BPA**

##### **5.4.1 Derivatización**

Para la cuantificación de BPA por CG-MS se realizó la derivatización de las muestras líquidas que consiste en adicionar a 1 mL de muestra concentrada 10 mL de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M y 200 µL de anhídrido acético, agitar y reposar por 5 minutos. Se agregaron 200 µL de anhídrido acético con agitación magnética por 10 minutos. Posteriormente, se agregaron 5 mL de 2, 2,4 (iso-octano), se ajustó a un pH >10 con 0.5 de K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 3 M con tiras indicadoras de pH. Se agregaron 100 µL de anhídrido acético, agitando magnéticamente durante 10 minutos y dejando reposar hasta observar una separación de fases. La fase orgánica (iso-octano) se pasó por una columna de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro para su recuperación completa. A la fase acuosa se agregaron 5 mL de tolueno, permitiendo la separación de fases. La fase orgánica se pasó nuevamente por una columna de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La fase orgánica se evaporó a sequedad y posteriormente, se reconstituyó con 1 mL de tolueno, se transfirió a un vial de 2 mL para análisis por cromatografía de gases (Cao *et al.*, 2009).

##### **5.4.2 Análisis por GC-MS**

Se empleó un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas (CG-MS), Agilent Technologies 6890N con helio como gas acarreador y una velocidad de flujo de 1.2 mL/min. La temperatura del inyector fue de 280 °C. La temperatura inicial fue de 100 °C por 1 minuto, aumentando hasta 225 °C por 5 minutos a razón de 20 °C/min, y finalmente, se elevó a 325 °C a razón de 35 °C/min, manteniendo 1 min. Se inyectó 1 µL de muestra.

## **6. Resultados y Análisis**

### 6.1. Síntesis de Polímero de Impresión Molecular

La Tabla 12 muestra las diferentes formulaciones para la síntesis de MIP's por PP y bloques y los tiempos de polimerización. Estas formulaciones se adecuaron conforme los resultados cualitativos observados durante la síntesis. La última fila de la tabla muestra el color del polímero sintetizado; esta tabla comprende la prueba exploratoria para seleccionar la formulación más conveniente para el desarrollo del proyecto de investigación. Las características cualitativas observadas durante la prueba exploratoria así como los resultados de las diferentes formulaciones se detallarán en los subtemas siguientes.

**Tabla 12.-** Metodologías experimentales para la síntesis de polímeros por precipitación y bloques.

Material	Polimerización por precipitación				Polimerización por Bloques	
	1	2	3	4	1	2
Bisfenol A (molécula molde) (g)	0.02	0.20	0.20	0.20	0.23	0.23
4-VYP (monómero)(mL)	0.2	0.3	0.5	1.0	0.7	0.7
EGDMA (Entrecruzante) (mL)	0.1	0.1	0.2	0.9	0.8	0.9
Acetonitrilo (Disolvente)(mL)	1.0	20	20	25	3.5	3.5
AIBN (Iniciador) (g)	0.01	0.02	0.02	0.020	0.019	0.019
Tiempo de Polimerización (h)	2	4	12	6	6	6
Color	S/P	S/P	S/P	Precipitado blanco	Bloque blanco	Bloque Rojo

S/P: Sin Precipitado

### 6.1.1. Polimerización por Precipitación (PP)

Inicialmente se realizó un ensayo de polimerización (Experimento 1) a concentraciones de reactivos consideradas bajas observándose dificultades durante el desplazamiento de oxígeno con nitrógeno debido a que la solución se adhirió a las paredes del reactor. Además, el proceso de polimerización se detuvo a las 2 horas pues el disolvente se evaporó, finalmente, se obtuvo un precipitado “viscoso” color marrón. Por lo anterior, se propuso realizar nuevamente la síntesis del polímero de acuerdo al Experimento 2 y al Experimento 3 aumentando veinte veces el volumen del disolvente, así como las concentraciones de molécula molde, monómero e iniciador de radicales libres



**Figura 9.** Polímero de Impresión Molecular por precipitación. a) Evaporación del solvente. b) 4 horas de polimerización. c) 12 horas de polimerización.

Al finalizar la polimerización a las 4 y a las 12 horas se observó cambio de color en la solución pero no formación de precipitado (Figura 9b y 9c). Se realizó un nuevo ensayo (Experimento 4) aumentando la cantidad de los reactivos como se observa en la *tabla 12* y sustituyendo el agente entrecruzante con uno de nuevo lote con el fin de confirmar la pureza del reactivo y favorecer la polimerización. Al término de 6 h de reacción se observó un cambio de color significativo y formación de precipitado. El MIP se recuperó por centrifugación (Figura 10) obteniéndose 0.6802 g.



**Figura 10.** MIP por precipitación.

El MIP obtenido durante la prueba exploratoria se lavó superficialmente, y se extrajo la molécula molde conforme a lo descrito en la sección 5.1.1 del capítulo de Metodología,. Se obtuvieron partículas de color rojo (Figura 11) con un peso final de 0.2962 g.

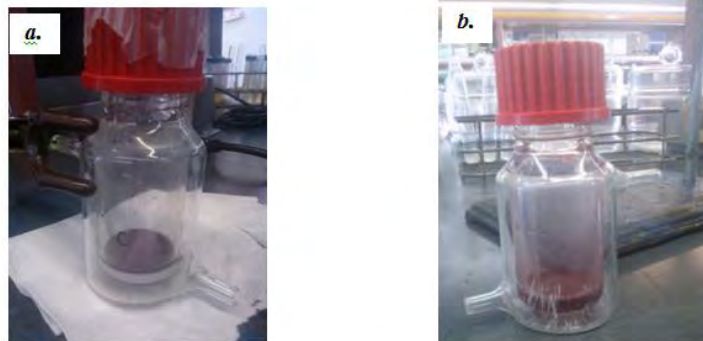


**Figura 11.** MIP por precipitación después de los lavados y extracción de la molécula molde.

### **6.1.2. Polimerización por Bloques**

En el ensayo de síntesis a concentraciones bajas de reactivos (Experimento 1), el bloque sintetizado fue en su mayoría de color blanco, amorfo y con baja rigidez (Figura 12a). Estas características se atribuyen a un bajo nivel entrecruzamiento (Cela-Perez *et al.*, 2015). Por lo anterior, se realizó nuevamente la polimerización por bloques empleando el agente entrecruzante del nuevo lote obteniendo un polímero con mayor rigidez, color rojizo y homogéneo, ver formulación del Experimento 2 de la *tabla 12* (Figura 12 b).





**Figura 12.** Polimerización por bloques con diferentes lotes de agente entrecruzante.

### **6.2. Comparación en la síntesis de polimerización de bloques y precipitación**

La selección de la técnica de polimerización más conveniente para su uso como adsorbente selectivo de BPA en un medio líquido se realizó de acuerdo a los siguientes criterios:

- Uso de cantidades mínimas de reactivos
- Menor generación de residuos
- Mayor rendimiento en peso final del polímero

Así, la *tabla 13* muestra las ventajas y desventajas observadas durante la síntesis de los polímeros por precipitación y por bloques.

**Tabla 13.-**Comparación de la síntesis de polimerización por precipitación y por bloques.

<b>Polimerización por Precipitación</b>	<b>Polimerización por Bloques</b>
<i>Ventajas</i>	
Sitios de enlace específicos	Bajo volumen de disolvente
Forma y tamaño homogéneos de partícula	No necesita centrifugación
Buen rendimiento de polimerización	Facilidad de lavado
<i>Desventajas</i>	
Exceso de disolvente	Sitios de unión menos específicos
Necesita centrifugación para recuperar polímero	Pérdida de material durante la trituración
Dificultad y pérdida de material durante el lavado	Tamaño de partículas diferentes

Particularmente, en la síntesis por precipitación se observaron cambios de color en el polímero y en sólo uno de ellos hubo la formación de un precipitado, el que contiene la mayor cantidad de agente entrecruzante (Experimento 4). Respecto a la metodología por bloques, se eligió el Experimento 2 (Tabla 12) que resultó en un polímero con mejores características morfológicas, tales como la rigidez y con un mayor rendimiento (Vicente, 2009; Cela-Perez *et al.*, 2015).

Se calculó el porcentaje de conversión del polímero de acuerdo a la ecuación propuesta por Sasaki *et al.*, (2010) con base a los pesos del polímero y la molécula molde:

$$\text{Conversión \%} = \frac{\text{Peso del polímero resultante}}{\text{peso total de la molecula molde}}$$

Por lo tanto:

$$\text{Conversión}_{\text{bloques}} = \frac{1.1879 \text{ g}}{0,05} = 23.75\% \qquad \text{Conversión}_{\text{pp}} = \frac{0.8209 \text{ g}}{0,05} = 16.41\%$$

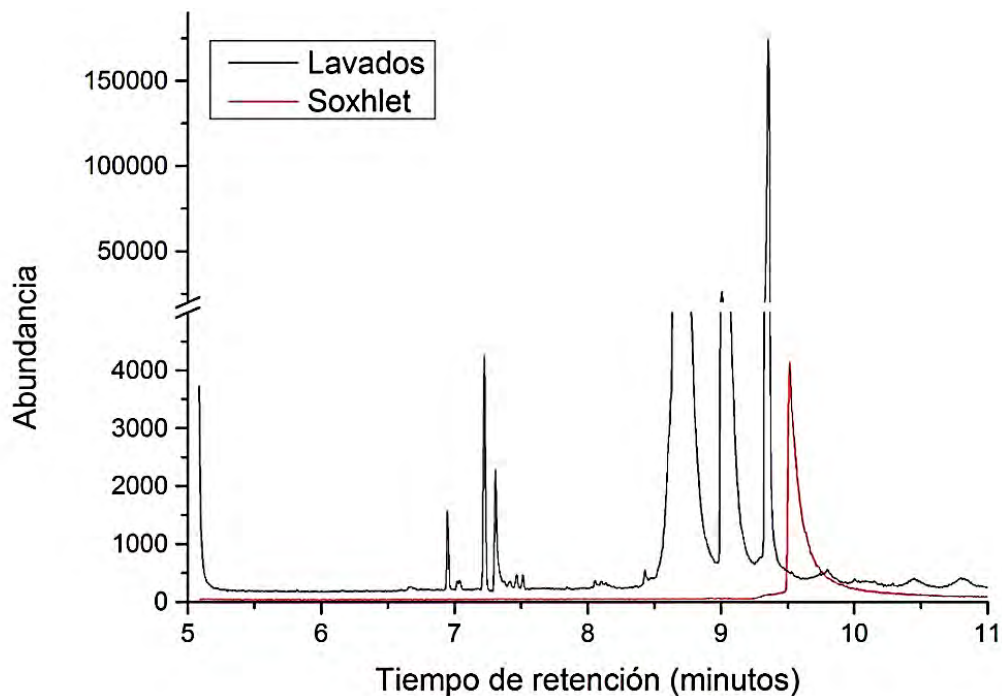
El porcentaje de conversión por polimerización por bloques fue mayor en un 31% respecto a la polimerización por precipitación. Además, ofrece mayores ventajas en cuanto a menor uso de reactivos y por lo tanto menor generación de residuos. Por lo anterior, se propuso utilizar la síntesis de polimerización por bloques para las pruebas de adsorción de BPA en medio acuoso, así como los ensayos de detección selectiva de BPA en una matriz alimentaria.

