



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EXTRACCIÓN DE BISFENOL A DE CEREAL ENLATADO PARA INFANTES
UTILIZANDO DIÓXIDO DE CARBONO EN ESTADO SUPERCRÍTICO**

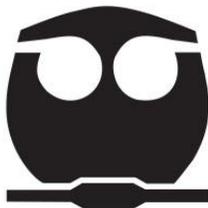
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

EDNA YUZI TORRES TORRES



MÉXICO, D. F.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Argelia Sánchez Chinchillas

VOCAL: Alejandro Zavala Rivapalacios

SECRETARIO: Roeb García Arrazola

1er. SUPLENTE: Nidia Maribel Mariano García

2°. SUPLENTE: Tania Gómez Sierra

SITIO DONDE SE REALIZÓ EL TEMA:

Laboratorios 313 y 314, Departamento de Alimentos y Biotecnología. Conjunto E,
Facultad de Química. Ciudad Universitaria.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Roeb García Arrazola

SUSTENTANTE:

Edna Yuzi Torres Torres

CONTENIDO

RESUMEN	I
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	4
1.1 Contaminantes emergentes	4
1.2 Disruptores endócrinos	5
1.3 Bisfenol A	9
1.3.1 Bisfenol A y su asociación a mecanismos de disrupción endócrina	11
1.3.2 Resinas epoxi a base de bisfenol A y su uso como recubrimiento en enlatados	15
1.3.3 Exposición de bisfenol A en niños	18
1.4 Métodos de extracción de bisfenol A en alimentos (Ballesteros <i>et al.</i> , 2009).....	21
1.4.1 Extracción de bisfenol A utilizando CO ₂ supercrítico	24
2. JUSTIFICACIÓN	28
3. HIPÓTESIS	29
4. OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo general	30
4.2 Objetivos particulares.....	30
5. METODOLOGÍA	31
5.1 Estrategia experimental	31
5.2 Muestra.....	32
5.3 Extracción con CO ₂ supercrítico.....	33
5.4 Cuantificación analítica de fenoles. Método Folin-Ciocalteu	35
5.5 Extracción convencional. Técnica Soxhlet	36
5.6 Análisis instrumental	37
5.6.1 Derivatización.....	37
5.6.2 Cromatografía de gases	38
5.7 Extracción de bisfenol A en lata con CO ₂ supercrítico	39
6. RESULTADO Y DISCUSIÓN	40
6.1 Prueba de concepto. Extracción de fenoles con CO ₂ supercrítico	40
6.1.1 Cuantificación de fenoles mediante la reacción Folin-Ciocalteu.....	40

6.1.2 Extracción de indofenol con CO ₂ supercrítico.....	41
6.1.3 Efecto de la presión y la temperatura sobre el rendimiento de extracción.....	45
6.2 Extracción de bisfenol A de cereal, mediante CO ₂ supercrítico	47
6.2.1 Extracción en muestra dopada.....	48
6.2.2 Extracción en la muestra de cereal	51
6.3 Extracción de bisfenol A de la muestra de cereal mediante la técnica convencional Soxhlet	55
6.4 Estimación del consumo de bisfenol A a través del cereal	60
6.5 Propuesta de prototipo para la extracción de bisfenol A en latas mediante CO ₂ supercrítico	65
.....	72
7. CONCLUSIONES	72
8. RECOMENDACIONES	73
9. REFERENCIAS.....	74
10. ANEXO I.....	83

RESUMEN

Bisfenol A (BPA) es uno de los disruptores endócrinos más estudiados. BPA es utilizado principalmente para la fabricación de plásticos de policarbonato y resinas epoxi que son empleadas en recubrimientos en latas. El consumo de alimentos es la principal fuente de exposición a BPA en humanos. En este trabajo se desarrolló un método de extracción con dióxido de carbono en estado supercrítico para la remoción de BPA y con ello proponer un método de pre-tratamiento para determinar el contenido de BPA por cromatografía de gases acoplado a masas.

Se utilizó una muestra de cereal enlatado para infantes, ya que es ampliamente reportado que los alimentos enlatados presentan una concentración de BPA considerablemente mayor que los alimentos contenidos en otro tipo de empaques o frescos, y debido a que la población infantil es la más susceptible a disruptores endócrinos tales como el BPA.

La tecnología con fluidos supercríticos representa una opción verde a las extracciones convencionales con solventes orgánicos. Esta es una tecnología ambientalmente limpia, libre de solventes orgánicos y que presenta ventajas en los procesos de extracción al mejorar la transferencia de masa debido a las propiedades de solvente y de transporte que ofrecen los fluidos supercríticos.

