



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“Extracción de contaminantes emergentes en fórmula infantil
utilizando dióxido de carbono en estado supercrítico”**

T E S I S

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

Q.A. Edna Yuzi Torres Torres

**Dr. Roeb García Arrazola
Conjunto E, Facultad de Química**

Ciudad de México. Septiembre, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“Extracción de contaminantes emergentes en fórmula infantil
utilizando dióxido de carbono en estado supercrítico”**

T E S I S

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

Q.A. Edna Yuzi Torres Torres

Dr. Roeb García Arrazola

Conjunto E, Facultad de Química



Ciudad de México. Septiembre, 2018

H. JURADO

Presidente	Dra. Laura Patricia Martínez Padilla	FES-Cuautitlán, UNAM
Vocal	Dra. Martha Patricia García Camacho	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. María del Pilar Cañizares Macías	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. María Isabel Hernández Ochoa	CINVESTAV, IPN
Secretario	Dr. Miquel Gimeno Seco	Facultad de Química, UNAM

La investigación descrita en este manuscrito fue llevada a cabo en el Laboratorio 314 del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E, Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Bajo la asesoría del Dr. Roeb García Arrazola.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Por la beca otorgada para la realización de mis estudios de Maestría (No. de Becario: 604154, CVU: 771620).

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Por formarme como profesionista y como ser humano. Por proporcionarme todas las herramientas para mi crecimiento y aprendizaje.

A los miembros del H. Jurado

Por sus valiosas aportaciones para la mejora de este trabajo.

Al Dr. Roeb García Arrazola

Por la confianza, el apoyo y los consejos para la realización de este trabajo.

A mis padres, mis hermanas y hermano

Por siempre confiar en mí. Por su extraordinario apoyo en cada momento y en cada decisión, por su amor incondicional. Porque de cada uno he aprendido grandes cosas y me han dado grandes consejos. Gracias por siempre estar ahí.

Al Dr. Miquel Gimeno Seco

Por el apoyo durante la realización de este trabajo y por permitirme trabajar en el Laboratorio 314.

A la Dra. Carmina Montiel Pacheco

Por los consejos y enseñanzas durante la realización de este trabajo. Por la confianza que depositó en mí.

A mis compañeros del Laboratorio 314

Por permitirme trabajar a su lado, por su amistad y apoyo durante mi estancia en el Laboratorio 314.

A mis amigas Paty y Cynthia

Por su valiosa amistad y su amor incondicional. Por siempre estar ahí y permitirme aprender junto a ellas.

A César R. Monzón

Por todos los momentos compartidos. Por su cariño y confianza. Por cada consejo que me alentaba y por ser el gran ser humano que es.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	III
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. ANTECEDENTES.....	5
1.1 Contaminantes emergentes	5
1.1.1 Disruptores endócrinos (EDs).....	6
1.2 Contaminantes emergentes en fórmula infantil	7
1.2.1 Di-(2-etilhexil) ftalato (DEHP).....	13
1.2.2 4-Nonilfenol.....	15
1.2.3 Bisfenol A.....	16
1.3 Técnicas de extracción de contaminantes emergentes en fórmula	18
infantil.....	18
1.4 Extracción con CO ₂ supercrítico (scCO ₂).....	22
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo general.....	28
3.2 Objetivos particulares.....	28
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
4.1 Diseño experimental	29
4.2 Materiales	30
4.2.1 Disolventes y estándares.....	30
4.2.2 Muestra.....	31

4.3 Métodos	31
4.3.1 Extracción Soxhlet	31
4.3.2 Extracción mediante CO ₂ supercrítico (scCO ₂).....	32
4.3.3 Cromatografía de líquidos.....	33
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
5.1 Determinación de los parámetros analíticos del método instrumental	34
HPLC-DAD.....	34
5.2 Determinación de DEHP, 4-NP y BPA en muestra no dopada por	36
Soxhlet / HPLC-DAD.....	36
5.3 Determinación de DEHP, 4-NP y BPA en muestras dopadas mediante	37
scCO ₂ / HPLC-DAD	37
5.4 Determinación de DEHP, 4-NP y BPA por extracción simultánea	44
mediante scCO ₂ / HPLC-DAD.....	44
5.4.1 Extracción en muestra dopada	44
5.4.2 Extracción en muestra no dopada	45
6. CONCLUSIONES.....	51
7. RECOMENDACIONES.....	52
REFERENCIAS.....	53
ANEXO.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
APs	Alquilfenoles
BPA	Bisfenol A
DEHP	di-(2-etilhexil) ftalato
EDLV	Extracción por destilación líquido/vapor
EDs	Disruptores endócrinos
EFS	Extracción en fase sólida
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ELL	Extracción líquido/líquido
ELP	Extracción con líquido presurizado
EMFS	Extracción magnética en fase sólida
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
CG-MS	Cromatografía de gases acoplado a detector de masas
GRAS	<i>Generally recognized as safe</i>
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HPLC-DAD	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a detector con arreglo de diodos
HPLC-MS	Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a detector de masas
IMPI	Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial
Kow	Coefficiente de partición octanol-agua

LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
MEHP	Mono-(2-etilhexil) ftalato
MEHHP	mono-(2-etil-5-hidroxihexil) ftalato
MELL	micro-extracción líquido/líquido
MeOH	Metanol
MEOHP	mono-(2-etil-5-oxohexil) ftalato
4-NP	4-Nonilfenol
NPEO	Nonilfenol polietoxilado
NPs	Nonilfenol e isómeros
OPs	Octilfenol e isómeros
PIM	Polímero de impresión molecular
PTFE	Politetrafluoroetileno
PVC	Cloruro de polivinilo
scCO ₂	Dióxido de carbono en estado supercrítico
TDI	Ingesta diaria tolerable
TDI-t	Ingesta diaria tolerable-temporal
TNPP	tris-(nonilfenol)-fosfato

RESUMEN

Actualmente, en la extracción de contaminantes emergentes, una de las principales tareas es buscar métodos que permitan minimizar el uso de disolventes orgánicos. La extracción con fluidos supercríticos es una tecnología verde y ambientalmente limpia, ya que minimiza el uso de disolventes orgánicos e incluso puede llevarse a cabo sin el uso de los mismos. En la presente investigación, se evaluó la viabilidad de la extracción de los contaminantes emergentes di-(2-etilhexil) ftalato (DEHP), 4-nonilfenol (4-NP) y bisfenol A (BPA) en fórmula infantil utilizando dióxido de carbono en estado supercrítico (scCO₂) (registro de patente en trámite IMPI MX/a/2017/004080, anexo A). La densidad de scCO₂, el tiempo de extracción y el uso de co-solvente, fueron las variables de proceso evaluadas. Las mejores condiciones para la extracción simultánea de estos tres compuestos fueron: densidad de scCO₂ 0.85 g/mL, tiempo de extracción 40 minutos y 5% de metanol como co-solvente. La extracción se llevó a cabo en lote (fase estática). Las muestras fueron analizadas mediante HPLC-DAD. El método fue aplicado para el análisis de una muestra no dopada, en la cual, sólo DEHP y BPA estuvieron presentes, con una concentración de 2.88 ± 0.24 y 0.07 ± 0.001 µg/g, respectivamente. Paralelo a esto, la muestra fue tratada a través de la técnica convencional Soxhlet, obteniendo una concentración de DEHP y BPA de 1.57 ± 0.06 y 0.40 ± 0.05 µg/g, respectivamente. Por lo anterior, se puede inferir que el método de extracción por scCO₂ proporciona mejores resultados para la extracción de DEHP que la técnica convencional Soxhlet; sin embargo, para BPA no se obtuvieron resultados favorables utilizando el método desarrollado en esta investigación.

INTRODUCCIÓN

Los contaminantes emergentes son compuestos químicos de distinto origen y naturaleza (plastificantes, productos de cuidado personal, fármacos, pinturas, tensoactivos, lubricantes, etc.) que por varias décadas han pasado inadvertidos los posibles efectos negativos que pueden generar en las especies silvestres y en la salud humana. Dentro de los contaminantes emergentes se encuentran los disruptores endócrinos (EDs, por sus siglas en inglés), los cuales son compuestos exógenos que alteran el sistema endócrino a través de la modificación de procesos de síntesis, secreción, transporte o reconocimiento de hormonas, propiciando enfermedades tales como obesidad, autismo, dimorfismo sexual, cáncer de mama, entre otros (Cirillo *et al.*, 2015).

La presente investigación se enfoca en el análisis de un grupo selecto de EDs ampliamente distribuidos en el ambiente y usados como monómeros o aditivos en la industria de empaques para alimentos: DEHP, 4-NP y BPA. Este grupo es de los más importantes y ampliamente estudiados debido a su alta incidencia en matrices alimentarias y a las altas concentraciones en las que se han detectado (Cirillo *et al.*, 2015; Ferrer *et al.*, 2011; Yano *et al.*, 2015).

Los ftalatos como plastificantes en la industria de empaques para alimentos están físicamente ligados a los polímeros; la ausencia de enlaces covalentes entre la matriz plástica y los ftalatos propicia la liberación de estos compuestos hacia los alimentos (Zhang *et al.*, 2011; Schettler, 2006). La exposición a ftalatos es de especial interés debido a su relación con efectos adversos en la salud de recién nacidos y niños, especialmente diabetes, resistencia a la insulina, obesidad, alergias y asma, desordenes del espectro autista y déficit de atención (Benjamin *et al.*, 2017).

4-NP es uno de los principales alquilfenoles (APs, por sus siglas en inglés) producidos y utilizados a nivel industrial. Este compuesto es ampliamente distribuido en el ambiente como resultado de su uso como materia prima o como aditivo en las resinas epóxicas (Amiridou *et al.*, 2011); además, es usado para producir tris-

(nonilfenol)-fosfato (TNPP) el cual es empleado como estabilizante y antioxidante en la manufactura de empaques para alimentos (Fernandes *et al.*, 2008). 4-NP es clasificado como ED por los efectos que presenta sobre el sistema hormonal en seres vivos incluyendo seres humanos (Capriotti *et al.*, 2013; Kudłak y Namieśnik, 2008).

Por otro lado, BPA es usado principalmente en la fabricación de resinas epóxicas y plásticos de policarbonato. Las primeras, son utilizadas para el recubrimiento de la superficie en contacto con el alimento en latas y tapas metálicas; los plásticos de policarbonato son utilizados para empaques, botellas de plástico, biberones, recipientes para microondas, etc. (Sahki *et al.*, 2014). Varios estudios han mostrado una relación entre BPA y efectos adversos en el sistema reproductivo humano, tales como cáncer de mama y próstata, enfermedades del corazón, diabetes, efectos negativos en la función del sistema inmune y obesidad (Asimakopoulos *et al.*, 2012; Clayton *et al.*, 2011; Melzer *et al.*, 2010).

La exposición de estos compuestos en infantes es de especial interés por los efectos que pueden generar en las primeras etapas del desarrollo humano. La principal fuente de exposición a BPA y 4-NP para recién nacidos e infantes es debido a la migración de estos compuestos de los recubrimientos de latas utilizadas en el empaque de fórmulas infantiles y de biberones (Muncke, 2009); adicionalmente, las fórmulas infantiles y alimentos para bebé representan una fuente importante de DEHP (Benjamin *et al.*, 2017).

En la extracción de estos EDs en matrices alimentarias una de las principales tareas es minimizar el uso de disolventes orgánicos. Por lo anterior, es necesario el desarrollo y uso de técnicas ambientalmente limpias, que permitan reducir el consumo de disolventes orgánicos.

La extracción con fluidos supercríticos es considerada una técnica verde y ambientalmente limpia. Es una tecnología que se ha utilizado exitosamente para la extracción de compuestos de distinta naturaleza química; por ejemplo, scCO₂ es un agente de extracción selectivo para la cafeína y su uso en la obtención de café y té

descafeinados fue la primera aplicación comercial de un fluido supercrítico, seguido de la extracción de lúpulo en la industria cervecera (Housecroft y Sharpe, 2006).

Un fluido supercrítico posee propiedades de disolvente similares a las de un líquido, pero también exhibe propiedades de transporte parecidas a las de un gas; de esta manera, un fluido supercrítico no sólo puede disolver solutos, sino que también es miscible con los gases ordinarios y penetra en los poros de la matriz (Housecroft y Sharpe, 2006). El fluido supercrítico más comúnmente utilizado es CO₂, el cual es un disolvente barato, no tóxico, no inflamable, no cancerígeno, que permite la extracción selectiva de los compuestos de interés al modificar las condiciones de proceso (Jin *et. al.*, 2013).

En nuestro conocimiento, no existe el reporte de una metodología de extracción de EDs en fórmula infantil, ni en ninguna otra matriz alimentaria, asistida scCO₂. Por lo que la presente investigación representa las bases para el desarrollo una alternativa de extracción ambientalmente limpia que constituya una opción sustentable de análisis.

1. ANTECEDENTES

1.1 Contaminantes emergentes

La Agencia de Protección Ambiental (EPA, por sus siglas en inglés) de Estados Unidos define a los contaminantes emergentes como nuevos compuestos químicos sin un estatus de regulación y con un impacto en el ambiente y la salud humana que es poco entendido. Estos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en el ambiente, en matrices como: agua, aire, sedimentos y alimentos (Priac *et al.*, 2017).

Entre los contaminantes emergentes se incluyen los retardantes de llama bromados, compuestos perfluorados, fármacos y EDs como ftalatos, APs, BPA y estrógenos naturales y sintéticos (Daughton, 2011). Estos compuestos son empleados en productos tales como medicamentos humanos y veterinarios, empaques para alimentos, tensoactivos, pinturas, plastificantes, aditivos industriales en diferentes procesos, etc. (Alberto *et al.*, 2015).

Recientemente los contaminantes emergentes han despertado el interés de la comunidad científica y las agencias internacionales de salud EPA, *European Food Safety Authority* (EFSA), y *Food and Drug Administration* (FDA) debido a la frecuencia de detección en ambientes acuáticos, aguas residuales, aguas superficiales y agua destinada al consumo humano y a su toxicidad por presentar actividad biológica en concentraciones de ng/L (Mompelat *et al.*, 2009). El problema principal de los contaminantes emergentes es la falta de conocimiento de su impacto a mediano y largo plazo sobre la salud humana y el ambiente (Deblonde *et al.*, 2011).

1.1.1 Disruptores endócrinos (EDs)

La disrupción endócrina es una alteración al sistema endócrino, el cual es el responsable de controlar un gran número de procesos tales como la diferenciación de las células durante el desarrollo y formación del organismo, así como la mayoría de las funciones de tejidos y órganos a lo largo de la edad adulta (Bergman *et al.*, 2012).

En años pasados la disrupción endócrina ha atraído la atención de la comunidad científica alrededor del mundo por sus efectos negativos en la salud humana. Los EDs son definidos por la EPA como compuestos químicos exógenos que afectan la estructura o función del sistema endócrino y causan efectos adversos a la salud (Zielinska *et al.*, 2014).

Estos compuestos están presentes en el ambiente en todas partes. La exposición puede ocurrir a través de desperdicios industriales que son emitidos al ambiente y a las cadenas de alimentación, contaminación de sistemas de agua, uso indiscriminado de pesticidas, exposición por cosméticos y productos de cuidado personal, fármacos, productos plásticos y a través de la dieta (Walker y Gore, 2016).

Los EDs actúan por múltiples mecanismos para alterar el sistema endócrino, entre ellos: agonismo o antagonismo directo con las hormonas en los receptores estrogénicos, disrupción de las enzimas esteroideogénicas, disrupción en el metabolismo y síntesis de hormonas, alteración en la expresión de los receptores estrogénicos y reprogramación epigenética, entre otros (Gore *et al.*, 2015; Rissman y Adli, 2014; Diamanti *et al.*, 2009).

La exposición a EDs está ligada a una amplia variedad de efectos adversos en la salud humana, entre los que se incluyen: cáncer dependiente de hormonas (especialmente cáncer de mama y de próstata), malformaciones genitales, deficiencias cognitivas y en el neurodesarrollo, infertilidad, pubertad temprana y obesidad (Braun, 2017; Gore *et al.*, 2015; Schneider *et al.*, 2014; Diamanti *et al.*, 2009).

Los efectos de los EDs son específicos para un tejido y dependen de la sincronización, dosis y duración de la exposición. Aunque la exposición en cualquier etapa de la vida puede causar alguna alteración en el sistema endócrino, en las etapas del desarrollo (fetal e infantil) el organismo es especialmente vulnerable a estos compuestos (Walker y Gore, 2016). La exposición durante las etapas fetal e infantil, incluso a muy bajos niveles, puede inducir algunas alteraciones en el desarrollo del organismo, pero los cambios fenotípicos pueden aparecer después, durante el desarrollo, o cuando el organismo ha alcanzado la madurez (Heindel *et al.*, 2015; Vandenberg *et al.*, 2012; Barker, 2004).

La lista de estos xenobióticos es extensa; sin embargo, algunos de los principales grupos de compuestos son: ftalatos, APs, BPA, polibromodifeniléteres y estrógenos naturales y sintéticos, tales como genisteína y daidzeína, que se encuentran presentes en el ambiente y en los alimentos (Crini y Badot, 2007). Estos compuestos pueden actuar sinérgicamente produciendo efectos que no se presentan al actuar individualmente (Bergman *et al.*, 2012).

1.2 Contaminantes emergentes en fórmula infantil

Como se mencionó en la sección anterior, el grupo de los ftalatos, APs y BPA son de los principales contaminantes emergentes y EDs presentes en el ambiente y en los alimentos. Por lo anterior, con el objetivo de conocer la incidencia de estos grupos de compuestos en la matriz fórmula infantil, se realizó una búsqueda exhaustiva en la literatura científica de los estudios que reportan la presencia de estos compuestos en dicha matriz. A continuación, en las tablas 1.1, 1.2 y 1.3, se muestran los estudios que se han publicado desde el año 2000 hasta el 2018 de la determinación de ftalatos, APs y BPA en este alimento.