El MIP obtenido por polimerización por bloques resulta en un bloque que no favorece la máxima adsorción de BPA por lo que se disminuyó el tamaño de partícula del polímero a un rango entre 50-100  $\mu\text{m}$ , medido por micrografía SEM, mediante trituración a fin de incrementar el área superficial de contacto (Figura 13). Finalmente, se realizó el lavado con disolventes y la extracción por Soxhlet.



**Figura 13.** a) Disminución de tamaño de partícula. b) Extracción Soxhlet

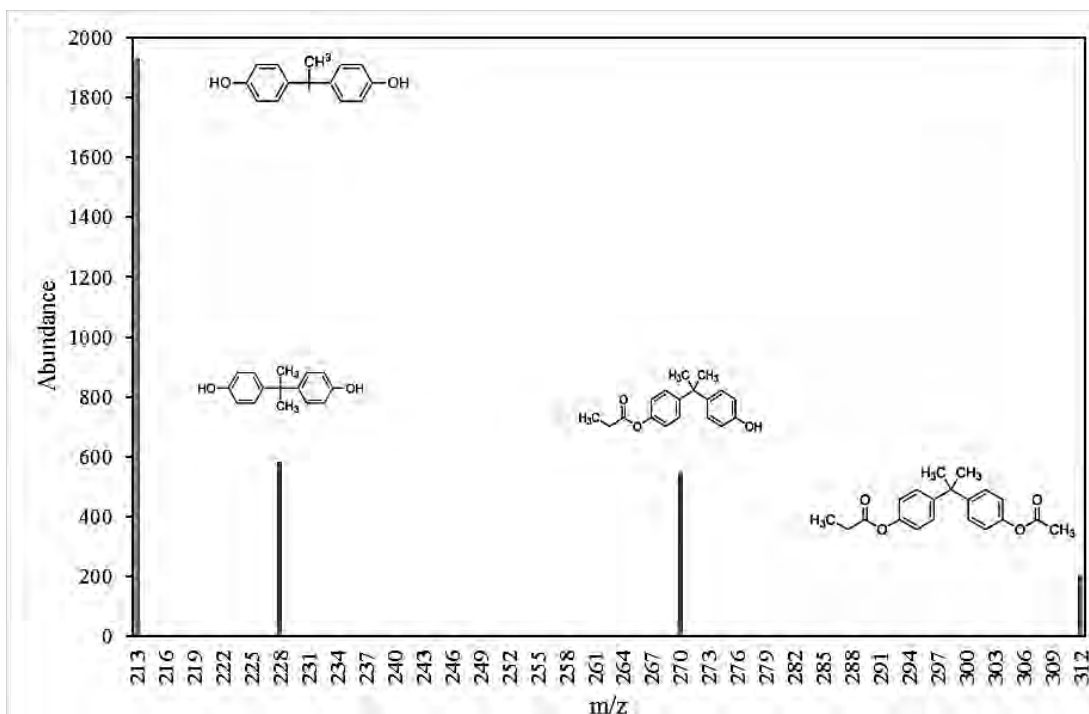
Los extractos de BPA resultantes de los lavados por disolventes y de la extracción Soxhlet se analizaron por CG-MS (Figura 14) a fin de analizar la concentración obtenida del contaminante y asociándolo con la eficiencia de retención del polímero.



**Figura 14.** Señal de BPA en los extractos de extracción superficial (—) e interna (—)

Los picos característicos de BPA se obtuvieron a tiempos de retención de 9.35 minutos para extracción superficial y 9.50 minutos en la extracción Soxhlet, esta variación en los tiempos de retención se atribuye a ensuciamiento de la columna del equipo, pues las inyecciones de las muestras de BPA se alternaban con muestras de aguas residuales.

Sin embargo, para confirmar la presencia de BPA se identificaron los iones  $m/z$  característicos: 213, 228, 270 y 312 (Figura 15). El patrón de fragmentación en masas concuerda con lo reportado por Cao *et al.*, 2009.



**Figura 15.** Iones  $m/z$  del BPA.

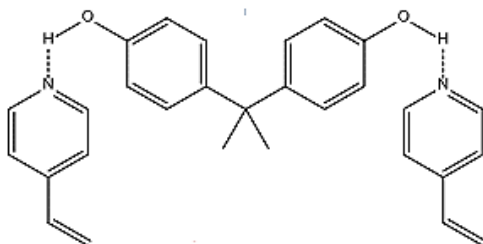
La concentración de BPA empleada para la síntesis del MIP fue de 45 mg/mL, así en la *tabla 14* se muestra la concentración de BPA en las extracciones por disolventes (superficial) y por Soxhlet (interno), observándose una eficiencia de extracción mayor al 90% con una concentración final de 42.37 mg/mL.

**Tabla 14.-**Concentración de BPA libre en extracción superficial e interna del MIP.

Extracción de BPA	Concentración de BPA libre (mg/mL <sub>tolueno</sub> )
Disolventes	41.8
Soxhlet	0.057
BPA total	42.37

Se logró una extracción superficial de BPA mayor respecto al interior del MIP. Lo anterior se explica porque los sitios activos del MIP se forman en la superficie del

polímero donde las interacciones entre la molécula molde (BPA) y la 4-Vyp son débiles no covalentes, tales como puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y uniones dipolo-dipolo (Haruya, *et al.*, 2002), Por ejemplo, Lasagabáster-Latorre, (2013) reportó que el grupo fenólico de BPA interactúa con dos grupos piridina mediante interacciones de enlace de hidrógeno (Figura 16)



**Figura 16.** Mecanismo de unión de la 4-Vyp y BPA. Tomado de Lasagabáster-Latorre, (2013)

Cabe mencionar que en la literatura de referencia la reacción de polimerización se hizo durante 24 h para obtener mayores grados de polimerización. Sin embargo, los autores evalúan la eficiencia de los MIP's sintetizados a partir de la capacidad de adsorción de BPA.

En estudios reportados se hicieron los lavados superficiales hasta que no se detectó BPA libre en los extractos, posteriormente realizaron la extracción Soxhlet durante 24 h para extraer el BPA interno, logrando así un MIP sin BPA (Navarro-Villoslada *et al.*, 2004; Sasaki *et al.*, 2010; Cela-Pérez *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2011). En el presente proyecto de tesis la extracción se realizó únicamente por 6 h por motivos de seguridad.

Los sitios impresos no sólo están formados en la superficie del polímero, sino que también en la matriz del entrecruzamiento, lo que hace difícil su extracción únicamente con solventes (Hakinago y Sanbe, 2000). Por lo anterior, las pérdidas de 2.64 mg de BPA, equivalente al 5.8% de rendimiento después de los lavados del MIP se atribuyen al tiempo del Soxhlet y a que generalmente el 1% del BPA permanece fuertemente ligado al interior del polímero impreso y por lo tanto, no es extraíble (Lasáková, 2009).

### 6.3 Caracterización del polímero

#### 6.3.1 Prueba de re-unión

La prueba de re-unión se realizó con el fin de estudiar la capacidad de adsorción de BPA por los sitios de unión del MIP con respecto a un NIP, que no posee sitios selectivos a BPA. La incubación se realizó en agitación por 24 h, a temperatura ambiente y empleando acetonitrilo como medio acuoso (Figura 17)



**Figura 17.** Incubación de MIP y NIP.

La concentración inicial de BPA previo a incubación con el MIP y NIP fue de 25 mg/mL. El ensayo de re-unión de BPA con el MIP (*tabla 15*) mostró una concentración de BPA libre de 1.926 mg/mL  $\pm$ 0.055, lo que representa un 93% de BPA adsorbido por el polímero. Por otro lado, el BPA libre en el ensayo con el NIP fue de 9.5426 mg/mL  $\pm$ 0.151, es decir, hubo una adsorción de 61.8%. Estos resultados se atribuyen a que el MIP es diseñado para comportarse selectivamente y tener una fuerte afinidad hacia el BPA, además de ser mayormente poroso (Thommes, 2010; Murray *et al.*, 2012).

**Tabla 15.-** Prueba de re-unión para comparación entre MIP y NIP.

Polímero	[BPA libre]	[BPA adsorbido]	Eficiencia
	(mg/mL)		
MIP	1.4926 $\pm$ 0.055	23.50	93%
NIP	9.5426 $\pm$ 0.151	15.45	62%

El NIP al no tener impreso una molécula molde, tiene una fuerte unión no específica que se atribuye a las interacciones hidrofóbicas entre los compuestos orgánicos y el polímero (Thommes, 2010). Sin embargo, el NIP puede ser útil en medios complejos, por ejemplo: aguas residuales para detectar simultáneamente varios contaminantes. Los resultados obtenidos en este ensayo son muy similares a los Lin *et al.*, (2008) quien reportó una eficiencia para el MIP y NIP sintetizados con BPA de 85.46% y 56.4% en muestras de aguas tratadas.

### 6.3.2 Prueba de Re-uso

Esta prueba se realizó para comprobar una de las características más representativas de los MIP's, es decir, la capacidad de retención de BPA en un segundo ciclo de reuso.

Como puede observarse en la *tabla 16*, la eficiencia de unión BPA-MIP para el primer ciclo es del 96.52% en el primer día y de 94.24% al sexto día de incubación. La incubación se realizó por varios días para observar unión BPA-MIP máxima. Sin embargo, al sexto día se observó un incremento del BPA libre, esto puede atribuirse al aumento del grado de hinchazón del polímero que se discutirá en la sección 6.3.5.