Para la optimización del proceso de extracción se estudió el efecto de las variables presión y temperatura sobre el rendimiento de extracción. Las condiciones que permitieron obtener un mayor rendimiento de extracción fueron 300 bar, 60 °C.

Bajo estas condiciones se logró una extracción de 319.7 ± 94 ng/g lo que representa el 42.8% de 747.4 ± 34 ng/g extraídos mediante la técnica convencional Soxhlet.

Con la concentración encontrada en la muestra de cereal se estimó la ingesta de BPA debido al consumo de este alimento. Para un bebé de 6 meses con un peso corporal promedio de 7.2 kg, se calculó una ingesta de $1.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal-día, la cual, aunque se encuentra por debajo de la Ingesta Diaria Tolerable-temporal (TDI-t) de $4 \mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal-día establecido por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en 2015, representa el doble del consumo de BPA estimado para un niño de 0-3 años por la EFSA en 2015, esto es $0.875 \mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal-día. Lo anterior representa un riesgo potencial para la población infantil ya que se trata de la ingesta de BPA debido a un sólo alimento.

La extracción exitosa de BPA de cereal asistida con CO_2 supercrítico permitió desarrollar un prototipo para la extracción de BPA de latas utilizando la tecnología con fluidos supercríticos como un método de limpieza, antes del proceso de enlatado; para lo cual se probó la extracción de BPA en latas como una prueba de concepto, en este análisis se extrajeron $176 \text{ ng}/\text{cm}^2$ de lata.

Finalmente, en este trabajo se concluye que es posible utilizar la extracción asistida con CO_2 supercrítico como un pre-tratamiento para la determinación del contenido de BPA en alimentos por cromatografía de gases acoplado a masa.

INTRODUCCIÓN

En años recientes una gran variedad de compuestos orgánicos naturales y sintéticos han sido usados para cubrir las demandas de la industria química, farmacéutica y de alimentos. Muchos de estos compuestos después de cumplir la función para la que fueron fabricados, se acumulan en el ambiente en aguas residuales, suelo, aire, desechos inorgánicos, y finalmente llegan al ser humano a través de los alimentos. Algunos de estos contaminantes emergentes pueden afectar el sistema endócrino e interferir con el desarrollo de procesos bioquímicos importantes en los seres humanos y animales (Valsecchi *et al.*, 2015).

La exposición a estos contaminantes es crítico durante el periodo de desarrollo, por ejemplo, durante el periodo de desarrollo fetal, infantil y la pubertad; sin embargo, sólo una pequeña fracción de estos compuestos químicos han sido investigados como disruptores endócrinos, es decir, ser capaces de producir efectos adversos en el sistema endócrino (Bergman *et al.*, 2012).

Uno de los disruptores endócrinos más estudiados es bisfenol A (BPA) (Sungur *et al.*, 2014) que ha sido identificado por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos como una sustancia de alto riesgo a la salud y al ambiente (Sakhi *et al.*, 2014).

El BPA es usado principalmente para la producción de resinas epoxi y plásticos de policarbonato. Las resinas epoxi son utilizadas para el recubrimiento de la superficie en contacto con el alimento en latas y en tapas metálicas. Los plásticos

de policarbonatos son utilizados para empaques y botellas de plástico, biberones y recipientes para microondas (EFSA, 2006; Sakhi *et al.*, 2014). En análisis se ha mostrado que la polimerización de las resinas y polímeros a base de BPA utilizados en empaques de alimentos puede no estar completa, lo que provoca la migración del monómero residual del envase al alimento (Errico *et al.*, 2014).

La ingesta es considerada la principal fuente de exposición de BPA en humanos (Chen *et al.*, 2010). En 2015 la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) estableció una Ingesta Diaria Tolerable-temporal (TDI-t) de 4 µg/kg peso corporal/día (EFSA, 2015).

Las propiedades estrogénicas de BPA han sido ampliamente estudiadas y se ha descrito en múltiples ocasiones los efectos adversos producidos en modelos animales sometidos a bajas concentraciones de BPA (Ballesteros *et al.*, 2009). Se ha reportado la asociación de BPA con la disrupción endócrina, provocando efectos tales como la proliferación de células cancerígenas, malformaciones genitales, disrupción en la función de la hormona tiroidea y desórdenes reproductivos. BPA está relacionado con enfermedades cardiovasculares, obesidad, autismo, problemas de aprendizaje y estudios recientes han reportado daños al hígado (Allard, 2014; Milic *et al.*, 2015).