La Tabla 1.1 muestra los estudios publicados de la determinación de ftalatos en fórmula infantil. Los diéster del ácido ftálico, comúnmente conocidos como ftalatos, son ampliamente utilizados en la industria de plásticos desde 1930 (Gao y Wen, 2016). La aplicación más importante de este conjunto de compuestos es como

plastificantes, ya que imparten flexibilidad y maleabilidad a los polímeros (Swan, 2008); sin embargo, también se emplean como aditivos en otros productos tales como pinturas, lubricantes, adhesivos, insecticidas y cosméticos (Gao y Wen, 2016).

En los últimos años, el estudio de este grupo de compuestos como contaminantes emergentes, los posibles efectos adversos que presentan en la salud humana y su presencia en diferentes matrices (alimentos, agua, polvo, aire, aguas residuales, etc.) ha tenido un notable aumento. Esto puede corroborarse con lo presentado en la Tabla 1.1, ya que los estudios publicados en lo que va de esta década superan los publicados del año 2000 al 2010.

Dentro del grupo de los ftalatos se encuentran una gran variedad de compuestos; sin embargo, como lo expone la Tabla 1.1, DEHP, DBP (di-*n*-butil ftalato) y DiBP (diisobutil ftalato) son los más destacados en este grupo, debido a su alta producción y aplicación en la industria de empaques (Mezcua *et al.*, 2012).

En fórmula infantil, DEHP es uno de los ftalatos que se ha determinado en un mayor número de estudios, lo cual refleja su alta incidencia en esta matriz; además, varios estudios reportan su presencia en el 100% de las muestras analizadas (Del Bubba *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2016; Fromme *et al.*, 2011; Yano *et al.*, 2005) y es el compuesto que se ha determinado en mayor concentración, dentro del intervalo de 10-5080 ng/g (Cirillo *et al.*, 2015; Sorensen, 2006). En la Sección 1.2.1 se discute con mayor profundidad las razones de su alta incidencia y la importancia de este compuesto como contaminante en matrices alimentarias.

Otro grupo importante de EDs son los APs. De manera general, el término APs es utilizado para referirse a dos grupos de compuestos: 4-nonilfenol y sus isómeros (NPs), y 4-octilfenol e isómeros (OPs) (Priac *et al.*, 2017). Debido a que los APs pueden actuar como agentes emulsificantes, dispersantes, solubilizantes y humectantes, son ampliamente utilizados para la producción de diversos productos tales como tensoactivos (no iónicos y aniónicos), agentes de limpieza, desinfectantes, formulaciones de pesticidas, estabilizantes de resinas etilcelulosicas, oleorresinas, resinas fenólicas y de ésteres, productos textiles y de papel (Priac *et al.*, 2017; Amiridou *et al.*, 2011; Pernica *et al.*, 2015).

Tabla 1.1 Determinación de ftalatos en fórmula infantil. Estudios publicados del año 2000 al 2018.

Referencia	Muestras (positivas)	Extracción	Cuantificación	LD (ng/g)	Concentración encontrada en las muestras (ng/g)									
					DEHP	DBP	DiBP	BzBP	DMP	DiNP	DEP	DiDP	MEHP	MBP
Petersen y Breindahl, 2000	11 (2)	ELL + EFS	CG-MS	4-100	40-60	ND		4-10						
Casajuana y Lacorte, 2004	1 (1)	ELL + EFS	CG-MS	0.06-0.12	20.5	18.4		1.2	1.38		64-89			
Yano <i>et al.</i> , 2005	27 (27)	ELL	CG-MS	NR	34-281	15-77								
Mortensen <i>et al.</i> , 2005	10 (NE)	ELL + EFS	HPLC-MS	0.05-0.1								5.6-10	0.6-4	
Sorensen, 2006	8 (NE)	ELL + EFS	HPLC-MS	<10	10-138	<9		<4		<5		<5		
Fromme <i>et al.</i> , 2011	4 (4)	ELL + EFS	CG-MS	0.1-0.3	9.3-53.7	1.7-5.5	1.6-4.9							
Bradley <i>et al.</i> , 2013	16 (NE)	ELL	CG-MS	1-13	110		13							
Cirillo <i>et al.</i> , 2015	50 (40)*	ELL + EFS	HPLC-Fluorescencia	5-7.5	50-5080	8-1297								
Ren <i>et al.</i> , 2016	30 (30)*	ELL + EFS	CG-MS	5-100	14-183	ND-201	ND-104		ND-359					
Ge <i>et al.</i> , 2016	90 (78)*	ELL + EFS	CG-MS	5-15	24.2	38	16.6		8.7					
Del Bubba <i>et al.</i> , 2018	4 (4)	ELL + HPLC	CG-MS	0.5-4.2	18-75	6.2-11	18-25	3-5.5		2-3				

Abreviaturas: DEHP=di-(2-etilhexil) ftalato; DBP=di-*n*-butil ftalato; DiBP=diisobutil ftalato; BzBP=benzil-butyl ftalato; DMP=dimetil ftalato; DiNP=diisononil ftalato; DiDP=diisododecil ftalato; MEHP=mono(-2-etilhexil) ftalato; MBP=mono-*n*-butil ftalato; ELL=extracción líquido/líquido; EFS=extracción en fase sólida; CG-MS=cromatografía de gases acoplado a detector de masas; HPLC-MS=cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a detector de masas; NE=no especificado; ND=no detectado; LD=límite de detección del método. NR=no reportado. *Muestras positivas para DEHP.

La Tabla 1.2 presenta los estudios publicados en los que se ha determinado los principales APs: NPs y OPs, en fórmula infantil. Como puede observarse en esta tabla, NPs son los APs más estudiados, el número de estudios para NPs es el doble de los encontrados para OPs, lo cual es congruente con su elevado uso y producción. Las concentraciones en las cuales se han determinado los APs en fórmula infantil son un factor importante a destacar, el intervalo de concentración reportado se encuentra entre 1.6 - 2101 ng/g (Niu *et al.*, 2015; Guenther *et al.*, 2002) lo que representa una concentración elevada al tratarse de un EDs presente en un alimento dirigido a la población infantil.

Tabla 1.2 Determinación de APs en fórmula infantil. Estudios publicados del año 2000 al 2018.

Referencia	Muestras (positivas)	Extracción	Cuantificación	LD (ng/g)	Concentración (ng/g)	
					NPs	OPs
Guenther <i>et al.</i> , 2002	4 (4)	EDLV + HPLC	CG-MS	18	1.6-2.1	
Casajuana y Lacorte, 2004	1(1)	EFS + EFS	CG-MS	0.18	23-31	
Ferrer <i>et al.</i> , 2011	8 (4)*	ELP	HPLC-MS	3-5	70-1290	28-1550
Raecker <i>et al.</i> , 2011	2 (2)	EDLV + HPLC	CG-MS	0.9-17	9.8	616
Niu <i>et al.</i> , 2015	161 (NE)	ELL + EFS	UPLC-MS	0.003-2	196-2101	
Pastor <i>et al.</i> , 2016	6 (1)	EMFS	CG-MS	0.6-1.3	60-70	67-79

Abreviaturas. EDLV=extracción por destilación líquido/vapor; ELP=extracción con líquido presurizado; EFS=extracción en fase sólida; ELL=extracción líquido/líquido; EMFS=extracción magnética en fase sólida; CG-MS=cromatografía de gases acoplado a detector de masas; HPLC-MS=cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a detector de masas; UPLC-MS=Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución acoplado a detector de masas; LD=límite de detección del método. *Muestras positivas para NPs.

Debido a la importancia de los APs, en específico de 4-NP, como EDs y su incidencia en fórmula infantil, en la Sección 1.2.2 se describen los efectos adversos que puede generar en la salud humana.

Adicionalmente, BPA es uno de los EDs más reportados. Estudios *in vitro* han mostrado que BPA puede ocasionar la interrupción de la función celular con dosis menores a 0.23 ng/L (Vom y Hughes, 2005). BPA es uno de los principales monómeros utilizados en la manufactura de plásticos (Salgueiro *et al.*, 2018). Más de 2 millones de toneladas por año son utilizadas para la síntesis de policarbonatos, resinas epóxicas y cloruro de polivinilo (PVC) (Gattullo *et al.*, 2012); otros usos de BPA como aditivo industrial incluyen: manufactura de papel térmico, tintas de impresión, superficies de revestimiento, resinas dentales, adhesivos y pinturas (EFSA, 2006).

En la Tabla 1.3 se resumen los estudios en los que se realiza la determinación de BPA en la matriz fórmula infantil. Las concentraciones determinadas en esta matriz se encuentran dentro del intervalo de no detectado a 1290 ng/g (Niu *et al.*, 2015; O'Mahony *et al.*, 2013; Ferrer *et al.*, 2011; Goodson *et al.*, 2002). En la Sección 1.2.3 se exponen los efectos negativos sobre la salud humana y sobre algunas especies animales que pueden generarse por la exposición prolongada a BPA.

Las concentraciones máximas reportadas para DEHP, NPs y BPA en fórmula infantil son 5080 ng/g, 2101 ng/g y 1290 ng/g, respectivamente. Estos datos son consistentes con la lipoficidad que presentan estos compuestos (DEHP log Kow=7.4; 4-NP log Kow=4.5; BPA log Kow=3.7; Aparicio *et al.*, 2017). Al ser la fórmula infantil una matriz con alto contenido lipídico (25 - 30%) es congruente que la migración de los compuestos con mayor coeficiente de partición se vea favorecida.

Respecto a las técnicas utilizadas en la extracción de estos contaminantes emergentes, las más usadas son extracción en fase sólida (EFS), extracción líquido-líquido (ELL) y, una combinación de éstas dos; sin embargo, en los últimos años se han desarrollado otras técnicas, por ejemplo: polímeros de impresión molecular (PIMs), micro-extracción líquido/líquido (MELL) y extracción con líquido presurizado

(ELP), con el objetivo de aumentar la selectividad hacia estos compuestos y hacer el proceso más sencillo y aplicable. En la Sección 1.3 se detallan las técnicas publicadas hasta la fecha para la extracción de ftalatos, APs y BPA en fórmula infantil.

Tabla 1.3 Determinación de BPA en fórmula infantil. Estudios publicados del año 2000 al 2018.

Referencia	Muestras (positivas)	Extracción	Cuantificación	LD (ng/g)	Concentración (ng/g)
Goodson <i>et al.</i> , 2002	4 (4)	ELL	CG-MS	2	ND
Kuo y Ding, 2004	6 (5)	ELL + EFS	CG-MS	1	45-113
Casajuana y Lacorte, 2004	1 (1)	EFS + EFS	CG-MS	0.15	0.28
Maragou <i>et al.</i> , 2006	1 (1)	EFS	HPLC-MS	1.7	<1.7
Cao <i>et al.</i> , 2008	21 (21)	EFS	CG-MS	1	2.2-10.2
Ackerman <i>et al.</i> , 2010	298 (104)	EFS	HPLC-MS	0.15	0.48-11
Ferrer <i>et al.</i> , 2011	8 (4)	ELP	HPLC-MS	5	70-1290
Cunha <i>et al.</i> , 2011	7 (2)	MELL	CG-MS	0.06	0.23-0.40
Molina <i>et al.</i> , 2012	5 (2)	EFS	Sensor fluorométrico	0.06	1.26-6.31
O'Mahony <i>et al.</i> , 2013	4 (0)	EFS/PIM	HPLC-Fluorescencia	1.3	ND
Cirillo <i>et al.</i> , 2015	50 (30)	ELL + EFS	HPLC-Fluorescencia	3	3-375
Niu <i>et al.</i> , 2015	161 (NE)	ELL + EFS	UPLC-MS	0.03-2	ND

Abreviaturas. EFS=extracción en fase sólida; ELL=extracción líquido/líquido; MELL=micro-extracción líquido/líquido; PIM=polímero de impresión molecular; ELP=extracción con líquido presurizado; CG-MS=cromatografía de gases acoplado a detector de masas; HPLC-MS=cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a detector de masas; UPLC=*Ultra Performance Liquid Chromatography* acoplado a detector de masas; ND=no detectado.

1.2.1 Di-(2-etilhexil) ftalato (DEHP)

Los ftalatos son de los EDs más estudiados debido a su alta incidencia en el ambiente, especialmente en alimentos. La presencia de estos compuestos en los alimentos se debe principalmente a su migración del empaque del alimento (Schettler, 2006; Zhang *et al.*, 2011). Esta migración depende de la composición del alimento, concentración inicial del compuesto a migrar en el empaque, fase en contacto, tiempo y temperatura de exposición (Badeka y Kontominas 1996).

Los alimentos y bebidas son la fuente de exposición a ftalatos en humanos más importante, principalmente por su alta frecuencia de migración de los materiales de empaque (Sanchis *et al.*, 2017; Fasano *et al.*, 2012). La contribución de los alimentos como fuente de exposición a ftalatos es del 75%, otras fuentes de exposición incluyen polvo, cosméticos y perfumes, medicamentos, ropa, materiales dentales, materiales de construcción, entre otras (Das *et al.* 2014).

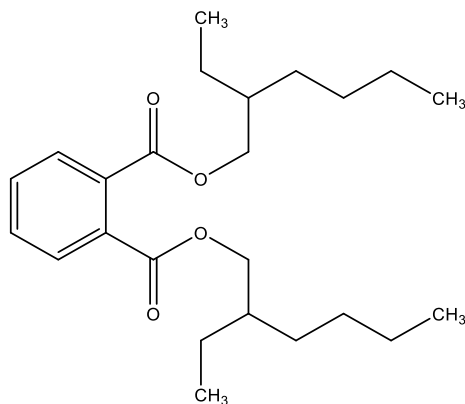


Figura 1.1 Estructura química de DEHP.

DEHP (Figura 1.1) es uno de los principales ftalatos utilizados y producidos a nivel mundial. Al ser ingerido a través de los alimentos, es fácilmente absorbido por la sangre y rápidamente hidrolizado a mono-(2-etilhexil) ftalato (MEHP), con su posterior oxidación a metabolitos secundarios, incluyendo mono-(2-etil-5-oxohexil) ftalato (MEOHP), mono-(2-etil-5-hidroxihexil) ftalato (MEHHP) y mono-(2-etil-5-

carboxilpentil) ftalato (MECPP) (Koch *et al.*, 2005); de esta manera, la naturaleza hidrofóbica de DEHP es modificada al agregar grupos polares. Finalmente, estos metabolitos secundarios son transformados a sulfo- o glucuro-conjugados para ser excretados (Kim y Park, 2014; Desvergne *et al.*, 2009; Latini *et al.*, 2004). Aunque se ha establecido que el tiempo de vida media de DEHP en el cuerpo humano es de 48 h, principalmente presente como metabolitos (Koch *et al.*, 2004), este tiempo es suficientemente largo para modificar el sistema de señalización molecular (Koch y Angerer, 2007).

El incremento en desordenes sexuales tales como endometriosis, alteración en el sistema reproductivo, pubertad temprana y problemas de fertilidad; incidencia de varios tipos de cáncer, especialmente cáncer de mama y piel; alergias y asma; sobrepeso y obesidad; resistencia a la insulina y diabetes tipo II; desorden de déficit de atención e hiperactividad; daño en el desarrollo neurológico; problemas de desarrollo del sistema neuromotriz; desordenes del espectro autista, entre otros, son los efectos negativos que se manifiestan en la salud humana por una exposición alta a ftalatos (Benjamin *et al.*, 2017).

La ingesta diaria tolerable (TDI, por sus siglas en inglés) de DEHP y sus metabolitos es de 20 µg/kg de peso corporal/día (ACC, 2016); sin embargo, varios estudios han reportado que en niños y adolescentes este valor se ha sobrepasado (Song *et al.*, 2014; Frederiksen *et al.*, 2011; Lin *et al.*, 2011) lo que representa un riesgo de salud para estos sectores de la población. Aunque los ftalatos no son los únicos factores que generan este tipo de enfermedades, pueden actuar en conjunto con otros compuestos o factores y así favorecer los problemas de salud anteriormente descritos.

1.2.2 Nonilfenol (4-NP)

El 4-NP (Figura 1.2) es ampliamente distribuido en el ambiente como resultado de su uso en la industria como materia prima y como aditivo en las resinas epóxicas, ya que mejora las propiedades de polimerización, secado y plasticidad (Amiridou *et al.*, 2011). Adicionalmente, es empleado para producir tris-(nonilfenol)-fosfato (TNPP) el cual es utilizado como estabilizante y antioxidante en la manufactura de empaques para alimentos (Fernandes *et al.*, 2008). NPs representan alrededor del 80% de la producción de APs, mientras que OPs constituyen la mayor parte del 20% restante (Dorival *et al.*, 2012).

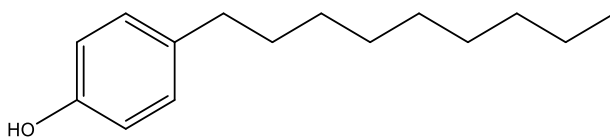


Figura 1.2 Estructura química de 4-NP.

En seres humanos la principal ruta de exposición a APs es a través del consumo de alimentos y agua contaminados (Priac *et al.*, 2017). Estos compuestos se han encontrado en una amplia variedad de alimentos para niños (Lu *et al.*, 2007) e incluso en alimentos para bebé (Raecker *et al.*, 2011).

Los alimentos pueden contener APs por la contaminación de las materias primas o por contaminación durante el procesamiento debido a trazas de detergentes utilizados en la limpieza de contenedores y maquinaria (Mezcua *et al.*, 2012). Otra posible razón, es la migración de estos compuestos de los materiales de empaque (Pastor *et al.*, 2016).