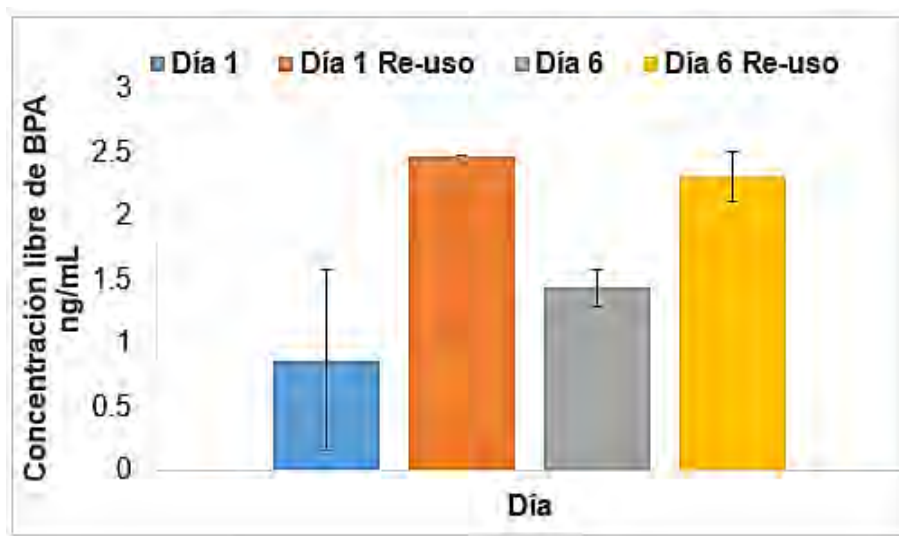
**Tabla 16.**-Prueba de re-uso para la retención de BPA en MIP

	[BPA libre]	[BPA retenido]
	(mg/mL)	
<b>Primer ciclo</b>		
1 <sup>er</sup> día	0.8695 ± 0.712	24.13
6 <sup>to</sup> día	1.4370 ± 0.147	23.56
<b>Segundo ciclo</b>		
1 <sup>er</sup> día	2.477 ± 0.001	22.523
6 <sup>to</sup> día	2.311 ± 0.194	22.689

La adsorción del disolvente es mayor conforme aumenta el tiempo de incubación, deformando el entrecruzamiento del polímero y favoreciendo la liberación del BPA (Alizadeh *et al.*, 2012). Al segundo ciclo de re-usabilidad el MIP se mantiene entre

72 y 90% de eficiencia de unión; sin embargo, se observó liberación del BPA al medio en el sexto día de incubación. La eficiencia se vio afectada en el segundo ciclo, y esto se atribuye a la extracción Soxhlet que afectó al entrecruzamiento del MIP influyendo en la rigidez de la estructura, en la cavidad y la flexibilidad del polímero (Lok *et al.*, 2009).

Ren-Yueming *et al.*, (2011) reportaron una eficiencia de adsorción del 85% después de 5 ciclos de re-uso, con una pérdida de la capacidad de unión del BPA del 6% respecto al inicio en un sistema acuoso modelo. Por su parte, las pruebas de re-usabilidad con el MIP en el presente proyecto mostraron una disminución de hasta el 7% de capacidad de unión al BPA entre el primer y segundo ciclo (Figura 18).

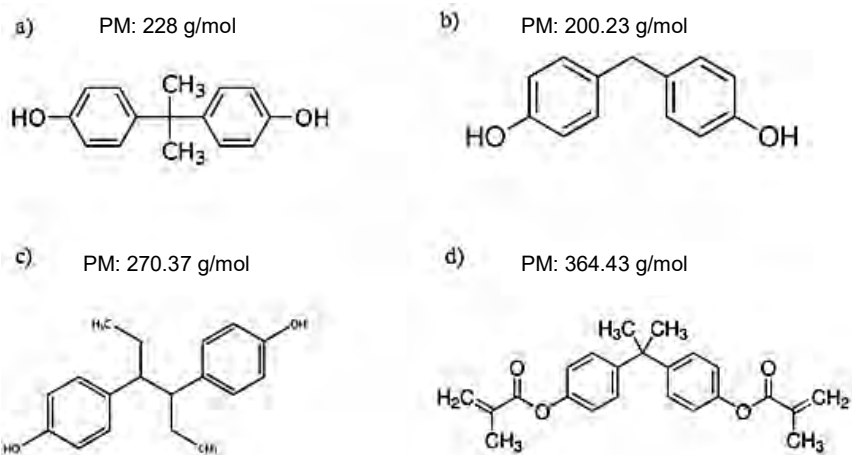


**Figura 18.** Prueba de re-usabilidad del MIP. Concentración inicial de BPA: 25 mg/mL.

### 6.3.3 *Ensayo de competencia molecular*

Una vez que se confirmó la eficiencia del MIP con respecto al NIP, se llevaron a cabo experimentos de competencia molecular para confirmar la selectividad a BPA. Se eligieron 3 moléculas similares al BPA: BPF, HEX y BPA DMC (Figura 19)





**Figura 19.** Estructura química de los compuestos utilizados en competencia molecular:

a) BPA, b) BPF, c) HEX y d) BPA-DMC.

Cada uno de los compuestos se incubó en un medio de acetonitrilo con BPA, ambos a una concentración inicial de 25mg/mL (0.25mM) y se determinó la concentración de BPA libre en el medio, es decir, aquella concentración de BPA que no pudo unirse al polímero. Los ensayos se realizaron con MIP y NIP a fin de confirmar la selectividad hacia el BPA obteniendo las siguientes concentraciones:

**Tabla 17.-** Concentraciones de BPA libre en competencia con otros compuestos.

	BPA libre	
	MIP	NIP
<b>HEX</b>	6.215mg/mL $\pm$ 0.19	2.011mg/mL $\pm$ 0.498
<b>BPF</b>	6.542mg/mL $\pm$ 0.24	-
<b>BPA DMC</b>	1.377mg/mL $\pm$ 0.26	4.276 mg/mL $\pm$ 2.78

NOTA: Debido a la disponibilidad del compuesto, el ensayo de competencia molecular con BPF solo se realizó con el MIP.

Las concentraciones de BPA libre en el ensayo de competencia molecular con el MIP frente a HEX y BPF fueron de 6.215 mg/mL  $\pm$ 0.19 y de 6.542 mg/mL  $\pm$  0.24, respectivamente, lo que representa un 75.14% y de 73.83% de BPA adsorbido. Por otro lado, el ensayo de BPA libre con el NIP se realizó únicamente con el HEX y fue de 2.011 mg/mL  $\pm$ 0.498, es decir, que hubo una adsorción de BPA del 91.95%.

Con base en los resultados anteriores, se observó que el MIP tiene una afinidad en tamaño y forma hacia el BPF y HEX, sin perder su memoria de reconocimiento hacia el BPA, atribuible a los siguientes factores:

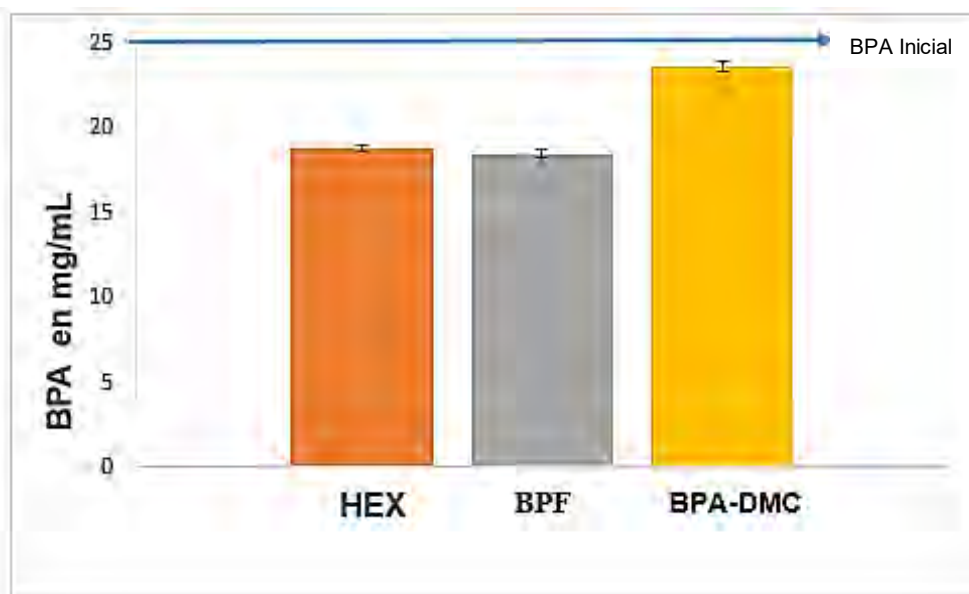
- Un posible entrecruzamiento heterogéneo. Al ser una polimerización por radicales libres el término de la reacción puede variar; esto se refiere que al sintetizar el polímero con tiempos reducidos de polimerización se pudieron haber creado cavidades con pobre reconocimiento de BPA de tal forma que no distingue la diferencia en la distancia entre los grupos hidroxilos de HEX y BPA (Sasaki *et al.*, 2010). En el caso del BPF se debe a que los dos grupos metilos del BPA son reemplazados por dos grupos hidrógeno. Por ello, dos enlaces de hidrógeno se pueden formar entre los grupos hidroxilo de BPF y los dos grupos piridina de la 4-Vyp. El BPF al ser una molécula en forma y tamaño más pequeña, la hace más accesible a las cavidades impresas del BPA en el MIP (Cela-Pérez *et al.*, 2011).
- Tipo de Polimerización. Al ser un MIP preparado por una impresión no-covalente puede crear un bajo rendimiento en sitios específicos y alto rendimiento en sitios no específicos (Lok *et al.*, 2009). Los polímeros que son sintetizados en tiempos más prolongados garantizan una forma más definida de las cavidades de impresión y una mayor especificidad en el MIP (Piletsky *et al.*, 2005).
- Triturado. El polímero fue triturado para disminuir el tamaño de partícula, esa fricción al triturar pudieron haber dañado las cavidades afectando el reconocimiento de BPA.
- Extracción de la molécula molde. Después de remover el BPA, el entrecruzamiento decrece lo que influye la rigidez de la estructura y flexibilidad (Lok *et al.*, 2009).