Mientras la lista de efectos adversos atribuidos al BPA es cada día mayor, el riesgo asociado con la exposición a BPA en humanos es fuente de interminable debate. En 2015, la EFSA concluyó que no existe un problema de salud público

debido a la exposición dietética y exposición agregada (debido al polvo, agua, y aire) de BPA para cualquier grupo de edad en seres humanos (EFSA, 2015).

Debido a los grandes volúmenes de producción, la alta dispersión, las propiedades de disruptor endócrino del BPA y los posibles efectos adversos en la salud pública, existe la necesidad de investigaciones en nuevos métodos para la preparación de la muestra, que constituye el paso clave en su determinación.

El aislamiento de BPA de alimentos mediante las metodologías convencionales requiere repetidas extracciones con solventes orgánicos lo cual hace que el tratamiento sea laborioso y muy contaminante, además de que se ha discutido su selectividad y sensibilidad (Ballesteros *et al.*, 2009). La extracción asistida con fluidos en estado supercrítico como solventes es una nueva tecnología sustentable que ha sido utilizada con éxito en la extracción de compuestos orgánicos de fuentes naturales, esta tecnología ofrece ventajas respecto a las técnicas convencionales al no usar solventes orgánicos, disminuir el tiempo de extracción, y mejorar la transferencia de masa al presentar el fluido supercrítico propiedades de líquido y de gas (Housecroft & Sharpe, 2006).

De acuerdo con lo anterior, el objetivo de este trabajo es proponer y desarrollar una técnica de preparación de la muestra para la determinación de BPA utilizando CO₂ en estado supercrítico, que permitirá minimizar el tiempo de análisis y consumo de solventes orgánicos, haciendo de ésta una técnica rápida, sustentable y accesible, que apoyará en la evaluación del riesgo y el control de la exposición humana a BPA.



1. ANTECEDENTES

1. ANTECEDENTES

1.1 Contaminantes emergentes

Hasta principios de los años 90's, los compuestos químicos de riesgo para la salud y el ambiente, por ejemplo contaminantes orgánicos y metales pesados, estaban en el foco de interés como contaminantes prioritarios, y en consecuencia, fueron parte de los programas de seguimiento intensivo para reducir su emisión. En la actualidad, estos compuestos son menos relevantes para los países industrializados; sin embargo, la emisión de los llamados contaminantes "emergentes" o "nuevos" no regulados se ha convertido en un problema ambiental y existe un consenso generalizado de que este tipo de contaminación puede requerir una intervención legislativa (Valsecchi *et al.*, 2015).

Los contaminantes emergentes son compuestos de distinto origen y naturaleza química cuya presencia en el medio ambiente, o las posibles consecuencias de la misma, han pasado en gran parte inadvertidas. Son compuestos de los cuales se sabe relativamente poco o nada acerca de su presencia e impacto en los distintos compartimentos ambientales y en el hombre y que, por tanto, precisan investigación (Barceló & López, 2011).



1. ANTECEDENTES

Este grupo se compone principalmente de compuestos químicos empleados en productos tales como medicamentos humanos y veterinarios, productos de cuidado personal, surfactantes, pinturas, plastificantes, aditivos en diferentes industriales, etc. (Alberto *et al.*, 2015).

Recientemente los contaminantes emergentes orgánicos han llegado a tener gran importancia debido a la frecuencia de detección en ambientes acuáticos, aguas residuales, aguas superficiales y agua destinada al consumo humano, así como por su toxicidad al presentar actividad biológica a concentraciones de ng/L (Mompelat *et al.*, 2009) e ineficiencia para removerlos por métodos convencionales (Yan, *et al.*, 2015).

1.2 Disruptores endócrinos

La disrupción endócrina es una alteración al sistema endócrino, el cual es el responsable de controlar un gran número de procesos en el cuerpo 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).



1. ANTECEDENTES

En años pasados la disrupción endócrina ha atraído la atención de científicos alrededor del mundo por sus efectos negativos en la salud humana. Los disruptores endócrinos son definidos por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos como compuestos químicos exógenos que afectan la estructura o función del sistema endócrino y causan efectos adversos a la salud (Zielinska *et al.*, 2014).