Cuando los APs entran en el torrente sanguíneo el siguiente paso es su biotransformación por glucuronación y sulfatación (Asimakopoulos *et al.*, 2012). Con esta transformación su potencial estrogénico es desactivado y los compuestos

conjugados son excretados a través de la orina (Shangari *et al.*, 2005). Se ha reportado que la vida media de eliminación en el cuerpo humano de estos compuestos es menor de 3 h (Müller *et al.*, 1998); sin embargo, estudios sugieren que la exposición crónica a APs de productos alimenticios, especialmente NPs, puede causar bioacumulación en el cuerpo humano (Suen *et al.*, 2012).

Varios autores han categorizado a 4-NPs como EDs por su capacidad para unirse a los receptores estrogénicos ER α y ER β , e imitar la acción de las hormonas naturales (por ejemplo, 17 β -estradiol) (Priac *et al.*, 2017; Suen *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2008; Mueller y Korach, 2001; Kuiper *et al.*, 1998). Además, estudios *in vivo* e *in vitro* proponen que la exposición a APs puede favorecer la aparición y desarrollo de enfermedades alérgicas (Kuo *et al.* 2011; Hung *et al.*, 2010; Narita *et al.*, 2007; Kato *et al.*, 2006).

Mientras los efectos estrogénicos de los APs requieren ser estudiados a mayor profundidad, desde el año 2000 estos compuestos fueron incluidos dentro de la lista de sustancias peligrosas prioritarias de la Unión Europea (Comisión Directiva 2000/60/EC, 2000), por lo que ahora su uso es restringido (Priac *et al.*, 2017; Asimakopoulos *et al.*, 2012).

1.2.3 Bisfenol A (BPA)

Uno de los EDs más estudiados es BPA (Figura 1.3). El principal uso de este compuesto es en la fabricación de resinas epóxicas y plásticos de policarbonato, debido a las ventajas en términos de resistencia térmica y elasticidad (Giulivo *et al.*, 2016). Las resinas epóxicas son utilizadas para el recubrimiento de la superficie en contacto con el alimento en latas y tapas metálicas; los plásticos de policarbonato son utilizados para empaques y botellas de plástico, biberones y recipientes para microondas (Sahki *et al.*, 2014). Es muy documentado que la polimerización de la resina epoxi puede no estar completa, lo que significa que una cierta cantidad de monómero residual logre migrar del envase al alimento (Errico *et al.*, 2014).

La ingestión es la principal vía de exposición de BPA en humanos (Chen *et al.*, 2010) y los alimentos enlatados representan la principal fuente de este compuesto; por lo anterior, en 2015 la EFSA estableció una ingesta diaria tolerable temporal (TDI-t) de 4 µg/kg peso corporal/día (EFSA, 2015).

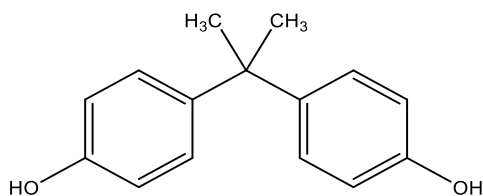


Figura 1.3 Estructura química de BPA.

En seres humanos el BPA es metabolizado principalmente a través del proceso de glucuronación (Volkel *et al.*, 2002) y excretado a través de la bilis y la vena hepática (Inoue *et al.*, 2001; Inoue *et al.*, 2005). Otra modificación de BPA es la sulfatación, este proceso reduce drásticamente su absorción y su actividad estrogénica; sin embargo, la sulfatación del BPA es reversible, por lo que no se tiene una garantía de la inactivación del BPA por esta vía (Stowell *et al.*, 2006).

Observaciones clínicas y estudios epidemiológicos muestran una correlación entre BPA y efectos en el sistema reproductivo humano, cáncer de mama y próstata, enfermedades del corazón, diabetes, elevación de los niveles de algunas enzimas séricas en el hígado, efectos negativos en la función del sistema inmune y síndromes de metabolismo (por ejemplo, obesidad) (Asimakopoulos *et al.*, 2012; Clayton *et al.*, 2011; Melzer *et al.*, 2010).

Estudios en modelos murinos han mostrado que BPA puede sensibilizar el tejido mamario a la acción de las hormonas, siendo esto crítico para la posibilidad de desarrollar cáncer de mama (Vandenberg *et al.*, 2007). La exposición prenatal de BPA incrementa la proliferación del epitelio en el útero, estos cambios en el tejido son asociados con la aparición de lesiones pre-cancerígenas y cancerígenas en el

oviducto, útero y vagina (Steinmetz *et al.*, 1998; Newbold *et al.*, 2009). En modelos de ratas BPA a bajas concentraciones puede revertir las diferencias de dimorfismo sexual en el cerebro (Kubo *et al.*, 2001; Kubo *et al.*, 2003) y es capaz de alterar la expresión o efecto de varios neurotransmisores lo que se relaciona con enfermedades tales como el autismo (Miyatake *et al.*, 2006). BPA disminuye la producción de acetilcolina en el hipotálamo, posiblemente causando discapacidad en la memoria (Miyagawa *et al.*, 2007). La exposición de BPA ha mostrado en modelos de roedores asociación con el incremento en el peso corporal, un mecanismo posiblemente relacionado que conduce a la acumulación de triglicéridos es el decremento en la producción de la hormona adiponectina (Hugo *et al.*, 2008).

Los efectos adversos que causa BPA como ED son controversiales para la población humana principalmente por dos razones; en primer lugar y más importante, pueden encontrarse datos contradictorios en los estudios de exposición; y, en segundo lugar, encontrar correlaciones en modelos animales con el efecto potencial en los seres humanos presenta un grado de incertidumbre (Vandenberg *et al.*, 2010 a, b).

De cualquier forma, la Unión Europea prohíbe el uso de BPA en biberones (Comisión Directiva 2011/8/EU) y juguetes para niños (Comisión Directiva 2014/81/EU) por su posible riesgo para la salud de la población infantil.

1.3 Técnicas de extracción de contaminantes emergentes en fórmula infantil

Las fórmulas infantiles son productos alimenticios, sucedáneos de la leche materna, especialmente fabricados para satisfacer las necesidades fisiológicas del bebé, parcialmente o de forma total (NOM-131-SSA1-2012; Daza y Dadán, 2009).

La implementación de las fórmulas infantiles en la alimentación total o parcial del bebé es factible cuando no es posible alimentar con leche materna o cuando la leche materna resulta insuficiente. Las fórmulas infantiles cumplen con el objetivo de

promover un mejor crecimiento y desarrollo, así como prevenir deficiencias nutrimentales (Daza y Dadán, 2009).

De manera general, las fórmulas infantiles pueden clasificarse en tres categorías: fórmulas infantiles de inicio o para lactantes, éstas son apropiadas para recién nacidos hasta los primeros seis meses de vida y tienen la finalidad de cubrir el total de los requerimientos nutrimentales del bebé. Fórmulas infantiles de continuación, son dirigidas a lactantes a partir del sexto mes y para niños de corta edad, y su objetivo es colaborar con la cobertura de las necesidades nutrimentales. Por último, las fórmulas especializadas conforman un grupo integrado por diferentes sucedáneos con fines dietoterapéuticos, éstas están dirigidas a niños con trastornos, enfermedades o condiciones médicas específicas (Daza y Dadán, 2009).

La determinación de contaminantes emergentes en alimentos representa un reto, principalmente por las concentraciones a las cuales se encuentran estos compuestos, usualmente en ng/g, y la complejidad de la matriz. Las fórmulas infantiles en polvo podrían significar un reto mayor, ya que por su composición (25-30% grasa, 55-60% carbohidratos y 5-10% de proteínas) pueden favorecerse interacciones entre los macro-componentes, especialmente lípidos, y los analitos de interés. Por lo anterior, en la extracción de contaminantes emergentes de fórmula infantil, varios estudios reportan el uso de una etapa de eliminación de proteínas (O'Mahony *et al.*, 2013; Molina *et al.*, 2012; Cunha *et al.*, 2011; Cao *et al.*, 2008) o eliminación de grasa (Bradley *et al.*, 2013) previa a la extracción. Adicionalmente, esta matriz contiene una gran cantidad de vitaminas que pueden generar problemas de co-elución. A continuación, se detallan las técnicas reportadas para la extracción de DEHP, 4-NP y BPA en fórmula infantil.

La extracción líquido/líquido (ELL) seguido de una etapa de extracción en fase sólida (EFS) es la metodología más utilizada en la extracción de DEHP, 4-NP y BPA en fórmula infantil (Figura 1.4), principalmente por su eficiencia al obtener, en la mayoría de los casos, porcentajes de recuperación mayores al 80%.

La EFS, la cual es una de las principales técnicas de extracción de contaminantes emergentes en alimentos (Ballesteros *et al.*, 2009), se basa en la afinidad del analito

de interés por la fase estacionaria (adsorbente) (Asimakopoulos *et al.*, 2012). Florisil® y octadesilado (C₁₈) son los principales adsorbentes empleados. Esta técnica permite la reducción de compuestos que pueden interferir con el análisis y concentra el compuesto de interés (Salgueiro *et al.*, 2018). Las principales ventajas de esta técnica son su simplicidad, reproducibilidad y amplio intervalo de aplicación (Asimakopoulos *et al.*, 2012); sin embargo, para matrices con alto contenido de lípidos y proteínas, como lo es la fórmula infantil, esta técnica requiere una etapa de remoción de estos macro-componentes previa a la extracción (Ballesteros *et al.*, 2009). Esto último, la generación de residuos (principalmente cartuchos de extracción) y el consumo de disolventes orgánicos tales como diclorometano, hexano, acetona, acetonitrilo y metanol, son sus desventajas fundamentales.

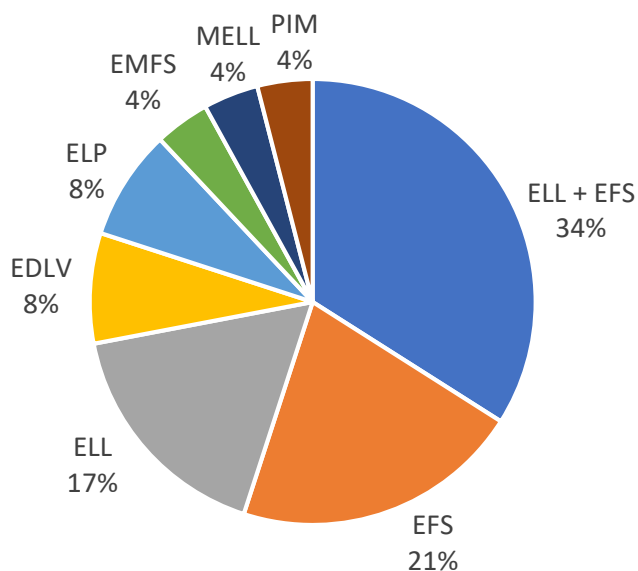


Figura 1.4 Técnicas utilizadas en la extracción de DEHP, 4-NP y BPA en fórmula infantil. ELL=extracción líquido/líquido; EFS=extracción en fase sólida; EDLV=extracción por destilación líquido/vapor; ELP=extracción con líquido presurizado; EMFS=extracción magnética en fase sólida; MELL=micro-extracción líquido/líquido; PIM=polímero de impresión molecular. Datos tomados de las Tablas 1.1, 1.2 y 1.3.

La ELL, al igual que EFS, es una de las técnicas más utilizadas. Esta es una técnica sencilla; no obstante, presenta como principal desventaja, un alto consumo de disolvente orgánicos tales como diclorometano, hexano, acetona, acetonitrilo y metanol (Salgueiro *et al.*, 2018). En esta técnica, el acetonitrilo y ácido tricloroacético son de los disolventes preferidos, ya que además de la extracción, precipitan de manera efectiva las proteínas endógenas de la matriz (Kuruto *et al.*, 2007).

Una técnica alternativa a las extracciones convencionales es la extracción con líquido presurizado (ELP). Esta técnica, al ser automatizada, permite disminuir el tiempo y etapas en el proceso de extracción, reduce el consumo de disolventes orgánicos y permite obtener porcentajes de recuperación altos; sin embargo, el costo del equipo, su limitada selectividad (al requerir etapas de limpieza adicionales a la extracción ELP para remover interferencias) y el uso de disolventes clorados, son sus principales desventajas (Salgueiro *et al.*, 2018).

Asimismo, la Figura 1.4 incluye nuevas técnicas que se han desarrollado y publicado para la extracción de DEHP, 4-NP y BPA en fórmula infantil. Estas técnicas, las cuales tienen como principal objetivo aumentar la selectividad y disminuir los problemas de interferencias, son: extracción en fase sólida utilizando polímeros de impresión molecular (EFS/PIM), extracción magnética en fase sólida (EMFS) y microextracción líquido/líquido (MELL). Las primeras dos utilizan el mismo principio de la extracción en fase sólida, pero modifican la naturaleza del adsorbente al agregar un polímero de impresión molecular o nanopartículas magnéticas selectivas al analito a extraer. Por otro lado, MELL, minimiza la cantidad de disolventes orgánicos utilizados (5-10 mL); sin embargo, emplea disolventes como ácido tricloroacético, acetonitrilo y anhídrido acético (Cuhna *et al.*, 2011).

El desarrollo de procesos químicos que involucren el uso de disolventes ambientalmente amigables probablemente sea la tarea más importante de la química verde (Plotka *et al.*, 2017). Por lo anterior, es necesario el estudio de técnicas de pre-tratamiento que utilicen disolventes “verdes” o amigables. Las

extracciones con fluidos supercrítico, cumplen con esta característica, por lo que representan una opción sustentable con gran potencial.

1.4 Extracción con CO₂ supercrítico (scCO₂)

Los disolventes ambientalmente amigables o “verdes” presentan las siguientes características: bajo impacto ambiental derivado de su producción, bajo consumo de energía en su síntesis, potencial para ser reciclado, fácil tratamiento de residuos y no representar una amenaza para la seguridad y la salud (Galuszka *et al.*, 2013). En este sentido, el agua y CO₂ cumplen con las características anteriormente descritas y son los disolventes “verdes” más conocidos. El agua es utilizada comúnmente en procesos de extracción bajo condiciones subcríticas y el CO₂ es frecuentemente empleado en procesos de extracción bajo condiciones supercríticas.

El CO₂ es el compuesto más utilizado como fluido supercrítico debido a su baja temperatura crítica (31.1 °C) y su moderada presión crítica (72.8 bar). Además, CO₂ presenta ventajas tales como disponibilidad a bajo costo, es un disolvente generalmente reconocido como seguro (GRAS, por sus siglas en inglés) por la FDA y EFSA, es fácil de recuperar, provee analitos libres de disolvente, posee alto poder de solvatación y permite extraer compuesto termolábiles o fácilmente oxidables (Jin *et al.*, 2013; Herrero *et al.*, 2010; Mendiola *et al.*, 2007). La Figura 1.5 muestra el diagrama de fases del CO₂.

No obstante, una de las principales desventajas del uso de scCO₂ en los procesos de extracción es su baja polaridad. En consecuencia, en algunas ocasiones es necesario el uso de un co-solvente, éste permite incrementar significativamente la eficiencia de extracción cuando se trabaja con especies polares. Los co-solventes más utilizados son etanol y metanol, generalmente en proporciones de 1-15% (Herrero *et al.*, 2006), los cuales presentan una toxicidad en la salud humana ligera y elevada, respectivamente. Lo anterior produce que al ser utilizados en las extracciones con scCO₂ la generación de residuos aumente.

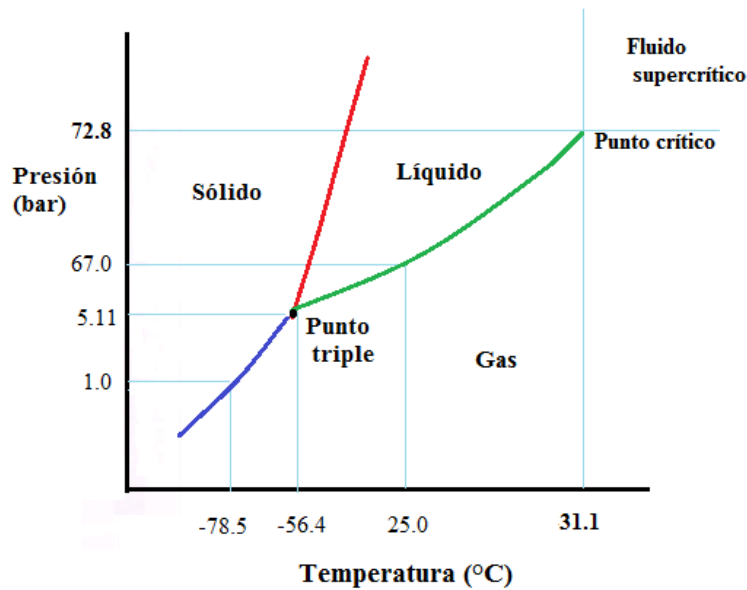


Figura 1.5 Diagrama de fases del CO₂.

Los fluidos supercríticos presentan una densidad mucho mayor que los gases típicos, pero ligeramente menor que los líquidos orgánicos; por otro lado, poseen una viscosidad mayor a la de los gases, pero mucho menor a la de los líquidos (Tabla 1.4). Estas características generan en los fluidos supercríticos propiedades únicas de solvatación y de transporte que los hacen disolventes con gran potencial para su aplicación en el área de extracciones (Sunarso y Ismadji, 2009).

Tabla 1.4 Propiedades físicas de gases, líquidos orgánicos y fluidos supercríticos. (Sunarso y Ismadji, 2009).