En el ensayo de competencia del BPA frente al BPA-DMC se observó que el BPA libre fue de 1.377mg/mL  $\pm$  0.26, es decir que el MIP adsorbió el 94.49%. Por otro lado, el ensayo de competencia molecular con el NIP mostró una concentración de BPA libre de 4.276 mg/mL  $\pm$ 2.78, esto representa el 82.92% de BPA adsorbido.

Cabe mencionar que los resultados mostraron una alta desviación estándar, es decir, el ensayo es poco reproducible probablemente a que la estructura es heterogénea. Sin embargo, los NIP's pueden ser empleados como un sensor en aguas residuales para detectar simultáneamente varios contaminantes, debido a su baja selectividad. Por ejemplo, Murray y Örmeci, (2012) observaron hasta un 97% de adsorción de BPA en presencia de atrazina y el estrógeno sintético DES.

En competencia con el BPA-DMC, el MIP adsorbió más BPA en comparación al HEX y BPF. Sin embargo, el BPA-DMC al ser una molécula más grande que el BPA (los grupos hidroxilos de BPA son sustituidos por dos grupos éster) no puede unirse a las cavidades selectivas del MIP por efecto estérico sin importar la heterogeneidad de las cavidades del polímero (Pulko *et al.*, 2005; Cela-Pérez *et al.*, 2015).

En resumen, la Figura 20 muestra la comparación del BPA adsorbido por el MIP en competencia molecular con el BPF, HEX y BPA-DMC.




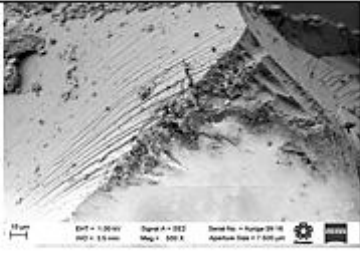

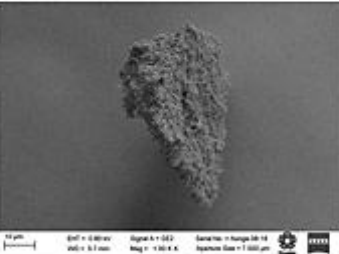
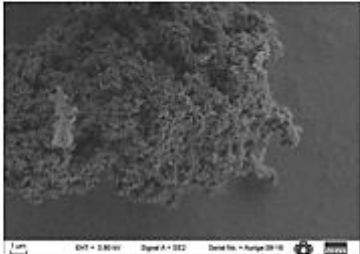
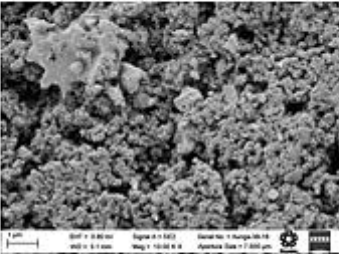
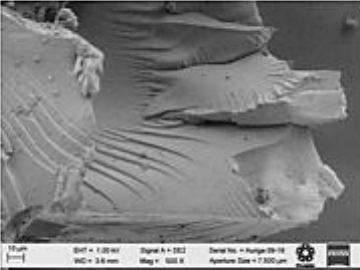

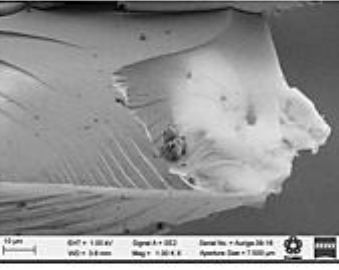
**Figura 20.** Adsorción de BPA en MIP en ensayos de competencia molecular frente a HEX, BPF y BPA-DMC.

#### **6.3.4. Caracterización Morfológica**

La superficie morfológica del MIP fue caracterizada por microscopía electrónica de barrido (SEM por sus siglas en ingles). Esta microscopía es comúnmente usada para examinar la estructura y superficie morfológica de los MIP's.

Como puede observarse en la *tabla 18*, ninguno de los tres materiales tiene una forma definida. Sin embargo, en el caso del MIP-A y NIP-A se observa por microscopía un material semi-cristalino y rígido, atribuible a un buen grado de entrecruzamiento. Estas imágenes son muy similares al estudio morfológico de Alizeideh *et al.*, (2012). Por su parte, el MIP-B amorfo presenta una estructura con menor rigidez, indicando un menor grado de entrecruzamiento, atribuible a cadenas más cortas o muertas en los polímeros afectan a sus propiedades mecánicas (Cela-Pérez *et al.*, 2011).

Tabla 18.-Microscopía SEM de los polímeros.

Polímero	20 $\mu\text{m}$	10 $\mu\text{m}$	1 $\mu\text{m}$
MIP-A (MIP BPA POR BLOQUES)			
MIP-B (MIP BPA POR BLOQUES)			
NIP-A (NIP BPA POR BLOQUES)			

### 6.3.5 Grado de hinchazón

Para complementar el análisis de morfología se realizó el experimento del grado de hinchazón (tabla 19). El cual consiste en determinar el grado de hinchamiento que sufre el polímero en contacto con un volumen concreto de disolvente. El cambio de volumen que sufre ya que el proceso de hinchamiento del MIP puede afectar el grado de reconocimiento del BPA por estar en contacto con un disolvente (Cela-Pérez, 2015).

Para el MIP-A y NIP-A de color rojo se pudo observar insolubilidad en acetonitrilo y un hinchamiento mayor con respecto al MIP blanco (MIP-B). La insolubilidad en los polímeros generalmente es causada debido a que las fuerzas intermoleculares son suficientemente altas para impedir la solubilidad o debido a su cristalinidad ya que, para los polímeros no polares como el MIP, no se pueden disolver hasta temperaturas próximas a su punto de fusión (O dian, G, 2004).

**Tabla 19.-Resultados de Morfología y grado de hinchazón.**

	<b>Disposición molecular</b>	<b>Peso MIP antes de la incubación (g)</b>	<b>Peso MIP después de la incubación (g)</b>	<b>Porcentaje de incremento (%)</b>
<b>MIP-A</b>	<i>Semi-Cristalino</i>	28.751	28.872	0.42%
<b>NIP-A</b>	<i>Semi-Cristalino</i>	28.688	28.836	0.51%
<b>MIP-B</b>	<b><i>Amorfo</i></b>	<b>26.680</b>	<b>26.691</b>	0.04%

A mayor tamaño de partícula, pH o si está en presencia de solventes orgánicos, el grado de hinchazón del polímero aumentará (Turner *et al.*, 2004; Holland *et al.*, 2010). El MIP-A (rojo) y NIP-A tienen un tamaño de partícula mayor a 200  $\mu\text{m}$  esto debido a que la rigidez del polímero dificultó su triturado en comparación al MIP-B cuyo triturado fue más accesible obteniendo partículas de aproximadamente < 50 $\mu\text{m}$ ; por lo tanto, a medida que el tamaño de MIP disminuye mejorará sus características tales como selectividad, capacidad y cinética de transporte, debido a que la mayor parte de los sitios de reconocimiento tendrán más proximidad con la superficie (Holland *et al.*, 2010 ;Alizadeh *et. al.*, 2012) Por lo tanto, estos sitios se

vuelven más accesibles para la molécula molde de ser adsorbidos en los sitios selectivos del MIP.

Por lo anterior, un polímero con un alto grado de hinchazón puede perder la memoria de la molécula molde separando la distancia entre los grupos funcionales de las cavidades selectivas. Si el hinchamiento ocurre en gran medida, la forma de las cavidades pueden desorganizarse y destruir la selectividad del polímero (Cormack *et al.*, 2004; Alizadeh, *et. al.*, 2012).

La textura rígida de los polímeros MIP-A y NIP-A se debe a una disposición molecular semi-cristalina indicando una estructura ordenada. El término “semi” se refiere a que no cristalizan totalmente como los metales si no que consisten en regiones cristalinas rodeadas de zonas amorfas (Fan *et. al.*, 2008). Por su parte, el MIP-B de (color blanco) que es amorfo, tiene menor dureza y menor rigidez nos habla que las cadenas moleculares no tienen orden de tal forma que se enrollan al azar (Sarin *et al.*, 1980; Holland *et al.*, 2010).

### **6.3.6 FTIR**

Para complementar el análisis de morfología se realizó el FTIR únicamente del MIP-A el cual se empleó para el ensayo en matriz alimento. El principal objetivo del análisis es determinar los grupos funcionales posterior a la polimerización.

Se analizaron los espectros de infrarrojo del EGDMA y 4-VYP detectando los grupos funcionales característicos de cada IR (Figura 21).

El IR del MIP, se analizó con ayuda del mecanismo de reacción propuesto (Figura 22) con el fin de detectar la presencia y ausencia de los grupos funcionales presentes en el MIP y confirmar si se logró un entrecruzamiento total.

El espectro del MIP nos muestra las bandas correspondientes al monómero (4-VYP), los picos de 1597 y 1558  $\text{cm}^{-1}$  corresponde al enlace (C=N) del anillo de la piridina y en el área de 1630 se detectó el pico correspondiente al enlace vinilo (C=C).

También se detectaron las tres bandas características del EGDMA, la primera se muestra en la región de  $1720\text{ cm}^{-1}$  donde se identifican los carbonilos del di-éster (C=O). La segunda banda se encuentra en la zona de  $1295\text{ cm}^{-1}$  y  $1157\text{ cm}^{-1}$  donde se corrobora los enlaces de (C-O-C), y la tercera en la región de  $1636.78\text{ cm}^{-1}$  banda que corresponde al grupo funcional vinilo (C=C).