Un gran número de compuestos han sido estudiados por sus efectos como moduladores estrogénicos, tales como bisfenol A (BPA), p-nonilfenol, genisteína, alquilfenoles, kaempferol, por mencionar algunos, que se encuentran presentes en el ambiente y en los alimentos (Gierthy, 2002).

Generalmente, existen dos formas por las que un disruptor endócrino puede actuar: acción directa sobre la proteína receptora de la hormona o acción directa sobre alguna proteína que controla la síntesis o transporte de la hormona. Los disruptores endócrinos exhiben las mismas características que una hormona (**tabla 1.1**) por lo que pueden interferir en el proceso de control hormonal, interactuar con varios receptores simultáneamente o actuar sinérgicamente produciendo efectos que no se ven al actuar individualmente (Bergman *et al.*, 2012).



1. ANTECEDENTES

Tabla 1.1 Comparación de la acción de las hormonas y los disruptores endócrinos.

Hormonas	Disruptores endócrinos
Actúan vía receptores hormonales	Algunos actúan vía receptores hormonales con afinidad a múltiples receptores
<ul style="list-style-type: none"> Algunos tienen múltiples receptores. Las hormonas normalmente se unen de manera similar a todos los receptores. 	<ul style="list-style-type: none"> Causa una función anormal en el receptor.
Activa a bajas concentraciones	Algunos actúan a bajas concentraciones, otros es variable
<ul style="list-style-type: none"> Los niveles en sangre no siempre reflejan la actividad. Puede estar unido a proteínas de suero en sangre con pequeño porcentaje libre. No bioacumulación. 	<ul style="list-style-type: none"> Los niveles en sangre no siempre reflejan la actividad. Pueden unirse a proteínas de suero. Los efectos sobre los niveles hormonales en sangre pueden no reflejarse sobre la acción hormonal. Posible bioacumulación.
Relación no lineal dosis-respuesta	Relación no lineal dosis-respuesta
<ul style="list-style-type: none"> Siempre saturable con un rango variable. Puede exhibir una relación no monotónica dosis-respuesta. A altas dosis los efectos no son los mismos que a bajas dosis. 	<ul style="list-style-type: none"> Siempre saturable con un rango variable. Puede exhibir una relación no monotónica dosis-respuesta. A altas dosis los efectos no son los mismos que a bajas dosis.
Efecto en un tejido específico y en una etapa de vida específica	Efecto en un tejido específico y en una etapa de vida específica
Desarrollo de efectos permanentes	Desarrollo de efectos permanentes
<ul style="list-style-type: none"> Programa el cerebro y el sistema endócrino para las funciones en la etapa adulta. 	<ul style="list-style-type: none"> Interfiere con la programación de procesos.

(Extraído de Bergman *et al.*, 2012).



1. ANTECEDENTES

En la actualidad se cuenta con mayor información de cómo pueden afectar los disruptores diferentes procesos bioquímicos relacionados con el sistema endócrino. La **tabla 1.2** presenta algunas de las alteraciones relacionadas con la exposición humana a disruptores endócrinos.

Tabla 1.2 Enfermedades inducidas por la exposición a disruptores endócrinos durante el desarrollo en modelos animales y estudios en humanos.

Sistema endócrino/reproductivo	Cerebro/sistema nervioso
<ul style="list-style-type: none">• Cáncer de mama/próstata• Endometriosis• Infertilidad/pubertad prematura• Diabetes/síndrome metabólico• Obesidad	<ul style="list-style-type: none">• Enfermedad Alzheimer• Enfermedad Parkinson• Dificultades de aprendizaje
Sistema inmune	Cardiopulmonar
<ul style="list-style-type: none">• Suceptibilidad a infecciones• Enfermedades autoinmunes	<ul style="list-style-type: none">• Asma• Enfermedades del corazón/hipertensión

(Extraído de Bergman *et al.*, 2012).



1. ANTECEDENTES

1.3 Bisfenol A

Bisfenol A (BPA) o 4,4'-dihidroxi-2,2-difenilpropano es un compuesto orgánico formado por dos anillos fenólicos conectados por un solo carbono unido a dos grupos metilo (**figura 1.1**) (Allard, 2014). BPA es uno de los disruptores endócrinos más estudiados (Niu *et al.*, 2015) que puede ocasionar la disrupción de la función de la célula con dosis menores a 0.23 ng/L (Ballesteros *et al.*, 2009).