Fase	Densidad (g/mL)	Viscosidad (Pa·s) x 10 ³	Difusividad (cm ² /s) x 10 ⁴
Gases	~10 ⁻³	0.4-3.4	100-10,000
Líquidos orgánicos	0.6-1.1	32-251	0.05-0.2
Fluidos supercríticos	0.2-0.9	2.1-10.8	0.11-3.45

El hecho de que la densidad pueda ajustarse variando la presión y la temperatura, genera ventajas para la aplicación de estos fluidos como agentes de extracción. Utilizar un fluido supercrítico para la extracción de un material determinado a partir de una materia prima, supone el reparto del material en el líquido supercrítico, seguido de un cambio de temperatura y presión que tiene como resultado el aislamiento del soluto puro por vaporización del CO₂. Finalmente, el fluido supercrítico puede reciclarse invirtiendo el cambio en las condiciones de temperatura y presión (Housecroft y Sharpe, 2006).

La extracción utilizando fluidos supercríticos como disolventes es una alternativa a las extracciones con disolventes orgánicos ya que ofrece ventajas al ambiente, la salud, y a los procesos químicos. Los beneficios al ambiente residen en que éstos pueden sustituir el uso y demanda de disolventes orgánicos; los beneficios a la salud se deben a que el fluido supercrítico más utilizado (CO₂) es no cancerígeno, no tóxico, no mutagénico, no flamable, se presenta con alta pureza y termodinámicamente estable. En los procesos industriales el uso de fluidos supercríticos presenta ventajas como una mejor transferencia de masa, menor tiempo de extracción, fácil operación y una extracción selectiva o simultánea de componentes que es posible modificando los parámetros de proceso (Jin *et al.*, 2013; Anggrianto *et al.*, 2014).

Debido a las características anteriormente descritas, la tecnología con fluidos supercríticos ha encontrado amplias aplicaciones en varios campos, tales como alimentos, fármacos y cosméticos, por su capacidad de extraer compuestos como aceites esenciales y fármacos de matrices naturales, lípidos y compuestos bioactivos, separaciones enantioméricas, reacciones enzimáticas y extracción de contaminantes orgánicos persistentes como hidrocarburos policíclicos aromáticos o bifenilos policlorados, metales pesados y pesticidas de matrices ambientales (Potkawasyłka *et al.*, 2017).

Para la extracción de los contaminantes emergentes en los cuales se enfoca esta investigación, scCO₂ se ha empleado en varias ocasiones en las matrices polvo, lodos y aguas residuales. La Tabla 1.5 muestra los reportes publicados desde el año 1995 a la fecha, de la extracción de DEHP, 4-NP y BPA en matrices ambientales.

Tabla 1.5 Extracción de DEHP, 4-NP y BPA por scCO₂. Estudios publicados de 1995 al 2018.

Referencia	Matriz	Densidad (g/mL)	Co-solvente o Acetilación	Fase	Compuesto estudiado		
					DEHP	4-NP	BPA
Lee y Peart, 1995	Efluentes y lodos	0.79	**Acetilación	Estática-continua		X	
Kreisselmeier y Dürbeck, 1997	Sedimentos	0.79	27% MeOH	Estática-continua		X	
Lee <i>et al.</i> , 1997	Lodo	0.79	NE	Estática-continua		NPEO	
Marín <i>et al.</i> , 1998	Resinas de PVC	0.82*	NE	Continua	X		
Lin <i>et al.</i> , 1999	Lodo	0.48*	7% MeOH	Estática-continua		X	
Lee y Peart, 2000	Lodo	0.79	**Acetilación	Estática-continua			X
McDowell y Metcalfe, 2001	Aguas residuales	0.79	NE	Continua	X		
Meesters y Schöder, 2002	Lodo	0.49	25% MeOH	Estática		X	X
Clausen <i>et al.</i> , 2003	Polvo	0.80	NE	Estática-continua	X	NPEO	
Papadopoulos, 2012	Polvo	0.90	5% MeOH	Estática-continua	X		
Papadopoulos <i>et al.</i> , 2013	Polvo	0.90	5% MeOH	Estática-continua	X		

NE=no empleado. NPEO=nonilfenol polietoxilado. PVC=cloruro de polivinilo. MeOH=metanol.

*Estudios de optimización, se muestra la densidad bajo la cual se obtuvieron mejores resultados.

**Acetilación *in situ* con anhídrido acético en presencia de una base.

Como muestra la Tabla 1.5, a la fecha no existe ningún reporte de la utilización de scCO₂ para la extracción de estos contaminantes emergentes, ni de ningún otro, en matrices alimentarias; de la misma manera, los reportes publicados son limitados, lo que exhibe la escasa aplicación de los fluidos supercrítico, en el área de extracción de contaminantes emergentes. Por lo anterior, la presente investigación

representa un paso importante en el uso de $scCO_2$ como disolvente en la extracción de contaminantes emergentes en alimentos, lo que constituye una opción de análisis ambientalmente amigable.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Una de las principales características de los contaminantes emergentes es su capacidad para presentar efectos adversos en la salud humana y la vida silvestre a concentraciones muy bajas, incluso $\mu\text{g/g}$. En la población infantil, la exposición a estos compuestos es de especial interés ya que todo su sistema se encuentra en desarrollo y vulnerable a cambios. Es muy conocido que la ingesta representa una de las rutas de exposición fundamentales y que la fórmula infantil es uno de los principales alimentos en infantes. Por todo lo anterior, es necesario el desarrollo de técnicas de extracción que utilicen disolventes amigables al ambiente generando un mínimo de residuos para evaluar la presencia de contaminantes emergentes en fórmula infantil.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la viabilidad de la extracción de contaminantes emergentes en fórmula infantil utilizando scCO₂, mediante un estudio de las condiciones de operación.

3.2 Objetivos particulares

- Encontrar las condiciones de operación más favorables (densidad de scCO₂, tiempo del proceso y presencia de co-solvente) para la extracción de cada uno de los analitos en estudio: DEHP, 4-NP y BPA en muestras dopadas utilizando scCO₂.
- Evaluar la extracción simultánea de los analitos en estudio para muestras dopadas basado en una comparación cualitativa con su extracción individual.
- Evaluar la extracción simultánea de los analitos en estudio para una muestra no dopada mediante la comparación cualitativa entre las técnicas de extracción por Soxhlet y por scCO₂.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Diseño experimental

Para llevar a cabo la extracción de DEHP, 4-NP y BPA se desarrolló un diseño experimental 2^2 considerando las variables tiempo de extracción y densidad de scCO₂ (como función de la presión y temperatura).

Para la extracción de DEHP los niveles de las variables densidad y tiempo fueron elegidos de acuerdo a lo reportado por Marín *et al.* en 1998, en ese estudio se realizó la optimización de las variables de extracción con scCO₂ de ftalatos en plastificantes (Marín *et al.*, 1998). De igual forma, para la extracción de 4-NP los niveles de las variables fueron elegidos tomando en cuenta un estudio de optimización de las condiciones de extracción de 4-NP en la matriz lodo (Lin *et al.*, 1999). Finalmente, para elegir los niveles de las variables en la extracción de BPA se consideró la solubilidad de este compuesto en scCO₂ la cual fue estudiada por Jin *et al.* en 2013.

Adicionalmente, se eligieron de tal forma que, en al menos uno de los experimentos a probar, las condiciones de tiempo y densidad fueran las mismas para los tres compuestos. Esto último con el objetivo de evidenciar si es posible la extracción simultánea. La Tabla 4.1 resume los valores utilizados para cada variable en la extracción de los compuestos de interés.

Tabla 4.1 Diseño experimental 2² para la extracción de DEHP, 4-NP y BPA.

Variables en estudio: tiempo de extracción y densidad de scCO₂.

No.	4-NP		BPA		DEHP	
	t (min)	ρ (g/mL)	t (min)	ρ (g/mL)	t (min)	ρ (g/mL)
1	40	0.85	40	0.85	40	0.85
2	15	0.85	15	0.85	15	0.85
3	40	0.32	40	0.66	40	0.72
4	15	0.32	15	0.66	15	0.72

4.2 Materiales

4.2.1 Disolventes y estándares

Se adquirieron de Sigma-Aldrich (México) los estándares analíticos de DEHP y 4-NP, BPA (pureza ≥99%), acetonitrilo (pureza 99.8%) y trietilamina (pureza >99%). Se compró de REASOL (México) metanol (grado técnico). Se adquirieron de J. T. Baker (México) acetonitrilo y acetona (grado HPLC), y anhídrido acético (grado reactivo). Se obtuvo agua ultrapura (tipo 1) en el laboratorio usando un sistema Millipore (Simplicity® UV system).

Para las curvas de calibración, se prepararon soluciones *stock* disolviendo 10 mg de cada compuesto en 10 mL de acetonitrilo (grado HPLC). Éstas fueron almacenadas en frascos de vidrio ámbar a 5 °C. Se prepararon soluciones estándar a varias concentraciones por la dilución de alícuotas de las soluciones *stock*. Para las soluciones con las cuales se doparía, se diluyó 1 mg de cada compuesto en 10 mL de metanol, posteriormente se realizó una dilución 1:10. Las soluciones se almacenaron en frascos de vidrio ámbar a 5 °C. Durante todo el desarrollo

experimental se evitó cualquier contacto con materiales plásticos; por ello, se utilizaron materiales y contenedores de vidrio, así como papel aluminio para proteger estos últimos de la luz y del polvo.

4.2.2 Muestra

Se empleó una fórmula infantil de inicio, empacada en una lata de hojalata, en una presentación de 400 g y dirigida a lactantes de 0 a 6 meses de edad. Se utilizaron tres lotes de esta fórmula infantil, dos de ellos se emplearon para las pruebas con muestras dopadas, tanto en la extracción individual de cada compuesto como para la extracción simultánea. El lote restante, se empleó para la prueba final de extracción de DEHP, 4-NP y BPA en muestra no dopada. Una vez abierto, cada lote se homogeneizó manualmente con ayuda de una espátula y se conservó en frascos de vidrio ámbar.

4.3 Métodos

4.3.1 Extracción Soxhlet

Se analizaron 10 ± 0.1 g de muestra. La muestra se colocó en un cartucho de celulosa. Se utilizaron 100 mL de acetonitrilo para la extracción. La temperatura de extracción fue de 96 ± 2 °C por un periodo de 6 horas. Terminado el tiempo de extracción el disolvente se evaporó en rotavapor (BUCHI R-124). El residuo se redisolvió con 7 mL de metanol y se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se recolectó y se evaporó el disolvente a temperatura ambiente ($15-22$ °C). Finalmente, el extracto se redisolvió en 1 mL de acetonitrilo (grado HPLC) para su análisis por HPLC-DAD. La extracción se llevó a cabo por triplicado, los resultados que se presentan son el promedio de las concentraciones encontradas.

4.3.2 Extracción mediante CO₂ supercrítico (scCO₂)

Se utilizaron 10 ± 0.1 g de muestra para la experimentación. La muestra se colocó en una funda de algodón para permitir una mayor remoción del analito. Para dopar las muestras, se agregaron 200 μ L de una solución 0.1 mg/mL en metanol del compuesto a extraer y se homogenizó manualmente con ayuda de una espátula, antes de colocarlas dentro de la funda, obteniendo una concentración en la muestra dopada de 2 μ g/g. La funda se introdujo dentro del reactor. Se utilizó un reactor de 100 mL. El reactor se calentó mediante una chaqueta y termostato hasta 40 y 55 °C para la extracción de 4-NP, 55 y 70 °C para la extracción de BPA y 70 y 85 °C para la extracción de DEHP, esto con el objetivo de lograr la densidad requerida de acuerdo al diseño experimental. El CO₂ se inyectó al reactor utilizando una bomba ISCO modelo 260D *Syringe Pump*. La densidad del scCO₂ requerida se controló a través de las variables temperatura y presión del reactor. La extracción se llevó a cabo en lote (fase estática). Terminado el tiempo de extracción se disminuyó la temperatura del reactor hasta 5 °C aproximadamente, se liberó el gas y se realizaron lavados en las paredes internas del reactor con 10 mL de metanol para remover el analito. Se evaporó el disolvente hasta sequedad a temperatura ambiente (15–22 °C), posteriormente las muestras fueron redisueltas en 1.0 mL de acetonitrilo (grado HPLC) para su análisis cromatográfico. En la prueba de extracción con una muestra no dopada se utilizaron 20 ± 0.1 g de muestra, los cuales se colocaron en la funda de algodón, la extracción se llevó a cabo como se describió anteriormente.

Para las muestras en las cuales se llevó a cabo una acetilación, la cual tenía el objetivo de transformar los grupos hidroxilo a grupos éster de los compuestos 4-NP y BPA y con ello incrementar el carácter apolar y la solubilidad de éstos en scCO₂, el procedimiento realizado se describe a continuación: en el caso de los estándares, se emplearon 350, 75, 50, 25 y 10 μ L de una solución 0.1 mg/mL de BPA y 4-NP en acetona, se agregaron 200 μ L de anhídrido acético y 10 μ L de trietilamina. La reacción se llevó a cabo a 60 °C; la acetilación de las muestras se realizó con 10 ± 0.1 g de muestra los cuales se doparon con 200 μ L de solución 0.1 mg/mL del compuesto a extraer (BPA o 4-NP) en acetona, para tener una concentración en la

muestra dopada de 2 µg/g. Se agregaron 2 mL de anhídrido acético y 300 µL de trietilamina para la reacción de acetilación, se homogeneizó perfectamente con ayuda de una espátula y la mezcla se colocó en una funda de algodón para la extracción con scCO₂. Terminado el tiempo de extracción se disminuyó la temperatura hasta aproximadamente 5 °C, con ello descendió la presión hasta 40 bar, y se liberó el gas. Se realizaron lavados en las paredes internas del reactor con 10 mL de acetona. Finalmente, se evaporó el disolvente hasta sequedad a temperatura ambiente (15–22 °C) y las muestras fueron redisueltas con 1.0 mL de acetona (grado HPLC) para su análisis cromatográfico.

Las muestras a las cuales se agregó un co-solvente fueron tratadas como se describe al principio de esta sección, con la modificación de agregar 5 mL de metanol dentro del reactor previo a la colocación de la funda de algodón con la muestra.

4.3.3 Cromatografía de líquidos

Los compuestos se analizaron usando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) equipado con detector con arreglo de diodos (DAD, por sus siglas en inglés). Se utilizó una columna RP₁₈ (3.5 µm, 4.6 x 150 mm, *Symmetry Waters*) para la cuantificación de DEHP, 4-NP y BPA. La cuantificación de los compuestos se llevó a cabo de forma individual, con una fase móvil compuesta por acetonitrilo/agua en las proporciones 90:10 para DEHP, 75:25 para 4-NP y 45:55 para BPA. El tiempo de análisis fue de 20 minutos para cada muestra y la velocidad de flujo de 0.8 mL/min. La temperatura de la columna fue de 30 °C. Los compuestos se detectaron a una longitud de onda de 223 nm. Todas las muestras fueron filtradas utilizando membranas de politetrafluoroetileno (PTFE) con un tamaño de poro de 0.2 µm antes de su análisis cromatográfico.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Determinación de los parámetros analíticos del método instrumental HPLC-DAD

Para obtener las curvas de calibración de los estándares, se inyectaron al HPLC-DAD soluciones en acetonitrilo de DEHP, 4-NP y BPA a las siguientes concentraciones: 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 10.0, 20.0 y 40.0 µg/mL. La Figura 5.1 muestra las curvas de calibración obtenidas para cada analito con los correspondientes coeficientes de correlación y ecuaciones de la recta.

El Límite de Detección (LD) del método instrumental se calculó utilizando la desviación estándar (σ) de la respuesta de un conjunto de 7 estándares preparados a las concentraciones más bajas a las que el método genera respuesta (0.3, 0.5, 0.65, 0.80, 1.0, 1.3 y 1.5 µg/mL) y la pendiente de esta curva de calibración (S) de acuerdo a la Ecuación 1. De manera similar, el Límite de Cuantificación (LC) se calculó mediante la Ecuación 2.

$$LD = \frac{3.3 \sigma}{S} \quad (1)$$

$$LC = \frac{10 \sigma}{S} \quad (2)$$

La Tabla 5.1 muestra los valores de la desviación estándar (σ), las pendientes de las curvas de calibración (S), y los LD y LC obtenidos para cada compuesto.

Tabla 5.1 LD y LC del método instrumental para cada compuesto.