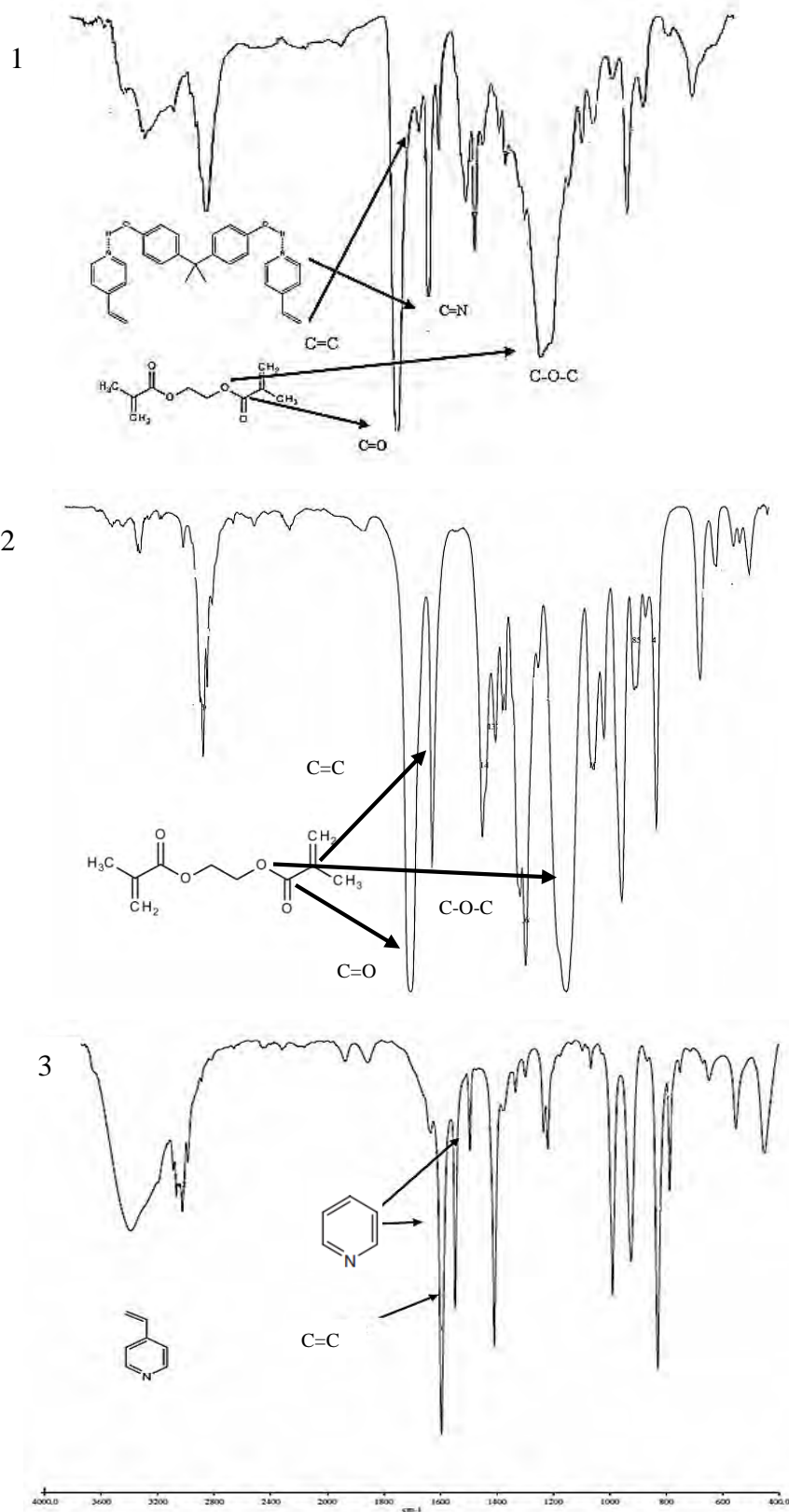


Figura 21. Espectro IR (1) MIP, (2) EGDMA, (3) 4-VYP.

Para confirmar el entrecruzamiento total del polímero, se consultó que la banda de 1636.78 del grupo vinilo debe estar ausente posterior a la polimerización (Figura 21-1) esto debido a que los grupos vinilos de la 4-VYP y del EGDMA actúan con los radicales libres del sistema para iniciar el entrecruzamiento. Sin embargo, se detectó la presencia de esta banda en menor intensidad demostrando que menos del 100% de las moléculas del EGDMA fueron entrecruzadas en el polímero (Lasagabáster *et al.*, 2013). Este espectro del MIP tiene similitud con los reportados por Ren *et al.*, (2012), y Lasagabáster *et al.*, (2013) para MIP's de BPA.

## Mecanismo de Reacción

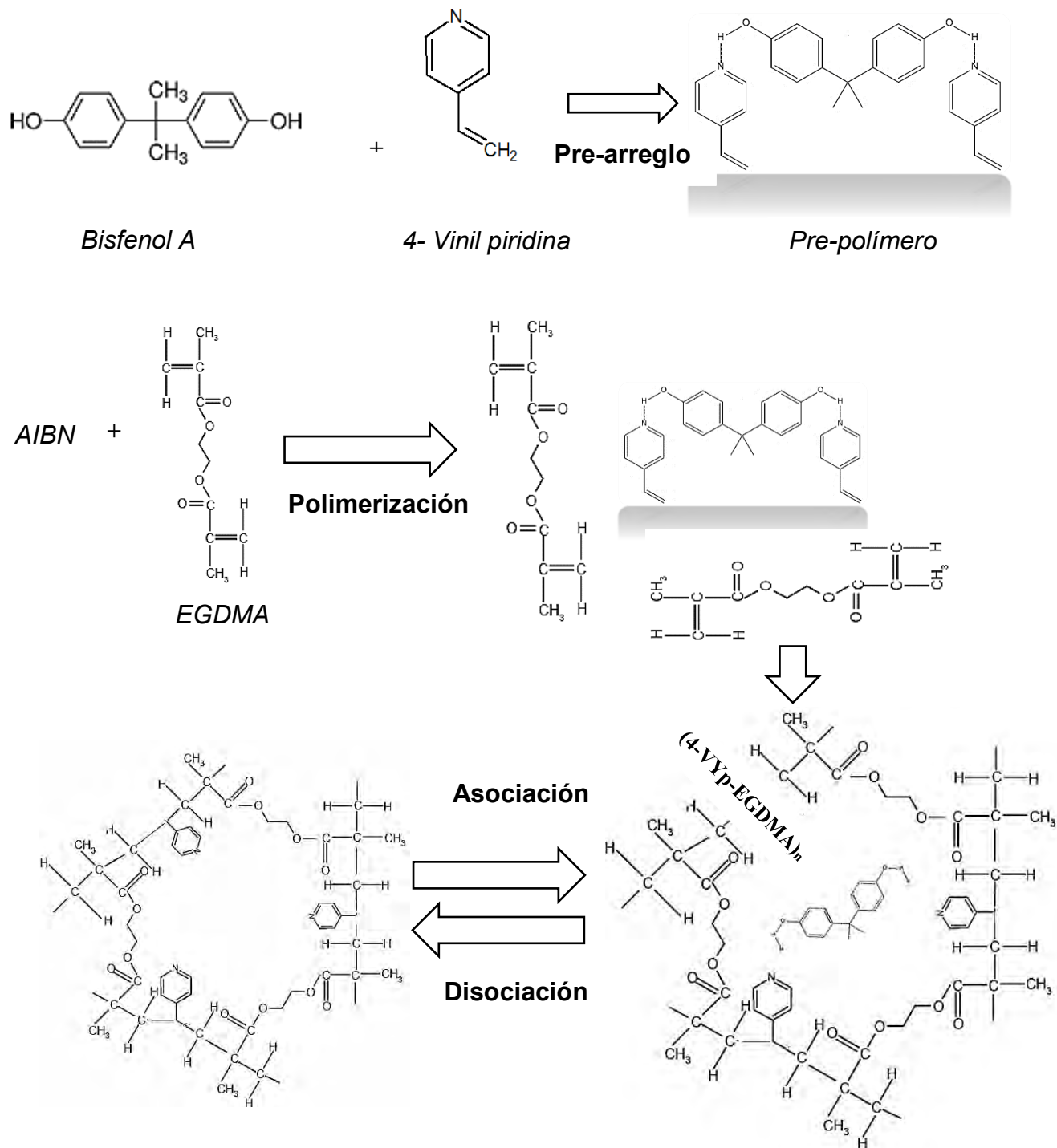
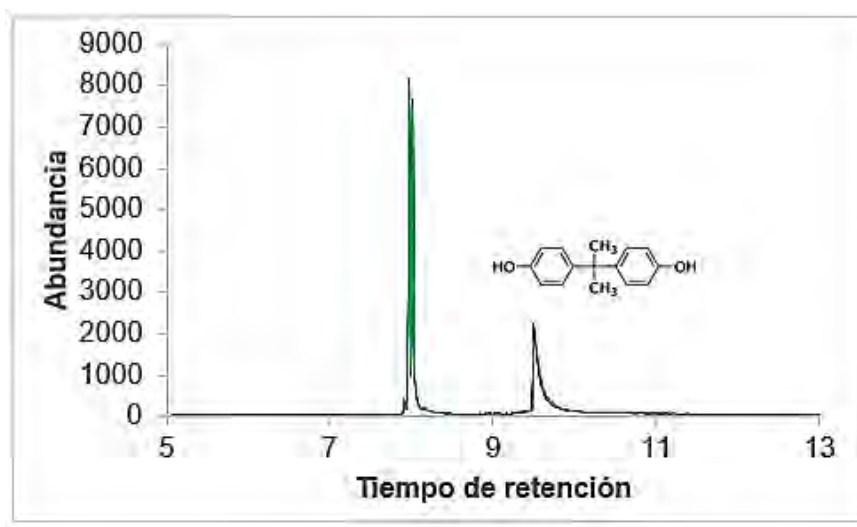


Figura 22. Mecanismo de reacción propuesto de la síntesis del MIP

#### 6.4.- Pruebas de adsorción de BPA en Matriz Alimentaria

Las pruebas de adsorción de BPA en MIP en una matriz alimentaria se realizaron con néctar de durazno enlatado. La concentración máxima de BPA encontrada en ésta bebida derivatizada fue de 440 ng/mL en un tiempo de retención de 9:50 (Figura 23).



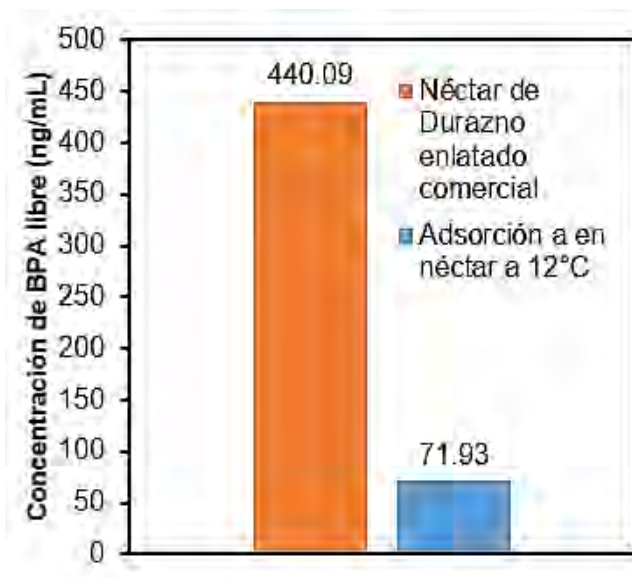
**Figura 23.** Detección de BPA en el néctar de durazno enlatado.