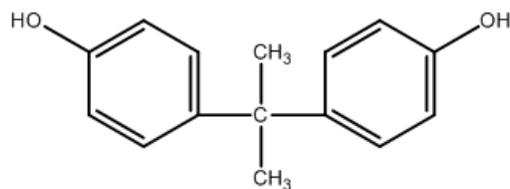


Figura 1.1 Estructura química del bisfenol A (BPA).

Uno de los compuestos químicos industriales más comúnmente usados es el BPA con una producción mundial anual de más de 2.7 millones de toneladas (Vandenberg *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2013). BPA es usado como material para la producción de fenol-resinas, poliacrilatos, poliéster, como aditivo en la producción de cloruro de polivinilo (PVC), en la manufactura de papel térmico, tintas de impresión, superficies de revestimiento, resinas dentales, adhesivos, pinturas, llantas y principalmente para la producción de resinas epoxi y plásticos de policarbonato (EFSA, 2006; Ballesteros *et al.*, 2009).



1. ANTECEDENTES

Las resinas epoxi son utilizadas para el recubrimiento de la superficie en contacto con el alimento en latas, recubrimiento en tapas metálicas, recubrimientos protectores y acabados en tanques de almacenamiento de agua. Los plásticos de policarbonatos son utilizados para empaques y botellas de plástico, biberones y recipientes para microondas (Sungur *et al.*, 2014).

El extenso uso de polímeros basados en BPA sujetos a hidrólisis, y los residuos de monómeros no polimerizados han sido muy difundidos como contaminantes ambientales (Ballesteros *et al.*, 2009). La concentración de BPA en aguas de ríos se encuentra en el rango de 5-320 ng/L, en aguas cloacales de 20-700 ng/L, 2-208 ng/m³ en aire, 0.2-199 ng/g en polvo y 0.1-1859 ng/g en productos alimenticios (Ballesteros *et al.*, 2009; Sungur *et al.*, 2014). Como consecuencia de esto, BPA prevalece en el ambiente diario, lo que se demuestra al ser detectado en orina y suero de más del 90% de la población humana con niveles promedio de 1 a 3 ng/mL (Allard, 2014).

La ingesta es la principal fuente de exposición de BPA en humanos (Chen *et al.*, 2010). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en 2015 estableció una ingesta diaria tolerable temporal (TDI-t) de BPA de 4 µg/kg peso corporal-día (EFSA, 2015).



1.3.1 Bisfenol A y su asociación a mecanismos de disrupción endócrina

En 1938, Dodds y Lawson reportaron por primera vez la actividad biológica de BPA al detectar su actividad estrogénica después de la inyección de una dosis de 100 mg/mL en ovarios de rata (Dodds & Lawson, 1938). En 1993 surgió el primer reporte de la liberación de BPA a partir de plásticos de policarbonato después de haber sido expuesto al calor, de la unión a receptores de estrógenos en mamíferos, aunque con menos afinidad que el estradiol, y de que a concentraciones de nanomolar BPA provoca una respuesta en los receptores de estrógenos de la línea celular MCF-7 (Krishnan *et al.*, 1993).

Posteriormente, en diversos ensayos bioquímicos se experimentó la cinética de unión de BPA a los receptores de estrógenos (ER- por sus siglas en inglés- *estrogen receptors*) y se ha determinado que BPA se une con ambos receptores ER α y ER β , con aproximadamente 10 veces mayor afinidad a este último (Gould *et al.*, 1998; Kuiper *et al.*, 1998; Pennic *et al.*, 1998).

La afinidad de BPA para los receptores de estrógenos es de 10,000-100,000 más débil que para estradiol; sin embargo, estudios recientes de los mecanismos de acción de BPA han revelado una variedad de rutas a través de las cuales BPA puede estimular la respuesta de la célula a muy bajas concentraciones (pg/mL) (Welshons *et al.*, 2006; Wetherill *et al.*, 2007).



1. ANTECEDENTES

Un mecanismo de acción del BPA es que logra actuar directamente sobre el DNA alterando la expresión de genes. BPA puede presentarse en su forma oxidada como bisfenol-O-quinona el cual se une covalentemente con desoxiguanosina para formar aductos de DNA *in vitro* e *in vivo* (Atkinson & Roy, 1995; Edmonds *et al.*, 2004). La presencia de aductos de DNA en ratón, seguido de la ingesta de agua que contenía BPA, fue detectado en al menos dos tejidos, hígado y glándulas mamarias (Izzotti *et al.* 2009), esto muestra que BPA induce daños al DNA a concentraciones 1000 veces mayor que las generadas por el estradiol (Iso *et al.*, 2006). En la actualidad está claro que la exposición a BPA altera dramáticamente los patrones de metilación en todo el genoma (Yaoi *et al.*, 2008).