Compuesto	σ	S	LD (µg/mL)	LC (µg/mL)
DEHP	0.67	19.88	0.11	0.34
4-NP	2.01	49.07	0.13	0.40
BPA	1.47	79.90	0.06	0.18

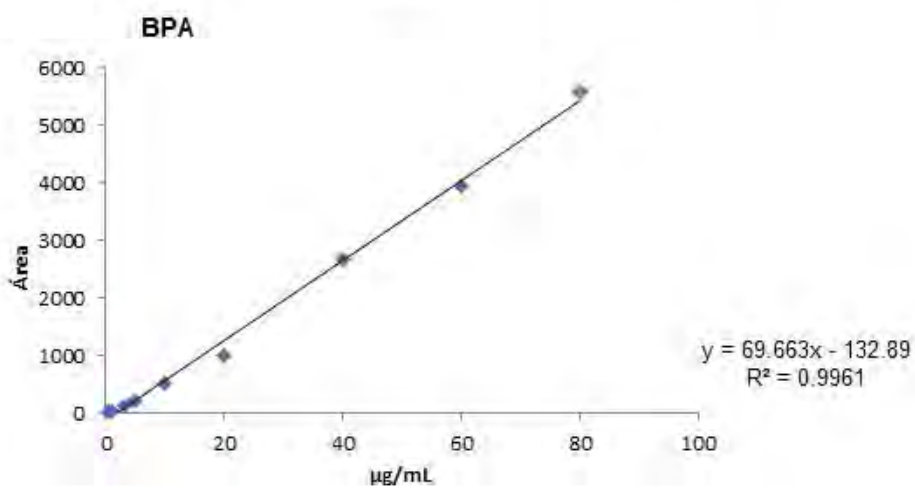
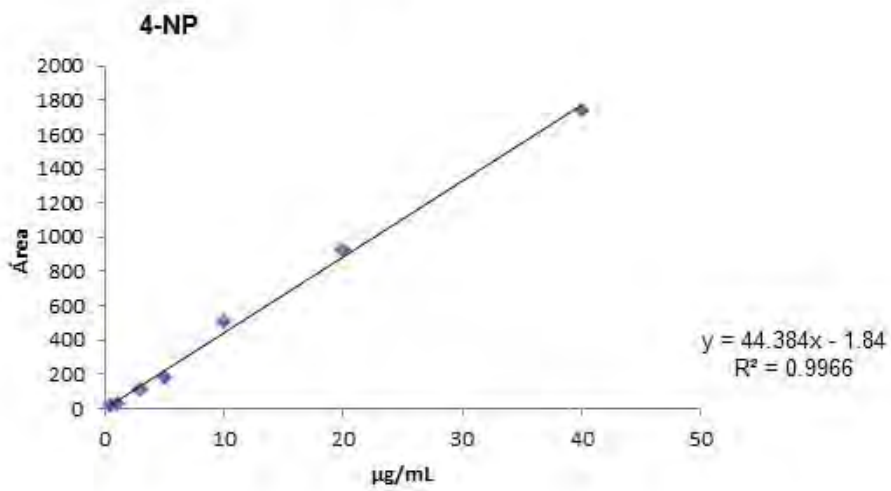
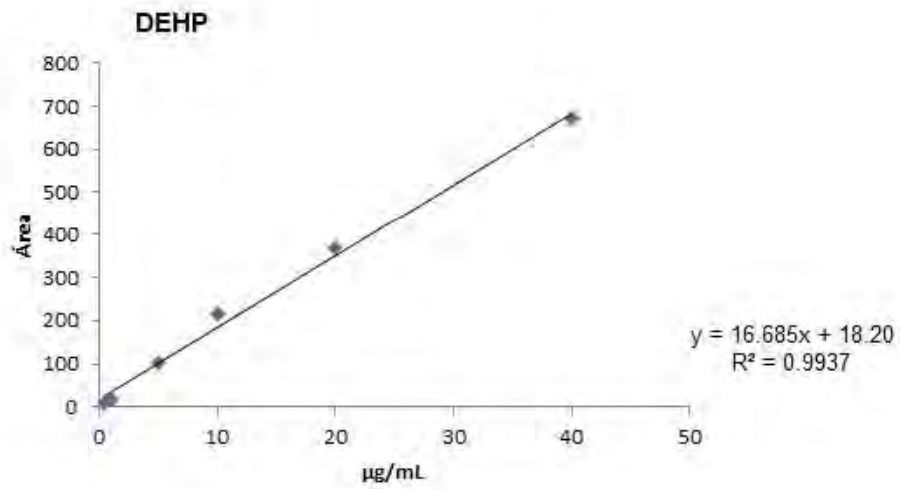


Figura 5.1 Curvas de calibración de DEHP, 4-NP y BPA obtenidas con soluciones estándar.

5.2 Determinación de DEHP, 4-NP y BPA en muestra no dopada por Soxhlet / HPLC-DAD

Las concentraciones de DEHP, 4-NP y BPA de la muestra no dopada, fueron determinadas mediante la técnica Soxhlet. Ésta es una técnica clásica, muchas veces utilizada como técnica de comparación, empleada para la extracción de compuestos orgánicos de matrices sólidas por su alta eficiencia de extracción; sin embargo, es una técnica que consume mucho tiempo y requiere volúmenes altos de disolventes orgánicos (Zuloaga *et al.*, 2012). En la Tabla 5.2 se muestran las concentraciones de DEHP, 4-NP y BPA, extraídas por la técnica Soxhlet, presentes en los lotes de fórmula infantil que se utilizaron en pruebas posteriores con scCO₂. El lote 1 se empleó para la extracción individual de DEHP, 4-NP y BPA; el lote 2 fue utilizado para la extracción simultánea de estos tres compuestos.

Tabla 5.2 Concentración de DEHP, 4-NP y BPA en fórmula infantil no dopada determinada mediante Soxhlet / HPLC-DAD (n=3).

Compuesto	Lote 1 (µg/g)	Lote 2 (µg/g)	Promedio (µg/g)
DEHP	0.87 ± 0.13	1.01 ± 0.07	0.94 ± 0.12
4-NP	ND	ND	ND
BPA	0.49 ± 0.02	0.41 ± 0.04	0.45 ± 0.05

ND: no detectado.

En la Tabla 5.2 se observa que DEHP y BPA se encuentran presentes en la muestra y en concentraciones relativamente altas. Para DEHP el valor promedio presentado en la Tabla 5.2 se encuentra 56% por arriba de 0.60 µg/g, este último valor representa la media de lo reportado en los estudios de determinación de DEHP en fórmula infantil (Tabla 1.1). De manera similar, el valor promedio de BPA presentado

en la Tabla 5.2 se encuentra 125% por arriba de 0.20 µg/g, valor de la media de lo reportado en los estudios de determinación de BPA en fórmula infantil (Tabla 1.2).

Cabe mencionar que la concentración máxima determinada de DEHP en fórmula infantil es 5.08 µg/g (Cirillo *et al.*, 2015), de 2.10 µg/g para 4-NP y sus isómeros (Niu *et al.*, 2015) y, 1.29 µg/g para BPA (Ferrer *et al.*, 2011). Estos valores representan 5 y 3 veces lo determinado en este estudio para DEHP y BPA, respectivamente.

5.3 Determinación de DEHP, 4-NP y BPA en muestras dopadas mediante scCO₂ / HPLC-DAD

Para cada compuesto se probaron cuatro diferentes condiciones, modificando las variables densidad de scCO₂ y tiempo de extracción, tal como se estableció en el diseño experimental. Con el objetivo de evaluar la concentración de cada compuesto extraída bajo cada condición, la muestra fue dopada con 2 µg/g del compuesto a extraer y se consideró la concentración propia de la muestra, extraída mediante la técnica Soxhlet (Tabla 5.2).

Las concentraciones de cada compuesto obtenida al combinar estas variables se recopilan en la Tabla 5.3. De cada compuesto se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar si existe diferencia significativa en los niveles probados para cada variable (anexo B).

De acuerdo con lo expuesto en la Tabla 5.3, para la extracción de DEHP no existe diferencia significativa entre los tiempos de extracción de 15 o 40 minutos ($p > 0.05$) ni tampoco al utilizar una densidad de 0.85 g/mL o 0.72 g/mL ($p > 0.05$). Esto es congruente con lo reportado por Marín *et al.* 1998, en donde realizan la optimización de las variables de extracción con fluidos supercríticos de ftalatos en plastificantes. En ese estudio se requirieron presiones entre 28 y 48 MPa (lo que equivale a densidades entre 0.66-0.82 g/mL) por 10 minutos, para obtener eficiencias de extracción altas en un proceso llevado a cabo en fase continua a 95 °C.

Tabla 5.3 Concentración extraída de DEHP, 4-NP y BPA mediante scCO₂ a diferentes condiciones de proceso en muestras dopadas (n=3).

Condiciones de extracción	Concentración inicial (µg/g)		Concentración extraída (µg/g)
	Agregada*	Soxhlet**	
DEHP			
0.85 g/mL-40 min	2	0.87	1.61 ± 0.14
0.85 g/mL-15 min	2	0.87	2.13 ± 0.44
0.72 g/mL-40 min	2	0.87	2.21 ± 0.24
0.72 g/mL-15 min	2	0.87	1.74 ± 0.10
4-NP			
0.85 g/mL-40 min	2	ND	0.34 ± 0.04
0.85 g/mL-15 min	2	ND	0.38 ± 0.06
0.32 g/mL-40 min	2	ND	0.04 ± 0.01
0.32 g/mL-15 min	2	ND	ND
BPA			
0.85 g/mL-40 min	2	0.49	0.25 ± 0.02
0.85 g/mL-15 min	2	0.49	0.21 ± 0.006
0.66 g/mL-40 min	2	0.49	0.26 ± 0.05
0.66 g/mL-15 min	2	0.49	ND

ND: no detectado. *Concentración con la cual se dopó. **Concentración de la muestra no dopada determinada por la técnica Soxhlet.

Asimismo, en la ANOVA para DEHP mostrada en el anexo B, se observa que la interacción entre las variables tiempo y densidad es significativa ($p < 0.05$), lo que representa que la tendencia de la respuesta (concentración extraída) depende de ambas variables.

La extracción de DEHP asistida con scCO₂ se ha llevado a cabo anteriormente en matriz polvo, a través de un proceso que combina una fase estática (0.5 g/mL) seguida de una fase continua (0.9 g/mL) obteniendo porcentajes de recuperación >80% (Papadopoulos *et al.*, 2013; Papadopoulos, 2012). En otro estudio, en matriz polvo, se logró una recuperación del 100% mediante un proceso que combina 5-10 min en fase estática previa a 30-40 min en fase continua a una densidad de 0.80 g/mL (Clausen *et al.*, 2003). Asimismo, se ha realizado en aguas residuales en fase continua (0.79 g/mL), logrando porcentajes de recuperación entre 70 y 88% (McDowell y Metcalfe, 2001).

Lo anterior sugiere que la extracción que combina una fase estática y una fase continua proporciona mejores resultados que la extracción únicamente en fase estática (realizada en esta investigación). Esto podría explicarse porque en fase continua el residuo se recupera durante el proceso de extracción, lo que ocasiona que el equilibrio del proceso se desplace hacia la generación de dicho residuo y la producción de éste se vea favorecida. En contraste, en la extracción en fase estática, el residuo se recupera al final del proceso de extracción.

En el caso de 4-NP, no fue observada diferencia significativa al utilizar 15 o 40 minutos como tiempo de extracción ($p > 0.05$); sin embargo, sí fue observada una diferencia significativa al utilizar densidades de 0.85 g/mL o 0.32 g/mL ($p < 0.05$). Al evaluar una densidad de 0.85 g/mL se obtienen concentraciones considerablemente mayores que al utilizar 0.32 g/mL debido a que al aumentar la densidad del scCO₂, aumenta la solubilidad del analito en el fluido. Para este compuesto, la interacción entre las variables tiempo y densidad no fue significativa ($p > 0.05$), lo que representa que la tendencia que tome la respuesta al modificar una de las variables, no depende del valor de la variable restante.

En 1999 en un estudio de optimización de las condiciones de extracción de 4-NP en la matriz lodo, Lin *et al.* establecieron que las condiciones óptimas son 97 bar/40 °C (0.48 g/mL) mediante un proceso que combina la extracción estática y continua. Por otro lado, otros estudios han realizado la extracción de 4-NP y de nonilfenol polietoxidado (NPEO) en las matrices lodo, sedimentos y polvo a través de una

extracción en fase estática y continua empleando densidades de 0.79 y 0.80 g/mL, y obteniendo porcentajes de recuperación >85% (Clausen *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 1997; Kreisselmeier y Dürbeck, 1997). Lo anterior expone que 4-NP y NPEO pueden extraerse tanto a densidades bajas (0.48 g/mL) como altas (0.79 y 0.80 g/mL). En esta investigación el uso de una densidad baja no proporcionó buenos resultados, probablemente porque el proceso se realizó en fase estática.

Para BPA se observó una diferencia significativa al utilizar 40 o 15 minutos de extracción ($p < 0.05$). La solubilidad de BPA en el scCO₂ es máxima y permanece aproximadamente constante después de un tiempo de reacción de 30 minutos (Jin *et al.*, 2013), lo cual podría explicar que se obtiene en la presente investigación una concentración extraída mayor cuando se trabaja a 40 minutos respecto a la obtenida a 15 minutos. Asimismo, se observa una diferencia significativa al utilizar 0.85 g/mL o 0.66 g/mL como densidad de scCO₂ ($p < 0.05$). Como ya se mencionó anteriormente, una mayor densidad de scCO₂ provoca una mayor solubilidad del analito y por consecuencia genera mayores concentraciones extraídas. En el ANOVA (anexo B) para este compuesto, la interacción entre las variables tiempo y densidad resultó significativa ($p < 0.05$) lo que representa que la tendencia de la respuesta (concentración extraída) depende de ambas variables.

Los valores de los Kow para DEHP, 4-NP y BPA son 7.4, 4.5 y 3.7, respectivamente (Aparicio *et al.*, 2017), lo cual se relaciona con la polaridad de estos compuestos. El DEHP presenta una alta afinidad por los disolventes no polares, seguido de 4-NP y, finalmente BPA. Lo anterior puede explicar la razón por la cual en la extracción con scCO₂ (no polar) se obtienen concentraciones mayores para DEHP, seguido de 4-NP y, bajas para BPA (Tabla 5.3). A pesar de que 4-NP en su estructura química presenta una cadena alifática de 9 carbonos, cuenta con un grupo hidroxilo y disponible para generar interacciones de tipo puentes de hidrógeno y dipolo inducido con el disolvente. Asimismo, pese a que BPA posee una estructura química simétrica, presenta dos grupos hidroxilo propensos a generar el tipo de interacciones anteriormente descritas.

En la extracción asistida con scCO₂, de compuestos con cierta polaridad, es muy común el uso de un co-solvente que modifique la polaridad (Papadopoulos, 2012). Uno de los co-solvente más utilizado es el metanol (Sunarso y Ismadji, 2009), y como lo muestra la Tabla 1.5 este disolvente se ha utilizado anteriormente para la extracción de DEHP, 4-NP y BPA. Por lo anterior y con el objetivo de mejorar las concentraciones extraídas para 4-NP y BPA, la polaridad de scCO₂ fue modificada al agregar 5% de metanol como co-solvente. Los experimentos se realizaron a las mejores condiciones de extracción para 4-NP y BPA mostradas en la tabla 5.3, es decir 0.85 g/mL y 40 min. La Tabla 5.4 muestra las concentraciones extraídas, comparadas con el uso de scCO₂ sin co-solvente mostrados en la Tabla 5.3.

Tabla 5.4 Concentración extraída de 4-NP y BPA al utilizar scCO₂, y scCO₂ con 5% de metanol como co-solvente en muestras dopadas (n=3).

Condiciones de extracción	Concentración inicial (µg/g)		Concentración extraída (µg/g)
	Agregada*	Soxhlet**	
4-NP			
scCO ₂	2	ND	0.34 ± 0.04
scCO ₂ + 5% de metanol	2	ND	0.83 ± 0.03
BPA			
scCO ₂	2	0.49	0.25 ± 0.02
scCO ₂ + 5% de metanol	2	0.49	0.54 ± 0.02

ND: no detectado. *Concentración con la cual se dopó. **Concentración de la muestra no dopada determinada por la técnica Soxhlet.

De acuerdo con lo expuesto en la Tabla 5.4 al modificar la polaridad de scCO₂ con 5% de metanol, para ambos compuestos (4-NP y BPA), la concentración del compuesto extraída fue incrementada significativamente. Un co-solvente, el cual es una base de Lewis, refuerza la interacción soluto disolvente, ya que incrementa la

densidad del scCO₂, promueve las interacciones químicas del tipo puentes de hidrógeno, rompe interacciones soluto-matriz y cambia la estructura inicial de la matriz, por ejemplo, generando hinchazón (Sunarso y Ismadji, 2009), permitiendo así mejorar la extracción.

Meesters y Schoder en 2002 reportaron la extracción de 4-NP y BPA con scCO₂ en fase estática, utilizando metanol como co-solvente (CO₂/metanol, 3:1) para lodos de aguas residuales. Las condiciones de extracción empleadas por estos autores fueron: 80 °C/14 MPa (0.38 g/mL) y 150 °C/30 MPa (0.49 g/mL), obteniendo en el primer caso 11% y <1% de recuperación para 4-NP y BPA, respectivamente; y 17% y <1% para el segundo caso. Con base en lo reportado por Jin *et al.* en 2013, la solubilidad de BPA a la densidad de scCO₂ de 0.41 g/mL es considerablemente baja. Lo anterior puede explicar los bajos porcentajes de recuperación obtenidos por Meesters y Schoder.

Adicionalmente, se ha realizado la extracción de 4-NP y BPA mediante scCO₂ en lodos de aguas residuales a través de un proceso de extracción y acetilación *in situ* con anhídrido acético en presencia de una base, sin co-solvente, obteniendo porcentajes de recuperación >90% (Lee y Peart, 2000; Lee y Peart, 1995). De acuerdo con lo anterior, en la presente investigación se evaluó la extracción de estos compuestos siguiendo la metodología descrita por los autores; sin embargo, no se obtuvieron resultados favorables probablemente por la complejidad que representa la matriz fórmula infantil. El proceso de extracción con fluido supercrítico depende de las características de la matriz sólida, tales como el tamaño de partícula, forma, área superficial y porosidad (Sunarso y Ismadji, 2009). Además, la extracción de 4-NP y BPA acetilados depende completamente de la reacción de acetilación llevada a cabo, de la cual no se evaluó su rendimiento.

A continuación, se presenta la Figura 5.2 la cual muestra los cromatogramas del extracto de DEHP, 4-NP y BPA para las muestras en las cuales se logró una mayor concentración de compuesto extraído.