No existen estudios sobre cuantificación de BPA en néctar de frutas, por lo que se comparó con valores reportados en jugos y bebidas. La concentración de BPA detectada en el néctar de durazno comercial es mayor a la reportada en bebidas, la cual es de hasta 7 ng/mL (Goodson *et al.*, 2002), de 212 ng/mL (Thomson y Grounds, 2005) y de 14.1 a 84 ng/mL (Kang y Kondo, 2002).

Entre los factores que favorecen la migración de BPA de la resina epóxica de la lata hacia el néctar comprenden procesos térmicos como la pasteurización, donde se aplicó una temperatura de 80 °C. Además, los daños mecánicos en la lata afectan la resina epoxi favoreciendo la migración así como las condiciones de almacenamiento y de transporte debido a cambios de temperatura (González, *et al.*, 2011; Shaw, 2011).

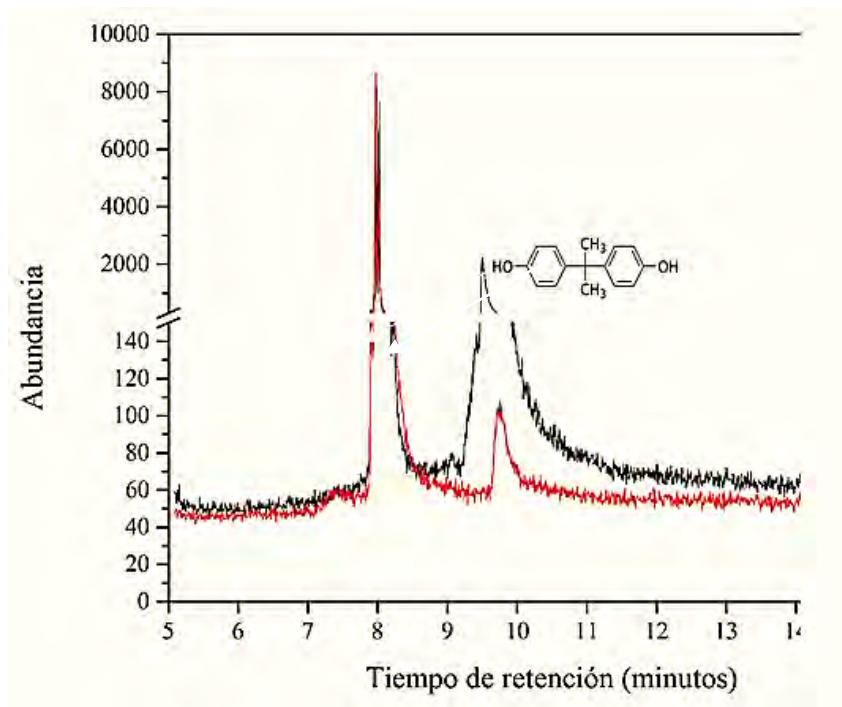
Las pruebas de adsorción de BPA con 30 mg de MIP mostraron una concentración libre de 77.52 ng/mL  $\pm$ 7.9 en el néctar, es decir, que el MIP adsorbió 82.38% del

BPA en un periodo de 24 h (Figura 24). Martin-Esteban y Tadeo (2006) describe la síntesis de MIP's por precipitación empleando BPA, BPA-d16 como moléculas molde y una formulación de 4- Vyp-TRIM-Tol reportando hasta 78% de recuperación. El porcentaje de recuperación de BPA por el MIP sintetizado es mayor al reportado en la literatura y cumple con el objetivo propuesto de detección del BPA en una matriz alimentaria enlatada.



**Figura 24.** Concentración de BPA después de la adsorción en MIP.

Finalmente, la respuesta cromatográfica (Figura 25) se observó sin interferencias, sólo la señal asociada al BPA y otra molécula con un tiempo de retención de 8 minutos. Esta interferencia se identificó como a un ftalato de acuerdo a la biblioteca del equipo Agilent Technologies Modelo 5973 Network. Los ftalatos son usados como aditivos en envases de alimentos y también se han reportado como precursores de disrupción endocrina (Petersen *et al.*, 2000; Chichizola *et al.*, 2009).



**Figura 25.** Respuesta cromatográfica de BPA después del ensayo de adsorción en MIP.

(—) MIP en néctar. (—) Néctar comercial

## **7. Conclusiones y Recomendaciones**

## 7.1 Conclusiones

- Se sintetizó un polímero de impresión molecular por la metodología de precipitación y por la metodología de bloques con un rendimiento de polimerización de 16.41 % y 23.75% respectivamente. La polimerización por bloques ofrece mayores ventajas en cuanto a menor uso de reactivos y por lo tanto menor generación de residuos que afectan al medio ambiente.

- Se seleccionó la metodología por bloques para caracterización e incubación en la matriz alimentaria con base a la conversión de polímero. La polimerización por bloques fue mayor en un 31% respecto a la polimerización por precipitación.

- Se caracterizó la morfología del MIP por SEM donde se observó un material semicristalino y rígido. Estas características se le atribuyen a un buen grado de entrecruzamiento, que se confirmó con el FTIR.

- El MIP sintetizado por la metodología por bloques obtiene una eficiencia del 33.5% mayor en comparación a un NIP y esto se atribuye a que el MIP es diseñado para comportarse selectivamente y tener una fuerte afinidad hacia el BPA.

- En el ensayo por competencia molecular, el polímero adsorbió el 94.49% de BPA frente al BPA-DMC. Además, adsorbió 75.14% y el 73.83% de BPA frente a HEX y BPF, respectivamente. Estos resultados se atribuyen a que el HEX y BPF son moléculas estequiométricamente similares al BPA por lo que tienen una afinidad en tamaño y forma hacia las cavidades selectivas en el MIP. Por otro lado, el BPA-DMC es una molécula más grande en tamaño y forma, y el efecto estérico impedirá unirse a cavidades diseñadas para BPA.

- El MIP mostró una capacidad de unión al BPA en dos ciclos de uso con una disminución en la eficiencia de adsorción de hasta el 7%.



- El MIP sintetizado adsorbió el 80% de la concentración inicial de BPA en una bebida enlatada (440 ng/mL). Si bien la extracción no fue completa, se demostró que el polímero puede utilizarse para la detección de BPA.

## 7.2 Recomendaciones

-Realizar una síntesis con un tiempo de polimerización de 24 h, pues se reporta que los polímeros que son sintetizados por tiempos prolongados garantizan una forma más definida de las cavidades de impresión y una mayor especificidad en el MIP.

-Realizar ensayos que permitan determinar la capacidad de enlace del polímero como isotermas de adsorción y desorción, estos experimentos pueden confirmar la eficiencia y capacidad de los sitios de unión. Sin mencionar que complementan la caracterización morfológica como el área de superficie y la porosidad.

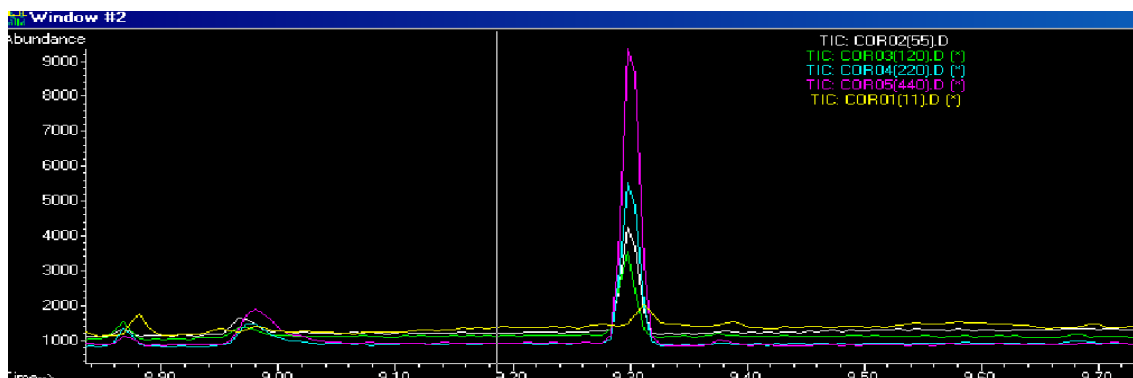
- Complementar la eficiencia de adsorción del material, realizando más de dos ciclos de re-uso.

-Una vez optimizado los puntos anteriores, el polímero podría adaptarse en cartuchos de fase sólida para detectar BPA en alimentos (He *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008; Lok *et al.*, 2009) como se hace actualmente en compañías como ELIPSA (Alemania) o MIPS Technology (Suecia) que han diseñado polímeros de impresión molecular para la detección selectiva de compuestos, como por ejemplo: Clembuterol, Triazina, Cloramfenicol.

## 8. Anexo y Bibliografía

### 8.1 Anexo

La Curva Patrón basada (Lian-Ciao et al, 2009) adaptada por *Guadalupe Elia Manzano Bautista*.