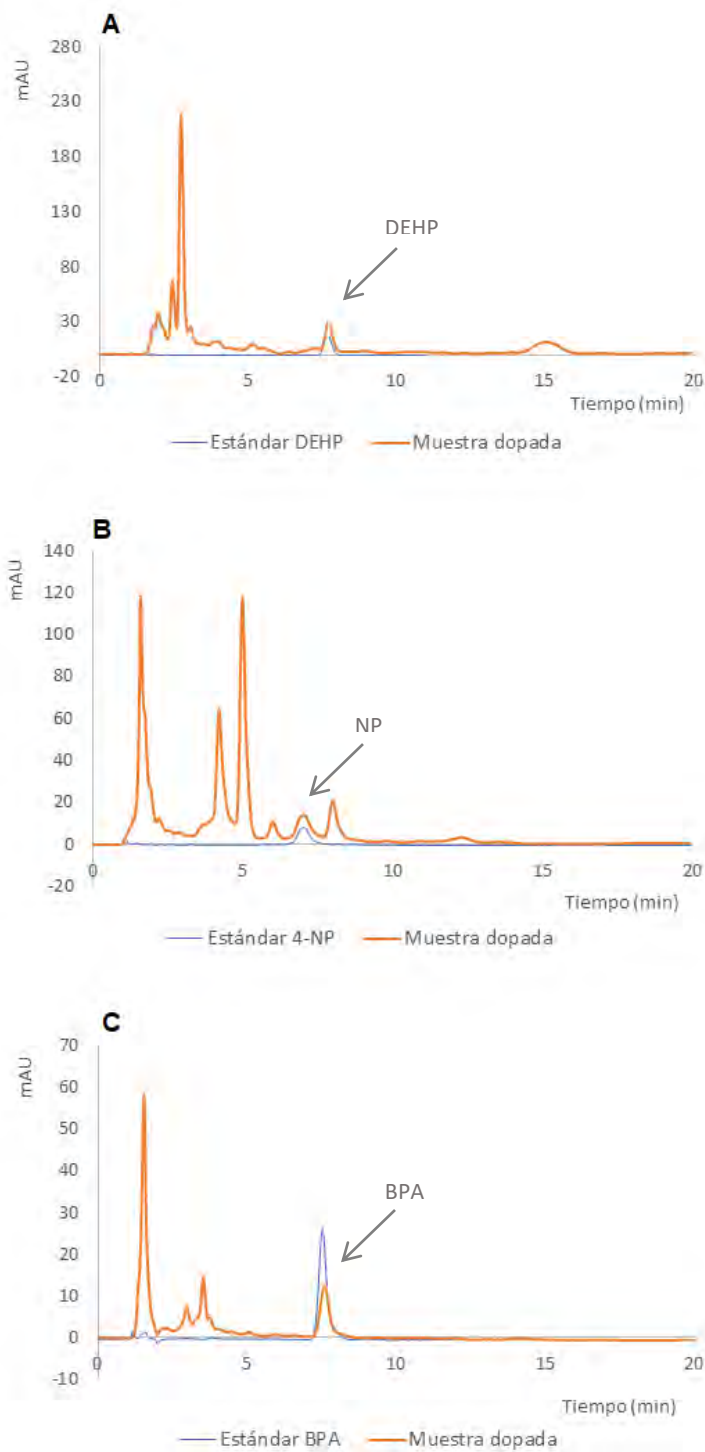


Figura 5.2 Cromatogramas del extracto de DEHP, 4-NP y BPA al utilizar scCO₂ en muestras dopadas. **A)** DEHP (0.85 g/mL-40 minutos. **B)** 4-NP (0.85 g/mL-40 minutos-5% de metanol) **C)** BPA (0.85 g/mL-40 minutos-5% de metanol). Concentración del estándar: 20 µg/mL para DEHP; 10 µg/mL para 4-NP y BPA.

5.4 Determinación de DEHP, 4-NP y BPA por extracción simultánea mediante scCO₂ / HPLC-DAD

5.4.1 Extracción en muestra dopada

Dado que las mejores condiciones de extracción para 4-NP y BPA fueron 0.85 g/mL-40 minutos-5% de metanol, se probó la extracción simultánea de estos dos compuestos, así como de DEHP, en una muestra dopada con 2 µg/g de cada componente, utilizando las condiciones de extracción anteriormente mencionadas. Las concentraciones extraídas se muestran en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5 Concentración obtenida de DEHP, 4-NP y BPA en la extracción simultánea en muestras dopadas mediante scCO₂ (n=3).

Compuesto	Concentración inicial (µg/g)		Concentración extraída (µg/g)
	Agregada*	Soxhlet**	
DEHP	2	1.01	1.76 ± 0.2
4-NP	2	ND	0.51 ± 0.08
BPA	2	0.41	0.62 ± 0.08

ND: no detectado. *Concentración con la cual se dopó. **Concentración de la muestra no dopada determinada por la técnica Soxhlet.

La Tabla 5.5 muestra que es posible la extracción simultánea de DEHP, 4-NP y BPA. Adicionalmente, para DEHP y BPA la concentración obtenida en la extracción individual (Tablas 5.3 y 5.4) se mantienen aproximadamente constante en la extracción simultánea; sin embargo, para 4-NP se observó una disminución de la concentración obtenida en la extracción simultánea. Lo anterior puede ser debido a las interferencias con DEHP, BPA u otros compuestos co-extraídos. Se ha reportado que en el análisis de muestras de leche los compuestos co-extraídos

pueden inhibir la detección del compuesto en estudio en el análisis cromatográfico o producir problemas de co-elución (Casajuana y Lacorte, 2004).

En la extracción de ftalatos mediante scCO₂ no es necesario el uso de un co-solvente, ya que estos compuestos presentan poca polaridad, lo que genera una buena solubilidad en scCO₂ (no polar) y en consecuencia altas concentraciones extraídas (McDowell y Metcalfe, 2001). Por lo anterior, en esta investigación, en la prueba sin co-solvente (Tabla 5.3), DEHP presentó las mayores concentraciones extraídas comparado con 4-NP y BPA. Al realizar el proceso empleando un co-solvente, no se generó una alteración en los resultados anteriormente descritos; sin embargo, permitió aumentar las concentraciones extraídas para 4-NP y BPA. En consecuencia, las mejores condiciones para la extracción simultánea de DEHP, 4-NP y BPA utilizando scCO₂ fueron: 0.85 g/mL-40 minutos-5% de metanol como co-solvente.

Anteriormente, se ha desarrollado la extracción simultánea de DEHP, 4-NP y BPA en fórmula infantil a través de un proceso de extracción en fase sólida (Casajuana y Lacorte, 2004). En ese estudio los autores obtienen porcentajes de recuperación >73% en muestras dopadas para la extracción de DEHP, 4-NP y BPA.

5.4.2 Extracción en muestra no dopada

Una vez establecidas las mejores condiciones para la extracción simultánea de DEHP, 4-NP y BPA mediante scCO₂ en muestras dopadas, se continuó con la extracción en una muestra no dopada. La extracción se llevó a cabo por scCO₂ y por Soxhlet, esta última como técnica de comparación. La Tabla 5.6 presenta los resultados obtenidos en estas dos pruebas. Las Figuras 5.3 y 5.4 muestra los cromatogramas obtenidos de los extractos en la cuantificación de DEHP y BPA, respectivamente.

Tabla 5.6 Extracción simultánea de DEHP, 4-NP y BPA en muestra no dopada mediante scCO₂ y Soxhlet (n=3).

Compuesto	Concentración extraída (µg/g)	
	scCO ₂	Soxhlet
DEHP	2.88 ± 0.24	1.57 ± 0.06
4-NP	ND	ND
BPA	0.07 ± 0.001	0.40 ± 0.05

ND: no detectado.

Al realizar la extracción simultánea de DEHP, 4-NP y BPA en la muestra no dopada por scCO₂ y Soxhlet, sólo DEHP y BPA estuvieron presentes. Como exhibe la Tabla 5.6, en la muestra no dopada, con el método de scCO₂ desarrollado en esta investigación se extrae una mayor concentración de DEHP que con la técnica Soxhlet; sin embargo, en el caso de BPA ocurre lo contrario, es decir, se obtiene una mayor concentración con la técnica Soxhlet que con scCO₂.

La mayor concentración extraída de DEHP respecto a la de BPA, se le atribuye a la afinidad de DEHP, el cual presenta un comportamiento principalmente apolar (log Kow 7.4), por el scCO₂ (no polar). De este modo, scCO₂ penetra en los poros de la matriz, solubiliza al DEHP y lo arrastra consigo para separarlo de la matriz. En el caso de BPA, la afinidad por scCO₂ no es tan alta (log Kow 3.7), y aunque se utilizó un co-solvente (5% de metanol) para modificar la polaridad del scCO₂, y así aumentar la afinidad de BPA hacia éste, no se obtuvieron resultados favorables.

Por otra parte, al ser considerablemente más bajos los valores de viscosidad y más altos los coeficientes de difusión de los fluidos supercríticos, respecto a los valores para los líquidos orgánicos (Tabla 1.4), genera que la transferencia de masa de solutos en extracciones con fluidos supercríticos sea más alta que en las extracciones con líquidos (Sunarso y Ismadji, 2009). Lo anterior explica por qué en la extracción de DEHP se obtienen mejores resultados utilizando la metodología con scCO₂ que con la técnica Soxhlet.

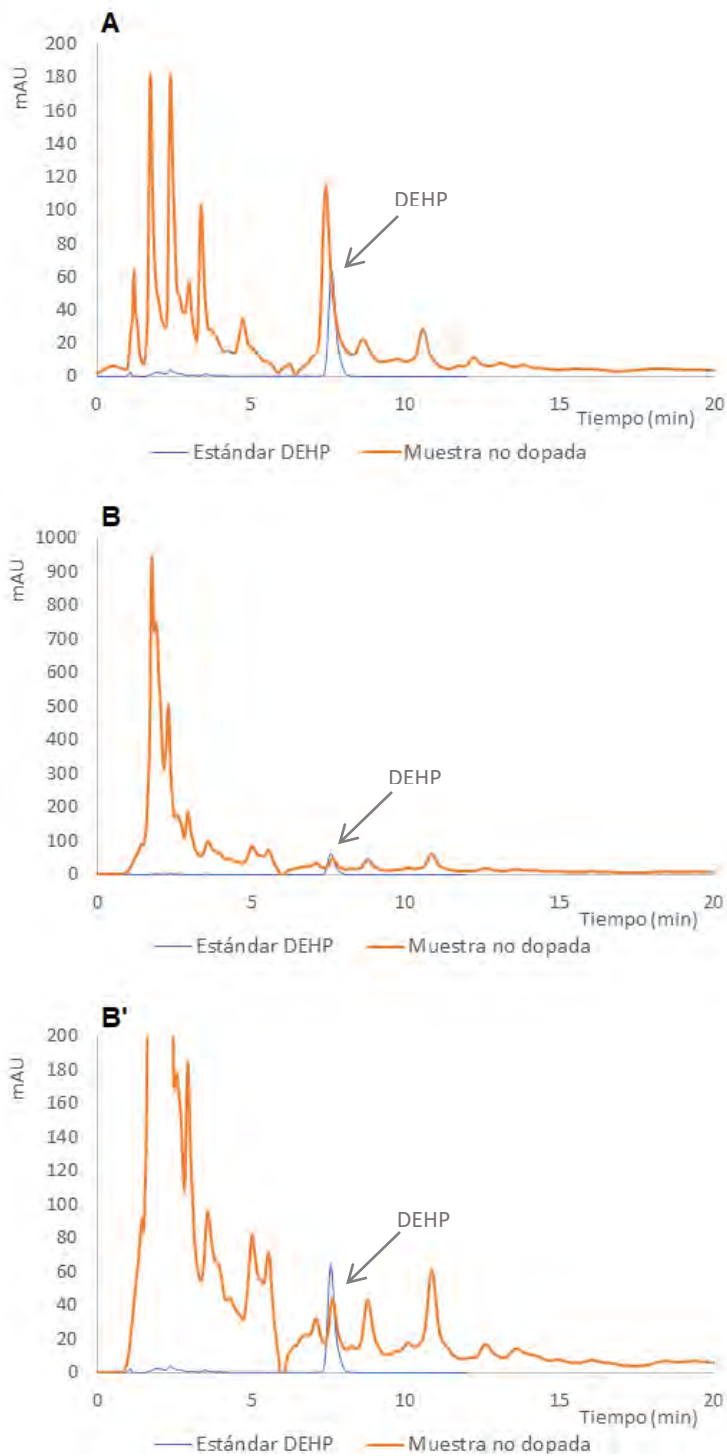


Figura 5.3 Cromatogramas del análisis de DEHP en muestra no dopada. **A)** Extracto obtenido por scCO₂. **B)** Extracto obtenido por Soxhlet. **B')** Amplificación del cromatograma B. Concentración del estándar de DEHP: 40 µg/mL.

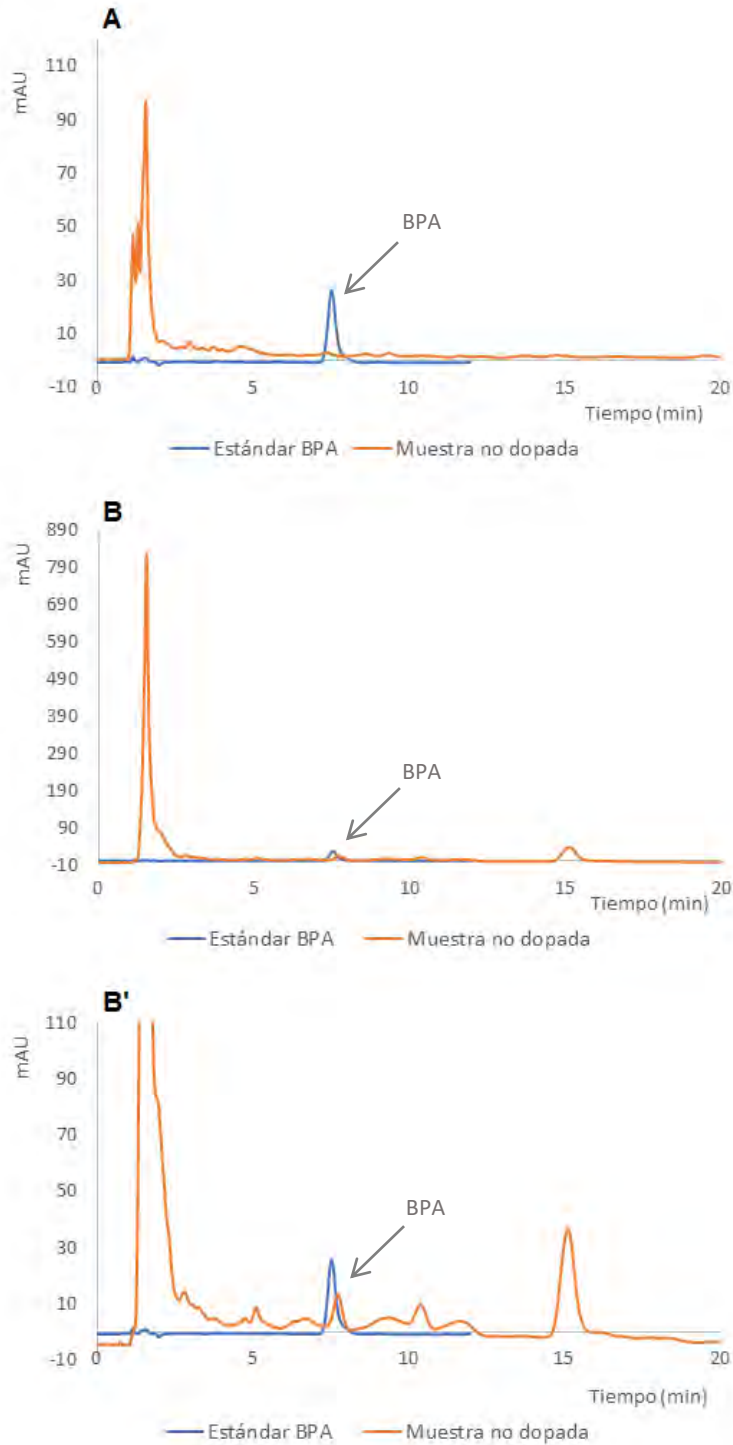


Figura 5.4 Cromatogramas del análisis de BPA en muestra no dopada. **A)** Extracto obtenido por scCO₂. **B)** Extracto obtenido por Soxhlet. **B')** Amplificación del cromatograma B. Concentración del estándar de BPA: 10 µg/mL.

Adicionalmente, como muestra la Figura 5.3 (A y B'), en la extracción utilizando $scCO_2$ se disminuye la concentración de los compuestos co-extraído, en comparación con Soxhlet, lo que genera picos más definidos e inequívocos en el cromatograma. Lo anterior exhibe el gran potencial que presenta $scCO_2$ como método de extracción de contaminantes emergentes no polares en alimentos.

No obstante, dado que en la muestra dopada (Tabla 5.5), $scCO_2$ logra extraer aproximadamente un 58% de la concentración inicial de DEHP. Es necesaria una mayor investigación para determinar las condiciones óptimas de extracción, y que los resultados en muestras dopadas y no dopadas sean consistentes.

Para BPA se observa que en una muestra dopada (Tabla 5.5) $scCO_2$ puede extraer aproximadamente el 25% de la concentración inicial y en una muestra no dopada puede extraer aproximadamente el 17%. Lo anterior refleja que para este compuesto los resultados en muestras dopadas y no dopadas son consistentes, aunque no son favorables.

DEHP es uno de los EDs más analizados en fórmula infantil, y dentro de los tres compuestos que se estudiaron en esta investigación (DEHP, 4-NP y BPA), las concentraciones encontradas de DEHP superan a las reportadas para 4-NP y BPA en la misma matriz. Varios estudios han reportado la presencia de DEHP en el 100% de las muestras analizadas (Del Bubba *et al.*, 2018; Ren *et al.*, 2016; Fromme *et al.*, 2011; Yano *et al.*, 2005), lo que confirma la alta incidencia de este compuesto en fórmula infantil. Frecuentemente, las concentraciones a las cuales se ha encontrado DEHP en esta matriz alimentaria están dentro del intervalo de 0.01-0.28 $\mu g/g$; sin embargo, Cirillo *et al.* en 2015 reportaron la presencia de DEHP en fórmula infantil líquida y en polvo en un intervalo de 0.05-5.1 $\mu g/g$. De esta forma, a pesar de que en esta investigación se encontró una alta concentración de DEHP en la muestra no dopada, esta concentración es consistente con lo reportado por Cirillo *et al.*

Finalmente, en 2011 la Comisión Europea estableció un límite de migración máximo para DEHP de 1.5 $\mu g/g$ en alimentos (CEC, 2011). De acuerdo con lo anterior, la muestra tratada en esta investigación, independientemente de la forma de extracción, $scCO_2$ o Soxhlet, supera este límite de migración (Tabla 5.6), lo que

puede representar un riesgo potencial para la población infantil. Finalmente, aunque en esta investigación sólo se estudió una muestra, la información obtenida proporciona evidencias de la presencia de contaminantes emergentes en fórmulas infantiles comercializadas en México y genera las bases para el desarrollo de investigaciones futuras en el área de extracción de contaminantes emergentes a través de $scCO_2$ no sólo en fórmula infantil, sino en cualquier alimento.