**Figura 26.-** Cromatograma Curva Patrón

**Tabla 21 - Curva Patrón**

(ng/mL)	Área
11	5337
55	29904
110	23317
220	49666
440	90968

Ecuación de la recta:  $205.20X(\text{ng/mL})+1805.5$

R= 0.9987

## Mecanismo de Derivatización

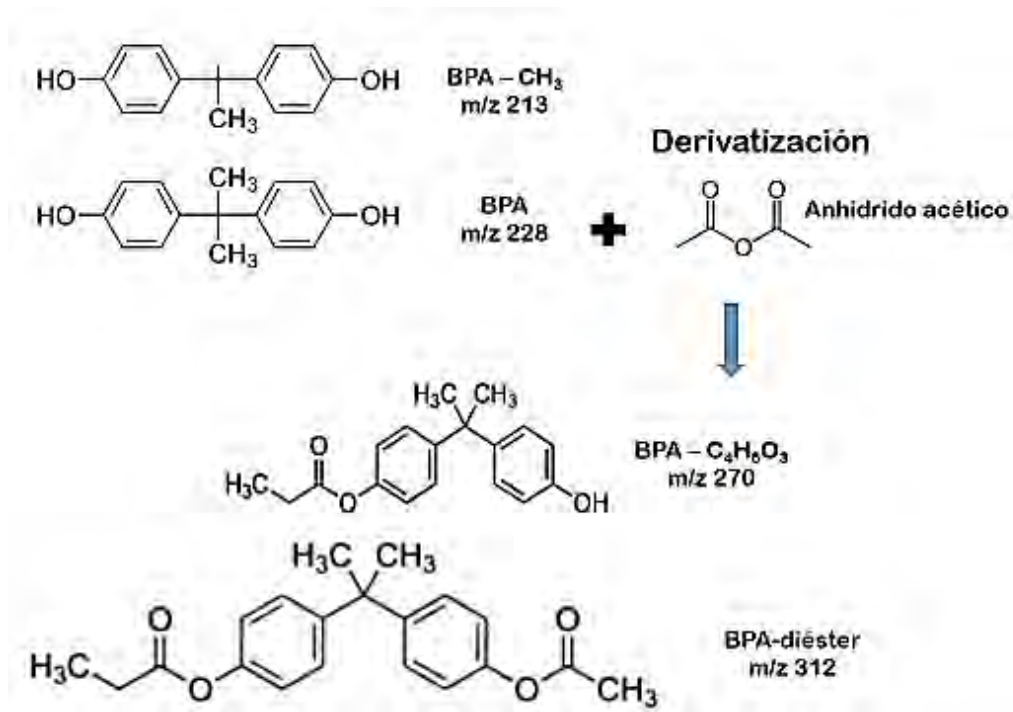


Figura 27.- Mecanismo de derivatización

## Hoja de Cálculo

Cálculo para la concentración de BPA libre se usaron las áreas:

Por ejemplo, para el área del MIP

- $52621 = 205.20 (x) + 1805.50$
- $x = \frac{52621 - 1805.50}{205.20} \frac{\text{ng}}{\text{mL de Tol}}$
- $247.638 \frac{\text{ng}}{\text{mL de Tol}} \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.1 \text{ mL}}\right) \left(\frac{10 \text{ mL}}{0.1 \text{ mL}}\right) = 2476380 \frac{\text{ng}}{\text{mL de Tol}}$

$$2476380 \frac{\text{ng}}{\text{mL de Tol}} \left(\frac{1 \times 10^{-6} \text{ mg}}{1 \text{ ng}}\right) = 2.4763 \frac{\text{mg}}{\text{mL de Tol}}$$

## 8.2 Bibliografía

- Andrade-Ribeiro, Pacheco-Ferreira Aldo, L. Nóbrega da Cunha Cynara, S. Mendes Ana (2006). Disruptores endocrinos: potencial problema para la salud pública y medio ambiente. *Rev Biomed*, 17, 146-150.
- Alexiadou, D. K., Maragou, N. C., Thomaidis, N. S., Theodoridis, G. A., & Koupparis, M. A. (2008). Molecularly imprinted polymers for bisphenol A for HPLC and SPE from water and milk. *Journal of Separation Science*, 31(12), 2272-2282.
- Alizadeh, T., & Memarbashi, N. (2012). Evaluation of the facilitated transport capabilities of nano-and micro-sized molecularly imprinted polymers (MIPs) in a bulk liquid membrane system. *Separation and Purification Technology*, 90, 83-91.
- Areizaga, J., Cortázar, M. M., Elorza, J. M., & Iruin, J. J. (2002). Polimeros. Editorial *Sintesis*.
- Bach, C., Dauchy, X., Chagnon, M. C., & Etienne, S. (2012). Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: a source of controversy reviewed. *Water Research*, 46(3), 571-583.
- Baggiani, C., Anfossi, L., & Giovannoli, C. (2007). Solid phase extraction of food contaminants using molecular imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, 591(1), 29-39.
- Ballesteros-Gómez, A., Rubio, S., & Pérez-Bendito, D. (2009). Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. *Journal of Chromatography A*, 1216(3), 449-469.
- Ballesteros-Gómez, A., Ruiz, F. J., Rubio, S., & Pérez-Bendito, D. (2007). Determination of bisphenols A and F and their diglycidyl ethers in wastewater and

---

river water by coacervative extraction and liquid chromatography–fluorimetry. *Analytica Chimica Acta*, 603(1), 51-59.

-Barceló, D., & de Alda, M. J. L. (2008). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. *Panel científicotécnico de seguimiento de la política de aguas. Fundación nueva Cultura del Agua. España.*

-Boti, V. I., Sakkas, V. A., & Albanis, T. A. (2009). An experimental design approach employing artificial neural networks for the determination of potential endocrine disruptors in food using matrix solid-phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 1216(9), 1296-1304.

-Cela-Pérez, M. C., Castro-López, M. M., Lasagabáster-Latorre, A., López-Vilariño, J. M., González-Rodríguez, M. V., & Barral-Losada, L. F. (2011). Synthesis and characterization of bisphenol-A imprinted polymer as a selective recognition receptor. *Analytica Chimica Acta*, 706(2), 275-284.

-Cela-Pérez, M. C., López-Vilariño, J. M., & González-Rodríguez, M. V. (2011, October). Impact of functional cross-linker on recognition properties of a Bisphenol-A imprinted polymer film for coating a Quartz Crystal Microbalance. In *Sensors, 2011 IEEE* (pp. 1740-1743). IEEE.

-Cela-Pérez, M. C., López-Vilariño, J. M., & González-Rodríguez, M. V. (2011, October). Impact of functional cross-linker on recognition properties of a Bisphenol-A imprinted polymer film for coating a Quartz Crystal Microbalance. In *Sensors, 2011 IEEE* (pp. 1740-1743). IEEE.

-Cela-Pérez, M. C. (2015). Síntesis y caracterización de polímeros de impresión molecular para aplicaciones analíticas. (*Doctoral dissertation*, Universidad da Coruña).

-Chen, L., Xu, S., & Li, J. (2011). Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications. *Chemical Society Reviews*, 40(5), 2922-2942.

-Chichizola, C., Scaglia, H., Franconi, C., Ludueña, B., Mastandrea, C., & Pelayo, A. G. (2009). Disruptores endócrinos y el sistema reproductivo. *Bioquímica y Patología Clínica*, 73(3), 9-23.

-Cormack, P. A., & Elorza, A. Z. (2004). Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. *Journal of Chromatography B*, 804(1), 173-182.

-Daughton, C. G. (2004). Non-regulated water contaminants: emerging research. *Environmental Impact Assessment Review*, 24(7), 711-732.

**-Efsa.europa.eu**

-Fan, Q., & Xiao, C. (2008). Effects of crosslinking density on structure and properties of interpenetrating polymer networks from polyurethane and nitroguar gum. *Polymer Composites*, 29(7), 758-767.

-Fernández, A. M. C., Jiménez, M. R., Gallego, Á. J., Navarro, I. M. M., & Sánchez, S. P. (2012). Tóxicos formados durante el procesado, preparación y almacenamiento de los alimentos: Toxicología alimentaria. *Ediciones Díaz de Santos*, 495-497.

-Gil, M. J., Soto, A. M., Usma, J. I., & Gutiérrez, O. D. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción Limpia*, 7(2), 52-73.

-González, A. F., & Guardia, L. (2007, April). Reconocimiento molecular mediante materiales biomiméticos: impresión molecular. *In Anales de Química* (Vol. 103, No. 2).

-González, G. L., Pérez, R. L. T., Sánchez, C. H., Armendáriz, C. R., Gironés, C. R., Fernández, Á. J. G., Ojeda, B. A & de la Torre, A. H. (2011). Toxicidad del Bisfenol A (BPA): migración desde los envases a los alimentos. *Salud Pública, Dezembro*.

-He, C., Long, Y., Pan, J., Li, K., & Liu, F. (2007). Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of analytes from real samples. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 133-150.

- Holland, N., Frisby, J., Owens, E., Hughes, H., Duggan, P., & McLoughlin, P. (2010). The influence of polymer morphology on the performance of molecularly imprinted polymers. *Polymer*, 51(7), 1578-1584.
- Jiang, X., Zhao, C., Jiang, N., Zhang, H., & Liu, M. (2008). Selective solid-phase extraction using molecular imprinted polymer for the analysis of diethylstilbestrol. *Food Chemistry*, 108(3), 1061-1067.
- Kang, J. H., Kondo, F., & Katayama, Y. (2006). Human exposure to bisphenol A. *Toxicology*, 226(2), 79-89
- Keri, R. A., Ho, S. M., Hunt, P. A., Knudsen, K. E., Soto, A. M., & Prins, G. S. (2007). An evaluation of evidence for the carcinogenic activity of bisphenol A. *Reproductive Toxicology*, 24(2), 240-252.
- MacLusky, N. J., Hajszan, T., & LERANTH, C. (2005). The environmental estrogen bisphenol A inhibits estradiol-induced hippocampal synaptogenesis. *Environmental Health Perspectives*, 675-679.
- Maffini, M. V., Rubin, B. S., Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (2006). Endocrine disruptors and reproductive health: the case of bisphenol-A. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 254, 179-186.
- Martin-Esteban, A., & Luis Tadeo, J. (2006). Selective molecularly imprinted polymer obtained from a combinatorial library for the extraction of bisphenol A. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 9(10), 747-751.
- Matthews JB, Twomey K, Zacharewski TR. (2001). In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chem Res Toxicol* 14:149–57.
- Mozo, D. R. (2012). Disruptores endocrinos. *El Ecologista*, (74), 36-37.
- Munguia-Lopez, E. M., Gerardo-Lugo, S., Peralta, E., Bolumen, S., & Soto-Valdez, H. (2005). Migration of bisphenol A (BPA) from can coatings into a fatty-food simulant and tuna fish. *Food Additives and Contaminants*, 22(9), 892-898.