6. CONCLUSIONES

Es posible la extracción simultánea de DEHP, 4-NP y BPA en fórmula infantil utilizando scCO₂. No obstante, debido a la baja polaridad de DEHP, su extracción con scCO₂ presenta mayor viabilidad que la extracción de 4-NP y BPA, ya que, para estos dos últimos compuestos, aunque se probó su extracción con scCO₂ y metanol como co-solvente, no se obtuvieron concentraciones extraídas altas.

En una muestra no dopada, se obtuvieron concentraciones de DEHP más altas con la metodología de extracción con scCO₂ propuesta en esta investigación que con la técnica convencional Soxhlet. Lo anterior muestra el gran potencial de scCO₂ para la extracción de contaminantes emergentes apolares en matrices alimentarias.

7. RECOMENDACIONES

Realizar la extracción a través de un proceso en fase continua y el análisis instrumental con HPLC-MS, con esto se espera que aumenten las concentraciones extraídas para cada analito y se mejore la sensibilidad y selectividad del método desarrollado.

Validar la metodología y analizar un mayor número de muestras para conocer la incidencia de estos contaminantes emergentes en las fórmulas infantiles comercializadas en México.

REFERENCIAS

- ACC 2016. Biomonitoring data. [https://phthalates.americanchemistry.com/ Research Phthalates / Biomonitoring-Data](https://phthalates.americanchemistry.com/ResearchPhthalates/Biomonitoring-Data).
- Ackerman, L., Noonan, G., Heiserman, W., Roach, J., Limm, W., Begley, T. (2010). Determination of bisphenol A in U.S. infant formulas: Updated methods and concentrations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 2307-2313.
- Alberto, B., Sánchez, C., García, A., Pérez, R., Tadeo, J. (2015). Ultrasound assisted extraction of emerging contaminants from environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 110-118.
- Amiriduo, D. y Voutsas, D. (2011). Alkylphenols and phthalates in bottled waters. *Journal of Hazardous Materials*, 185, 281-286.
- Anggrianto, K., Salea, R., Veriansyah, B., Tjandrawinata, R. (2014). Application of supercritical fluid extraction on food processing: black-eyed pea (*Vigna unguiculata*) and peanut (*Arachis hypogaea*). *Procedia Chemistry*, 9, 265-272.
- Aparicio, I., Martín, J., Santos, J.L., Malvar, J.L., Alonso, E. (2017). Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry determination of polar and non-polar emerging and priority pollutants in environmental waters. *Journal of Chromatography A*, 1500, 43-52.
- Asimakopoulos, A.G., Thomaidis, N.S., Koupparis, M.A. (2012). Recent trends in biomonitoring of bisphenol A, 4-t-octylphenol, and 4-nonylphenol. *Toxicology Letters*, 210, 141-154.
- Ballesteros-Gómez, A., Rubio, S., Pérez-Bendito, D. (2009). Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. *Journal of Chromatography A*, 1216, 449-469.
- Badeka, A. y Kontominas, M. (1996). Effect of microwave heating on the migration of dioctyladipate and acetyltributylcitrate plasticizers from food-grade PVC and PVDC/PVC films into olive oil and water. *Z. Lebensm Unters Forch*, 202, 313-317.
- Barker, D.J. (2004). Developmental origins of adult health and disease. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 58, 114-115.
- Benjamin. S., Masai, E., Kammimura, N., Takahashi, K., Anderson R., Faisal, P.A. (2017). Phthalates impact human health: epidemiological evidences and plausible mechanism of action. *Journal of Hazardous Materials*, 340, 360-383.
- Bergman, A., Heindel, J., Jobling, S., Kidd, K., Zoeller, T. (2012). State of the science of endocrine disruption chemicals. *World Health Organization*.
- Bradley, E., Burden, R., Leon, I., Mortimer, D., Speck, D., Castle, L. (2013). Determination of phthalates diesters in food. *Food Additives and Contaminants. Part A*, 30, 722-734.
- Braun, J.M. (2017). Early-life exposure to EDCs: role in childhood obesity and neurodevelopment. *Nature Reviews Endocrinology*, 13, 161-173.
- Cao, L., Dufresne, G., Belisle, S., Clement, G., Falicki, M., Beraldin, F., Rulibikiye, A. (2008). Levels of bisphenol A in canned liquid infant formula products in Canada and dietary intake estimates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7919-7924.

- Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Colapicchioni, V., Piovesana, S., Samperi, R., Laganà, A. (2013). Analytical strategies based on chromatography-mass spectrometry for the determination of estrogen-mimicking compounds in food. *Journal of Chromatography A*, 1313, 62–77.
- Casajuana, N. y Lacorte, S. (2004). New methodology for the determination of phthalates esters, bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether, and nonylphenol in commercial whole milk samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3702-37.
- CEC, Commission implementing regulation (EU) No 1282/2011 of 28 November 2011 amending and correcting commission regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food.
- Chen, G., Ding, W., Ku, H., Chao, H., Chen H., Huang, M., (2010). Alkyphenols in human milk and their relations to dietary habits in central Taiwan. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 1939-1944.
- Cirillo, T., Latini, G., Castaldi, M., Dipaola, L., Fasano, E., Esposito, F., Scognamiglio, G., Di Francesco, F., Cobellis, L. (2015). Exposure to di-2-ethylhexyl phthalate, di-N-butyl phthalate and bisphenol A through infant formulas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 3303-3310.
- Clausen, P.A., Lindenberg, R.L., Nilsson, T., Hansen, V., Svensmark, B., Bowadt, S. (2003). Simultaneous extraction of di(2-ethylhexyl) phthalate and nonionic surfactants from house dust. Concentrations in floor dust from 15 Danish schools. *Journal of Chromatography A*, 986, 179-190.
- Clayton, E.M.R., Todd, M., Dowd, J.B., Aiello, A.E. (2011). The impact of bisphenol A and triclosan on immune parameters in the U.S. population, NHANES 2003–2006. *Environmental Health Perspectives*, 119, 390–396.
- Commission Directive 2000/60/EC, 2000. Establishment and framework for community action in the field of water policy. *Official Journal of European Union*, L'327, 1–73.
- Commission Directive 2011/8/EU, 2011. Amending Directive 2002/72/EC as regards the restriction of use of bisphenol A in plastic infant feeding bottles. *Official Journal of European Union*.
- Commission Directive 2014/81/EU, 2014. Amending appendix C of annex II to Directive 2009/48/EC of the European Parliament and of the Council on the safety of toys, as regards bisphenol A.
- Crini, G. y Badot, P.M. (2007). *Traitement et depuration des eaux industrielles*, (Ed.), PUFC, Besancon, France, p. 356 (in French).
- Cunha, S., Almeida, C., Mendes, E., Fernandes, J. (2011) Simultaneous determination of bisphenol A and bisphenol B in beverages and powdered infant formula by dispersive liquid-liquid micro-extraction and heart-cutting multidimensional gas chromatography-mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 28, 513-526.
- Das, M.T., Ghosh, P., Thakur, I.S. (2014). Intake estimates of phthalate esters for South Delhi population based on exposure media assessment. *Environmental Pollution*, 189, 118-125.
- Daughton, C.G. (2011). Emerging pollutants, and communicating the science of environmental chemistry and mass spectrometry: Pharmaceuticals in the environment. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry*, 10, 1067-1076.
- Daza, W. y Dadán, S. (2009). Fórmulas infantiles. *Curso continuo de actualización en pediatría*, 8, 5-17.
- Deblonde, T., Cossu, C., Hartemann, P. (2011). Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214, 442-448.

- Del Bubba, M., Ancillotti, C., Checchini, L., Fibbi, D., Rossini, D., Ciofi, L., Rivoira, L., Profeti, C., Orlandini, S., Furlanetto, S. (2018). Determination of phthalate diesters and monoesters in human milk and infant formula by fat extraction, size-exclusion chromatography clean-up and gas chromatography-mass spectrometry detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 148, 6-16.
- Desvergne, B., Feige, J. N., Casals, C. (2009). PPAR-mediated activity of phthalates: A link to the obesity epidemic? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 304, 43-48.
- Diamanti, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T., Gore, A.C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: An endocrine society scientific statement. *Endocrine Reviews*, 30, 293-342.
- Dorival, N., Zafra, A., Navalon, A., Vilchez, J.L. (2012). Improved simple treatment for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge simple by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 101, 1-10
- Errico, S., Bianco, M., Mita, L., Migliaccio, M., Rossi, S., Nicolucci, C., Menale, C., Portaccio, M., Gallo, P., Mita, D., Diano, N. (2014). Migration of bisphenol A into canned tomatoes produced in Italy: dependence on temperature and storage conditions. *Food Chemistry*, 160, 157-164.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2006). Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food (ACF) on request from the commission related to 2,2-bis(4-hydroxyphenyl) propane (bisphenol A). *The EFSA Journal*, 428.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2015). Scientific opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *The EFSA Journal*, 13, 3978.
- Fasano, E., Bono, F., Cirillo, T., Montuori, P., Lacorte, S. (2012). Migration of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and di (2-ethylhexyl) adipate from food packaging. *Food Control*, 27, 132-138.
- Fernandes, A.R., Rose, M., Charlton, C., (2008). 4-Nonylphenol (NP) in food-contact materials: Analytical methodology and occurrence. *Food Additives and contaminants*, 25, 364–372.
- Ferrer, E., Santoni, E., Vittori, S., Font, G., Mañes, J., Sagratini, G. (2011). Simultaneous determination of bisphenol A, octylphenol, and nonylphenol by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in powdered milk and infant formulas. *Food Chemistry*, 126, 360-367.
- Frederiksen, H., Aksglaede, L., Sorensen, K., Skakkebaek, N.E., Juul, A., Andersson, A.M. (2011). Urinary excretion of phthalate metabolites in 129 healthy Danish children and adolescents: Estimation of daily phthalate intake. *Environmental Research*, 111, 656-663.
- Fromme, H., Gruber, L., Seckin, E., Raab, U., Zimmermann, S., Kiranoglu, M., Schlummer, M., Schwegler, U., Smolic, S., Völkel, W. (2011). Phthalates and their metabolites in breast milk. Results from the Bavarian Monitoring of Breast Milk (BAMBI). *Environment International*, 37, 715-722.
- Galuszka, A., Migaszewski, Z., Namiesnik, J. (2013). The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. *Trends in Analytical Chemistry*, 50, 78-84.
- Gao, D.W. y Wen, Z.D. (2016). Phthalate esters in the environment: A critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes. *Science Total Environmental*, 541, 986–1001.

- Gattullo, C.E., Bährs, H., Steinberg, C.E.W., Loffredo, E. (2012). Removal of bisphenol A by the freshwater green alga *Monoraphidium braunii* and the role of natural organic matter. *Science of The Total Environment*, 416, 501-506.
- Ge, W., Yang, X., Wu, X., Wang, Z., Geng, W., Guo, C. (2016). Phthalates residue in goat milk-based infant formulas manufactured in China. *Journal Dairy Science*, 99, 1-6.
- Giulivo, M., Lopez de Alda, M., Capri, E., Barceló, D. (2016). Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environmental Research*, 151, 251-264.
- Goodson, A., Summerfield, W., Cooper, I. (2002). Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods. *Food Additives and Contaminants*, 19, 796-802.
- Gore, A.C., Chappel, V.A., Fenton, S.E., Flaws, J.A., Nadal, A., Prins, G.S., Toppari, J., Zoeller, R.T. (2015). EDC-2: The endocrine society's second scientific statement on endocrine-disrupting chemicals. *Endocrine Reviews*, 36, E1-E150.
- Guenther, K., Heinke, V., Thiele, B., Kleist, E., Prast, H., Raecker, T. (2002). Endocrine disrupting nonylphenols are ubiquitous in food. *Environmental Science and Technology*, 36, 1676– 1680.
- Hahladakis, J.N., Velis, C.A., Weber, R., Lacovidou, E., Purnell. (2018). An overview of chemical additives presents in plastics: Migration, release, fate and environmental impact during their use, disposal and recycling. *Journal of Hazardous Materials*, 344, 179-199.
- Heindel, J.J., Balbus, J., Birnbaum, L., Brune, M. N., Grandjean, P., Gray, K., Landrigan, P.J., Sly, P.D., Suk, W., Cory Slechtha, D., Thompson, C., Hanson, M. (2015). Developmental origins of health and disease: Integrating environmental influences. *Endocrinology*, 156, 3416-3421.
- Herrero, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2006). Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae. A review. *Food Chemistry*, 98, 136-148.
- Herrero, M., Mendiola, J.A., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2010). Supercritical fluid extraction: recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2495-2511.
- Housecroft, C. y Sharpe A. (2006). *Química Inorgánica*, 2ª ed. Pearson Educación S. A. Madrid, España. 530-532.
- Hugo, E., Brandebourg, T., Wood, J., Loftus, J., Alexander, J.W., Ben, N. (2008). Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibit adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environmental Health Perspectives*, 116, 1642-1647.
- Hung, C.H., Yang, S.N., Kuo, P.L., Chu, Y.T., Chang, H.W., Wei, W.J., Huang, S.K., Jong, Y.J. (2010). Modulation of cytokine expression in human myeloid dendritic cells by environmental endocrine-disrupting chemicals involves epigenetic regulation. *Environmental Health Perspectives*, 118, 67-72.
- Inoue, H., Yokota, H., Makino, T., Yuasa, A., Kato, S. (2001). Bisphenol A glucuronide, a major metabolite in rate bile after liver perfusion. *Drug Metabolism and Disposition*, 29, 1084-1087.
- Inoue, H., Tsuruta, A., Kudo, S., Ishii, T., Fukushima, Y. (2005). Bisphenol A glucuronidation and excretion in liver of pregnant and nonpregnant female rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 33, 55-59.
- Jin, J., Wang, Y., Liu, H., Zhang, Z. (2013). Determination and calculation of solubility of bisphenol A in supercritical carbon dioxide. *Chemical Engineering Research and Design*, 91, 158-164.

- Kato, T., Tada, K., Saito, K., Wang, L., Nishio, A., Hakamada, R., Kawanishi, S., Kuribayashi, K. (2006). Endocrine disruptors that deplete glutathione levels in APC promote Th2 polarization in mice leading to the exacerbation of airway inflammation. *European Journal of Immunology*, 36, 1199-209.
- Kim, S.H., y Park, M.J. (2014). Phthalate exposure and childhood obesity. *Annals of Pediatric Endocrinology & Metabolism*, 19, 69-75.
- Koch, H.M., Bolt, H.M., Angerer, J. (2004). Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) metabolites in human urine and serum after a single oral dose of deuterium-labelled DEHP. *Archives of Toxicology*, 78, 123-130.
- Koch, H.M., Bolt, H.M., Preuss, R., Angerer, J. (2005). New metabolites of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Archives of Toxicology*, 79, 367-376.
- Koch, H.M. y Angerer, J. (2007). Di-iso-nonylphthalate (DINP) metabolites in human urine after a single oral dose of deuterium-labelled DINP. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210, 9-19.
- Kreisselmeier, A. y Dürbeck, H.W. (1997). Determination of alkylphenols, alkylphenoethoxylates and linear alkylbenzenesulfonates in sediments by accelerated solvent extraction and supercritical fluid extraction. *Journal of Chromatography A*, 775, 187-196.
- Kubo, K. Arai, O., Ogata, R., Omura, M., Hori, T., Aou, S. (2001). Exposure to bisphenol A during the fetal and suckling periods disrupts sexual differentiation of the locus coeruleus and of behavior in the rat. *Neuroscience Letters*, 304, 73-76.
- Kubo, K., Arai, O., Omura, M., Watanabe, R., Ogata, R., Aou, S. (2003). Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neuroscience Research*, 45, 345-356.
- Kudlak, B. y Namieśnik, J. (2008). Environmental fate of endocrine disrupting compounds-analytical problems and challenges. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 38, 242-258.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H. van der Saag, P.T., van der Burg, B., Gustafsson, J.A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139, 4252-63.
- Kuo, H., y Ding, W. (2004). Trace determination of bisphenol A and phytoestrogens in infant formula powders by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1027, 67-74.
- Kuo, P.L., Hsu, Y.L., Tsai, M.J, Lien, C.T., Huang, M.S., Ko, Y.C. (2011). Nonylphenol induces bronchial epithelial apoptosis via Fas-mediated pathway and stimulates bronchial epithelium to secrete IL-6 and IL-8, causing bronchial smooth muscle proliferation and migration. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 110, 178-86.
- Kuruto, R., Tateoka, Y., Usuki, Y., Nozawa, R. (2007). Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrums. *Chemosphere*, 66, 1160-1164.
- Latini, G., Verrotti, A., De Felice, C. (2004). Di-2-ethylhexyl phthalate and endocrine disruption: A review. *Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, 4, 37-40.
- Lee, H.B. y Peart, T.E. (1995). Determination of 4-Nonylphenol in effluent and sludge from sewage treatment plants. *Analytical Chemistry*, 67, 1976-1980.

- Lee, H.B., Peart, T.E., Bennie, D.T., Maguire, R.J. (1997). Determination of nonylphenol polyethoxylates and their carboxylic acid metabolites in sewage treatment plant sludge by supercritical carbon dioxide extraction. *Journal of Chromatography A*, 785, 385-394.
- Lee, H.B. y Peart, T.E. (2000). Determination of bisphenol A in sewage effluent and sludge by solid-phase and supercritical fluid extraction and gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 83, 290-297.
- Lin, J., Arunkumar, R., Liu, C. (1999). Efficiency of supercritical fluid extraction for determining 4-nonylphenol in municipal sewage sludge. *Journal of Chromatography A*, 840, 71-79.
- Lin, S., Ku, H.Y., Su, P.H., Chen, J.W., Huang, P.C., Angerer, J., Wang, S.L. (2011). Phthalate exposure in pregnant women and their children in central Taiwan. *Chemosphere*, 82, 947-955.
- Lu, Y.Y., Chen, M.L., Sung, F.C., Wang, P.S., Mao, I.F. (2007). Daily intake of 4-nonylphenol in Taiwanese. *Environment International*, 33, 903-10.
- Maragou, N., Lampi, E., Thomaidis, N., Koupparis. (2006). Determination of bisphenol A in milk by solid phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1129, 165-173.
- Marín, M., Jiménez, A., Berenguer, V., López, J. (1998). Optimization of variable on the supercritical fluid extraction of phthalate plasticizers. *Journal of Supercritical Fluids*, 12, 271-277.
- McDowell, D. y Metcalfe, C. (2001). Phthalate esters in sediments near a sewage treatment plant outflow in Hamilton Harbour, Ontario: SFE extraction and environmental distribution. *Journal of Great Lakes Reserch*, 27, 3-9.
- Meesters, R. y Schröder, H. (2002). Simultaneous determination of 4-Nonylphenol and Bisphenol A in sewage sludge. *Analytical Chemistry*, 74, 3566-3574.
- Melzer, D., Rice, N.E., Lewis, C., Henley, W.E., Galloway, T.S. (2010). Association of urinary bisphenol A concentration with heart disease: Evidence from NHANES 2003/06. *PLoS One* 5, 8673.
- Mendiola, J.A., Jaime, L., Santoyo, S., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibáñez, E., Señoráns, F.J. (2007). Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina plantensis*. *Food Chemistry*, 4, 1357-1367.
- Mezcua, M., Martínez, M.A., Góme, M.M., Gómez, M.J., Navas, J.M., Fernández, A.R. (2012). Analysis of synthetic endocrine-disrupting chemicals in food: A review. *Talanta*, 100, 90-106.
- Miyatake, M., Miyagawa, K., Mizuo, K., Narita, M., Suzuki, T. (2006). Dynamic changes in dopaminergic neurotransmission induced by a low concentration of bisphenol-A in neurones and astrocytes. *Journal of Neuroendocrinology*, 18, 434-444.
- Miyagawa, K., Narita, M., Akama, H., Suzuki, T. (2007). Memory impairment associated with a Dysfunction of the hippocampal cholinergic system induced by prenatal a neonatal exposure to bisphenol A. *Neuroscience Letters*, 418, 236-241.
- Molina, L., Fernández, M., Medina, A. (2012). Analysis of bisphenol A in milk by using a multicommuted fluorimetric sensor. *Talanta*, 96, 195-201.
- Mompelat, S., Bot, B., Thomas, O. (2009). Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environment International*, 35, 803-814.

- Mortensen, G.K., Main, K.M., Anderson, A.M., Leffers, H., Skakkebaek, N.E. (2005). Determination of phthalate monoesters in human milk consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC-MS-MS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 1084-1092.
- Mueller, S.O. y Korach, K.S. (2001). Mechanisms of estrogen receptor-mediated agonistic and antagonistic effects. The handbook of environmental chemistry, part I. Volumen 3. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 3–11.
- Müller, S., Schmid, P., Schlatter, C. (1998). Pharmacokinetic behavior of 4-nonylphenol in humans. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 5, 257–265.
- Muncke, J. (2009). Exposure to endocrine disrupting compounds via the food chain: Is packaging a relevant source? *Science of The Total Environment*, 407, 4549-4559.
- Narita, S., Goldblum, R.M., Watson, C.S., Brooks, E.G., Estes, D.M., Curran, E.M., Midoro, T. (2007). Environmental estrogens induce mast cell degranulation and enhance IgE-mediated release of allergenic mediators. *Environmental Health Perspectives*, 115, 48-52.
- Newbold, R., Jefferson, W., Padilla-Banks, E. (2009). Prenatal exposure to bisphenol A at environmentally relevant doses adversely affects the murine female reproductive tract later in life. *Environmental Health Perspectives*, 17, 879-885.
- Niu, Y., Zhang, J., Duan, H., Wu, Y., Shao, B. (2015). Bisphenol A and nonylphenol in foodstuffs: Chinese dietary exposure from the 2007 total diet study and infant health risk from formulas. *Food Chemistry*, 167, 320-325.
- Norma Oficial Mexicana NOM-131-SSA1-2012, productos y servicios. Fórmulas para lactantes, de continuación y para necesidades especiales de nutrición. Alimentos y bebidas no alcohólicas para lactantes, niños de corta edad. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales. Etiquetado y métodos de prueba. [Fecha de consulta:07/08/18]. Disponible en: http://www.salud.gob.mx/cdi/nom/compil/NO-131-SSA1-2012_100912.pdf
- O'Mahony, J., Moloney, M., McCormack, M. (2013). Design and implementation of an imprinted material for the extraction of endocrine disruptor bisphenol A from milk. *Journal of Chromatography B*, 931, 164-169.
- Papadopoulos, A. (2012). Optimization of variables on the supercritical fluid extraction of high-boiling organic compounds in house-dust. *Journal of Supercritical Fluids*, 62, 123-134.
- Papadopoulos, A., Vlachogiannis, D., Maggos, T., Sfetsos, A., Karayiannis, M.I. (2013). Asemi-quantitative approach for analyzing low-volatile organic compounds in house dust using an SFE method: Significant common features and particular differences of the extracts. *Journal of Supercritical Fluids*, 82, 268-281.
- Pastor B.M., Viñas, P., Campillo, N., Hernández, M. (2016). Magnetic solid phase extraction with CoFe₂O₄/oleic acid nanoparticles coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the determination of alkylphenols in baby foods. *Food Chemistry*, 221, 76-81.
- Pernica, M., Poloucká, P., Seifertová, M., Šimek, Z. (2015). Determination of alkylphenols in water samples using liquid chromatography-tandem mass spectrometry after pre-column derivatization with dansyl chloride. *Journal of Chromatography A*, 1417, 49-56.
- Petersen, J. y Breindahl, T. (2000). Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae. *Food Additives & Contaminants*, 17, 133-141.
- Plotka, J., Rutkowska, M., Owczarek, K., Tobiszewski, M., Namiesnik, J. (2017). Extraction with environmentally friendly solvents. *Trends in Analytical Chemistry*, 91, 12-25.

- Priac, A., Morin, N., Druart, C., Gavaille, S., Bradu, C., Lagarrigue, C., Torri, G., Winterton, P., Crini, G. (2017). Alkylphenol and alkylpheno polyethoxylates in water and wastewater: A review of options for their elimination. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, 3749-3773.
- Raecker, T., Thiele, B., Roswitha, M., Boehme, M., Guenther, K. (2011). Endocrine disrupting nonyl- and octylphenol in infant food in Germany: Considerable daily intake of nonylphenol for babies. *Chemosphere*, 82, 1533-1540.
- Ren, R., Jin, Q., He, H., Bian, T., Wang, S., Fan, J. (2016). Determination of 17 phthalates esters in infant milk powder and dairy products by GC-MS with 16 internal standards. *Chromatographia*, 79, 903-910.
- Rissman, E.F. y Adli, M. (2014). Transgenerational epigenetic inheritance: focus on endocrine disrupting compounds. *Endocrinology*, 155, 2770-2780.
- Sakhi, A., Lillegaard, I., Voorspoels, S., Carlsen, M., Loken, E., Brantsaeter, A., Haugen, M., Meltzer, H., Thomsen, C. (2014). Concentrations of phthalates and bisphenol A in Norwegian foods and beverages and estimated dietary exposure in adults. *Environment International*, 73, 259-269.
- Salgueiro, N., Castiglioni, S., Zuccato, E., Turnes, I., López, P., Muniategui, S. (2018). Recent advances in analytical methods for the determination of 4-alkylphenols and bisphenol A in solid environmental matrices: A critical review. *Analytica Chimica Acta*, 1024, 1-13.
- Sanchis, Y., Yusá, V., Coscollá, C. (2017). Analytical strategies for organic food packaging contaminants. *Journal of Chromatography A*, 1490, 22-46.
- Schettler, T. (2006). Human exposure to phthalates via consumer products. *International Journal of Andrology*, 29, 134-139.
- Schneider, J.E., Brozek, J.M., Keen, E. (2014). Our stolen figures: The interface of sexual differentiation, endocrine disruptors, maternal programming, and energy balance. *Hormones and Behavior*, 66, 104-119.
- Shangari, N., Chan, T.S., O'Brien, P.J. (2005). Sulfation and glucuronidation of phenols: implications in coenzyme Q metabolism. *Methods in Enzymology*, 400, 342-359.
- Soares, A., Guieysse, B., Jefferson, B., Cartmell, E., Lester, J.N. (2008). Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*, 34, 1033-1049.
- Song, Y., Hauser, R., Hu, F.B., Franke, A.A., Liu, S., Sun, Q. (2014). Urinary concentrations of bisphenol A and phthalate metabolites and weight change: A prospective investigation in US women. *International Journal of Obesity*, 38, 1532-1537.
- Sorensen, L.K. (2006). Determination of phthalates in milk and milk products by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 20, 1135-1143.
- Steinmetz, R., Mitchner, N., Grant, A. Allen, D., Bigsby, R., Jonathan, N.B. (1998). The xenoestrogen bisphenol A induces growth, differentiation, and c-fos gene expression in the female reproductive tract. *Endocrinology* 139, 2741-2747.
- Stowell, C., Barvian, K., Young, P., Bigsby, R., Verdugo, D., Bertozzi, C., Widlanski, T. (2006). A role for sulfation-desulfation in the uptake of bisphenol A into breast tumor cell. *Chemistry & Biology*, 13, 891-897.

- Suen, J.L., Hung, C.H., Yu, H.S., Huang, S.K. (2012). Alkylphenols-potential modulators of the allergic response. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 28, S43-S48.
- Sunarso, J. y Ismadji, S. (2009). Decontamination of hazardous substances from solid matrices and liquids using supercritical fluids extraction: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 161, 1-20.
- Swan, S.H. (2008). Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environmental Research*, 108, 177-184.
- Vandenberg, L., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology*, 24, 139-177.
- Vandenberg, L.N., Chahoud, I., Heindel, J.J., Padmanabhan, V., Paumgarten, F.J.R., Schoenfelder, G. (2010a). Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environmental Health Perspectives*, 118, 1055-1070.
- Vandenberg, L.N., Chahoud, I., Padmanabhan, V., Paumgarten, F.J.R., Schoenfelder, G. (2010b). Biomonitoring studies should be used by regulatory agencies to assess human exposure levels and safety of bisphenol A. *Environmental Health Perspectives* 118, 1051–1054.
- Vandenberg, L.N., Calborn, T., Hayes, T.B., Heindel, J.J., Jacobs, D.R., Jr., Lee, D.H., Shioda, T., Soto, A.M., vom Saal, F.S., Welshons, W.V., Zoeller, R.T., Myers, J.P. (2012). Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine reviews*, 33, 378-455.
- Volkel, W., Colnot, T., Csanady, G., Filser, J., Dekant, W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol A in human at low doses following oral administration. *Chemical Research in Toxicology*, 15, 1281-1287.
- Vom, F.S. y Hughes, C. (2005). An extensive new literature concerning low-dose effects of bisfenol A shows the need for a new risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 113, 926.
- Yano, K., Hirose, N., Sakamoto, Y., Katayama, H., Moriguchi, T., Asaoka, K. (2005). Phthalate levels in baby milk powders sold in several countries. *Environmental Contamination and Toxicology*, 74, 373–379.
- Walker, D.M. y Gore, A.C. (2016). Epigenetic impacts of endocrine disruptors in the brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 44, 1-26.
- Zhang, H., Chen, X.Q., Jiang, X. Y. (2011). Determination of phthalate esters in water samples by ionic liquid cold-induced aggregation dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 689, 137–142.
- Zielinska, M., Cydzik, A., Bernat, K., Bulkowska, K., Wojnowska, I. (2014). Removal of bisphenol A (BPA) in a nitrifying system with immobilized biomass. *Bioresource Technology*, 171, 305-313.
- Zuloaga, O., Navarro, P., Bizkarguenaga, E., Iparraguirre, A., Vallejo, A., Olivares, M., Prieto, A. (2012). Overview of extraction, clean-up, and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review. *Analytica Chimica Acta*, 736, 7-29.

ANEXO

A. Registro de Patente ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial

INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
Comisión Nacional de Patentes

1. Tipo de solicitud:
 Solicitud de Patente
Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad
 Solicitud de Registro de Diseño Industrial
Innovación dual: Médico Dental Industrial

2. Datos del Solicitante:
1) Tipo de solicitante: Físico Jurídico (Persona o Entidad)
2) Nombre: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
3) Domicilio: MEXICO
4) Domicilio legal: CARRETERA FEDERAL PROYECTADA 3° RINCÓN LA FERRE DE COCTEMAL DE LA CIUDAD UNIVERSITARIA T 9 5803
País: México, Estado y D.F.: CDMEX, CUBO DE MÉXICO, MEXICO
Calle: Quilón (antes) 180 9533 03 264 01 Tel: (en México) 55 53 40 44

3. Datos del/los Inventor(es):
1) Nombre: VILLALBA TORRES TORRES, ARTURO GABRIEL Y RAMÍREZ, RICARDO GUANO RODRÍGUEZ Y ROSA GARCÍA ARRACOLA
2) Nacionalidad: MEXICANA, MEXICANA, ESPAÑOLA Y MEXICANA
3) Domicilio legal: CARRETERA FEDERAL PROYECTADA 3° RINCÓN LA FERRE DE COCTEMAL DE LA CIUDAD UNIVERSITARIA T 9 5803
País: México y País (Opción de la Ciudad de México, México):
4) Domicilio legal: (Opción de la Ciudad de México, México) (Opción de la Ciudad de México, México)

4. Datos del Representante:
1) Nombre: CARRO, GUSTAVO MARTÍN DE ROSAS Y MARTÍNEZ VILLALBA ROSA (O) 507 004 1116
2) Domicilio legal: México, Estado y D.F.: MEX, D.F.: CDMEX, CALLE DE LAS DIVISIONES ADMINISTRATIVAS ESTADUALES DE LA ZONA CUATRO DE LA CIUDAD DE MEXICO, CP 04510
País: México, Estado y D.F.: CDMEX, CDMEX, MEXICO Tel: (en México) 55 26 23 83 89 01 Tel: (en México) (55) 30 05 48 44
3) País de la Academia: México
4) Nombre: GUANO RODRÍGUEZ, RICARDO y ROSA GARCÍA ARRACOLA

5. Descripción de la invención:
"PROCESO DE EXTRACCIÓN DE DISPENOL A EN ALIMENTOS DE BAJA pH Y EN ENVASES METÁLICOS CON RECUBRIMIENTO INTERNO A BASE DE RESINAS, EMPLEANDO DÍOXIDO DE CARBONO EN ESTADO SUPERCRÍTICO"

6. Fecha de la solicitud:
1) Fecha: Día: 25, Mes: 09, Año: 2017
2) Clasificación Internacional: Clase: 10, Subclase: 03, Grupo: 01, Clase: 10, Subclase: 03, Grupo: 01
3) Fecha de presentación: Día: 25, Mes: 09, Año: 2017

7. Datos de la solicitud:
1) Prioridad: País: México, No. de invención: 01/2017
2) Fecha de presentación: Día: 25, Mes: 09, Año: 2017

8. Clasificación de la invención:
1) Clasificación Internacional: Clase: 10, Subclase: 03, Grupo: 01, Clase: 10, Subclase: 03, Grupo: 01

9. Observaciones:
Se anexa una copia de la solicitud.
No procede el pago de derechos por el momento.
C.D. SANDOVAL, LUIS ENRIQUE REYES (C) 55 53 40 44
NOMBRE Y FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE LEGAL: [Firma] (Opción de la Ciudad de México, México) (Opción de la Ciudad de México, México)
Fecha y Hora: [Fecha y Hora]

B. Análisis de varianza (ANOVA) de la extracción de DEHP, 4-NP y BPA mediante scCO₂ a diferentes condiciones de proceso.

ANÁLISIS DE VARIANZA. DEHP

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Tiempo	0.0014	1	0.0014	0.0190	0.894	5.317
Densidad	0.0352	1	0.0352	0.4752	0.510	5.317
Interacción	0.7252	1	0.7252	9.7890	0.014	5.317
Error	0.5926	8	0.0740			
Total	1.3544	11				

ANÁLISIS DE VARIANZA.4-NP

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Tiempo	3E-06	1	3E-06	0.0019	0.9656	5.317
Densidad	0.3420	1	0.3420	225.1234	3.84E-07	5.317
Interacción	0.0053	1	0.0053	3.5384	0.0967	5.317
Error	0.0121	8	0.0015			
Total	0.3595	11				

ANÁLISIS DE VARIANZA. BPA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Tiempo	0.0443	1	0.0443	50.0093	0.0021	7.708
Densidad	0.0218	1	0.0218	24.6186	0.0076	7.708
Interacción	0.0246	1	0.0246	27.7757	0.0062	7.708
Error	0.0035	4	0.0008			
Total	0.0944	7				