- Murray, A., & Örmeci, B. (2012). Application of molecularly imprinted and non-imprinted polymers for removal of emerging contaminants in water and wastewater treatment: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(9), 3820-3830.
- Murray, A., Örmeci, B., & Lai, E. P. (2016). Removal of endocrine disrupting compounds from wastewater using polymer particles. *Water Science and Technology*, 73(1), 176-181.
- Navarro, A. A. (2009). Contaminantes emergentes de los alimentos. Evaluación del riesgo toxicológico. *Revista de Toxicología*, 26(1), 21-22.
- Navarro-Villoslada, F., San Vicente, B., & Moreno-Bondi, M. C. (2004). Application of multivariate analysis to the screening of molecularly imprinted polymers for bisphenol A. *Analytica Chimica Acta*, 504(1), 149-162.
- Nicolucci, C., Rossi, S., Menale, C., Del Giudice, E. M., Perrone, L., Gallo, P., Mita G. D. & Diano, N. (2013). A high selective and sensitive liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for quantization of BPA urinary levels in children. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(28), 9139-9148.
- Lang, I. A., Galloway, T. S., Scarlett, A., Henley, W. E., Depledge, M., Wallace, R. B., & Melzer, D. (2008). Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA*, 300(11), 1303-1310.
- Lasagabáster-Latorre, A., Cela-Pérez, M. C., Fernández-Fernández, S., López-Vilariño, J. M., González-Rodríguez, M. V., Abad, M. J., & Barral-Losada, L. F. (2013). Insight into BPA–4-vinylpyridine interactions in molecularly imprinted polymers using complementary spectroscopy techniques. *Materials Chemistry and Physics*, 141(1), 461-476.

- Lasáková, M., & Jandera, P. (2009). Molecularly imprinted polymers and their application in solid phase extraction. *Journal of Separation Science*, 32(5-6), 799-812.
- Lavignac, N., Allender, C. J., & Brain, K. R. (2004). Current status of molecularly imprinted polymers as alternatives to antibodies in sorbent assays. *Analytica Chimica Acta*, 510(2), 139-145.
- Li, K., & Stöver, H. D. (1993). Synthesis of monodisperse poly (divinylbenzene) microspheres. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 31(13), 3257-3263.
- Lim, D. S., Kwack, S. J., Kim, K. B., Kim, H. S., & Lee, B. M. (2009). Potential risk of bisphenol A migration from polycarbonate containers after heating, boiling, and microwaving. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 72(21-22), 1285-1291.
- Lin, Y., Shi, Y., Jiang, M., Jin, Y., Peng, Y., Lu, B., & Dai, K. (2008). Removal of phenolic estrogen pollutants from different sources of water using molecularly imprinted polymeric microspheres. *Environmental Pollution*, 153(2), 483-491.
- Lok, C. M., & Radu, S. (2009). Application of molecularly imprinted polymers in food sample analysis—a perspective. *International Food Research Journal*, 16(2), 127-140.
- López Luna, Alberto, Estampado molecular de glucosa (2006).
- Odian, G. (2004). Principles of polymerization. John Wiley & Sons.
- Petersen, J. H., & Breindahl, T. (2000). Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae. *Food Additives & Contaminants*, 17(2), 133-141.
- Pichon, V. (2007). Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers. *Journal of Chromatography A*, 1152(1), 41-53.
- Piletsky, S. A., Mijangos, I., Guerreiro, A., Piletska, E. V., Chianella, I., Karim, K., & Turner, A. P. (2005). Polymer cookery: influence of polymerization time and different

---

initiation conditions on performance of molecularly imprinted polymers. *Macromolecules*, 38(4), 1410-1414.

-www.plasticseurope.org, Respresentada por Euromap [Último acceso el 19 de mayo del 2016].

- Pritchett J, Kuester K, Sipes I. (2002). Metabolism of bisphenol a in primary cultured hepatocytes from mice, rats, and humans. *Drug Metab Dispos*;30:1180–5.

-Pulko, I., & Krajnc, P. (2005). Influence of crosslinker and monomer ratio on bead size distribution, swelling and polymer network flexibility of 4-nitrophenylacrylate polymer supports. *Acta Chimica Slovenica*, 52(3), 215.

-Ragavan, K. V., Rastogi, N. K., & Thakur, M. S. (2013). Sensors and biosensors for analysis of bisphenol-A. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 52, 248-260.

-Ren, Y., Ma, W., Ma, J., Wen, Q., Wang, J., & Zhao, F. (2012). Synthesis and properties of bisphenol A molecular imprinted particle for selective recognition of BPA from water. *Journal of Colloid and Interface Science*, 367(1), 355-361.

-Rivas, A., Granada, A., Jiménez, M., Olea, F., & Olea, N. (2004). Exposición humana a disruptores endocrinos. *Revista Ecosistemas*, 13(3).

-Rochester, J. R. (2013). Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reproductive Toxicology*, 42, 132-155.

-Sanbe, H., & Haginaka, J. (2003). Uniformly sized molecularly imprinted polymers for bisphenol A and  $\beta$ -estradiol: retention and molecular recognition properties in hydro-organic mobile phases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30(6), 1835-1844.

-Sarafraz-Yazdi, A., & Razavi, N. (2015). Application of molecularly-imprinted polymers in solid-phase microextraction techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 73, 81-90.

- 
- Sarin, V. K., Kent, S. B., & Merrifield, R. B. (1980). Properties of swollen polymer networks. Solvation and swelling of peptide-containing resins in solid-phase peptide synthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 102(17), 5463-5470.
- Sasaki, S., Ooya, T., & Takeuchi, T. (2010). Highly selective bisphenol A—imprinted polymers prepared by atom transfer radical polymerization. *Polymer Chemistry*, 1(10), 1684-1688.
- Sax, L. (2010). Polyethylene terephthalate may yield endocrine disruptors. *Environmental Health Perspectives*, 118(4), 445.
- Shaw, I. (Ed.). (2009). Endocrine-disrupting chemicals in food. *Elsevier*.
- Sellergren, B. (Ed.). (2000). Molecularly imprinted polymers: man-made mimics of antibodies and their application in analytical chemistry (Vol. 23). *Elsevier*.
- Shelby, M. D. (Ed.). (2010). Potential Human Reproductive and Development Effects of Bisphenol A. *DIANE Publishing*.
- Snyder, R. w., Maness, S. C., Gaido, K. W. *et al.* (2000). Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 168, 225-234
- Spivak, D. A. (2005). Optimization, evaluation, and characterization of molecularly imprinted polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(12), 1779-1794.
- Stowell, C., Barvian, K., Young, P., et al. (2006). A role for sulfation-desulfation in the uptake of bisphenol A into breast tumor cell. *Chem Biol*. 13, 891-897.
- Stuart, M., Lapworth, D., Crane, E., & Hart, A. (2012). Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of the Total Environment*, 416, 1-21.
- Sungur, Ş., Köroğlu, M., & Özkan, A. (2014). Determination of bisphenol a migrating from canned food and beverages in markets. *Food chemistry*, 142, 87-91.
- Tarumi, H., Imazato, S., Narimatsu, M., Matsuo, M., & Ebisu, S. (2000). Estrogenicity of fissure sealants and adhesive resins determined by reporter gene assay. *Journal of Dental Research*, 79(11), 1838-1843.
- 
-

- 
- Thommes, M. (2010). Physical adsorption characterization of nanoporous materials. *Chemie Ingenieur Technik*, 82(7), 1059-1073.
- Turner, N. W., Piletska, E. V., Karim, K., Whitcombe, M., Malecha, M., Magan, N., & Piletsky, S. A. (2004). Effect of the solvent on recognition properties of molecularly imprinted polymer specific for ochratoxin A. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(6), 1060-1067.
- Uzuriaga-Sánchez, R. J., Khan, S., Wong, A., Picasso, G., Pividori, M. I., & Sotomayor, M. D. P. T. (2016). Magnetically separable polymer (Mag-MIP) for selective analysis of biotin in food samples. *Food Chemistry*, 190, 460-467.
- Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., & Welshons, W. V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*, 24(2), 139-177.
- Vandermeersch, G., Lourenço, H. M., Alvarez-Muñoz, D., Cunha, S., Diogène, J., Cano-Sancho, G., Sloth, J., Kwadijk, C., Barcelo, D., Allegaert, W., Bekaert, K., Fernandes, J.O., Marques, C., & Robben J. (2015). Environmental contaminants of emerging concern in seafood—European database on contaminant levels. *Environmental Research*, 143, 29-45.
- Vom Saal, F. S., Akingbemi, B. T., Belcher, S. M., Birnbaum, L. S., Crain, D. A., Eriksen, M., & Ho, S. M. (2007). Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reproductive Toxicology (Elmsford, NY)*, 24(2), 131.
- Vicente, C. D. C. (2009). Polímeros de impresión molecular para la determinación de pesticidas.
- Wu, Y. T., Liu, Y. J., Gao, X., Gao, K. C., Xia, H., Luo, M. F. & Lu, B. (2015). Monitoring bisphenol A and its biodegradation in water using a fluorescent molecularly imprinted chemosensor. *Chemosphere*, 119, 515-523.
- 
-

- Xie, Y. T., Li, H. B., Wang, L., Liu, Q., Shi, Y., Zheng, H. Y., & Lu, B. (2011). Molecularly imprinted polymer microspheres enhanced biodegradation of bisphenol A by acclimated activated sludge. *Water research*, 45(3), 1189-1198.
- Xu, Z., Ding, L., Long, Y., Xu, L., Wang, L., & Xu, C. (2011). Preparation and evaluation of superparamagnetic surface molecularly imprinted polymer nanoparticles for selective extraction of bisphenol A in packed food. *Analytical Methods*, 3(8), 1737-1744.
- Xu, Z. G. (2014, May). Molecularly Imprinted Polymers for the Analysis of Environmental Estrogen Bisphenol A. *In Advanced Materials Research* (Vol. 894, pp. 143-148).
- Yan, H., & Row, K. H. (2006). Characteristic and synthetic approach of molecularly imprinted polymer. *International Journal of Molecular Sciences*, 7(5), 155-178.
- Yi, B., Kasai, H., Lee, H. S., Kang, Y., Park, J. Y., & Yang, M. (2011). Inhibition by wheat sprout (*Triticum aestivum*) juice of bisphenol A-induced oxidative stress in young women. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 724(1), 64-68.
- Zhang, J. H., Jiang, M., Zou, L., Shi, D., Mei, S. R., Zhu, Y. X., & Lu, B. (2006). Selective solid-phase extraction of bisphenol A using molecularly imprinted polymers and its application to biological and environmental samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385(4), 780-786.