Estudios en modelos murinos han mostrado que BPA puede alterar significativamente la morfogénesis de las glándulas mamarias y 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 administración subcutánea de BPA en altas concentraciones a machos adultos causó el decremento en el peso de los testículos y en la producción de espermatozoides (Takahashi & Oishi, 2003). BPA causa alteraciones dramáticas en los tejidos genitales en hembras, ocasionando malformaciones en el útero en modelos animales de rata y ratón (Suzuki *et al.*, 2002; Markey *et al.*, 2005).



1. ANTECEDENTES

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 precancerígenas 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), 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).

En 2007 una revisión de estudios en modelos de roedores encontró evidencias convincentes de que la exposición durante el desarrollo afecta el cerebro, sistema reproductivo y metabolismo (Richte *et al.*, 2007).

Por lo anterior, la exposición a BPA en las etapas iniciales del desarrollo es especialmente preocupante debido a la evidencia de los efectos adversos. BPA está presente desde la etapa embrionaria del ser humano, esto es demostrado por los niveles de BPA encontrados en la placenta los cuales varían de 1 a 105 ng/g,



1. ANTECEDENTES

mientras que en el feto los niveles están en el rango de 0.2 a 9.2 ng/g (Schonfelder *et al.*, 2002).

En seres humanos el BPA es biotransformado por varias isoformas de UDP-glucuronosiltrasferasas, siendo la forma glucuronada (BPA-gluc) (**Figura 1.2a**) la vía predominante en los humanos para su biotransformación (Volkel *et al.*, 2002). El hígado es el principal sitio de conjugación y el BPA conjugado es 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 (**Figura 1.2b**) llevada a cabo por sulfotrasferasas en el hígado. La sulfatación de BPA reduce drásticamente la concentración de BPA y su actividad al receptor de estrógenos (Snyder *et al.*, 2000; Shimizu *et al.*, 2002; Stowell *et al.*, 2006); 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).

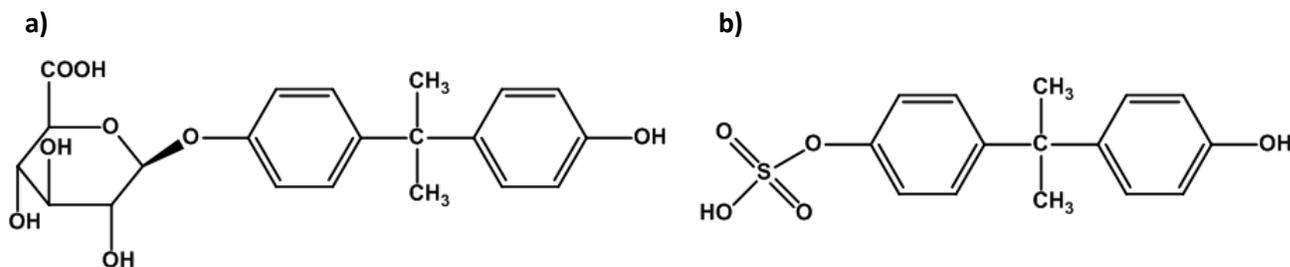


Figura 1.2 a) Bisfenol A-4-p-D-glucurónido; **b)** Bisfenol A-4 sulfato.



1. ANTECEDENTES

Un estudio realizado en Estados Unidos en 2014 indica que la exposición a BPA por fuentes no alimentarias (polvo, aire, agua) representan sólo del 1.4% al 2% de la exposición total de BPA en un rango de edad de 1-20 años, y alimentos no enlatados representaron <1%, lo que sugiere que alrededor del 97% a 98% de todas las exposiciones a BPA son debido al consumo de alimentos enlatados (Christensen & Lorber, 2014).

1.3.2 Resinas epoxi a base de bisfenol A y su uso como recubrimiento en enlatados

Las latas metálicas utilizadas para conservar alimentos están protegidas contra la oxidación, corrosión y contaminación del producto por migración de iones metálicos, comúnmente por un material de recubrimiento como una resina epoxi (Sendon & Paseiro, 2004). Las resinas epoxi a base de BPA son principalmente productos de la condensación de bisfenol A con epiclohidrina (Arpe, 1996) **(Figura 1.3)**.



1. ANTECEDENTES

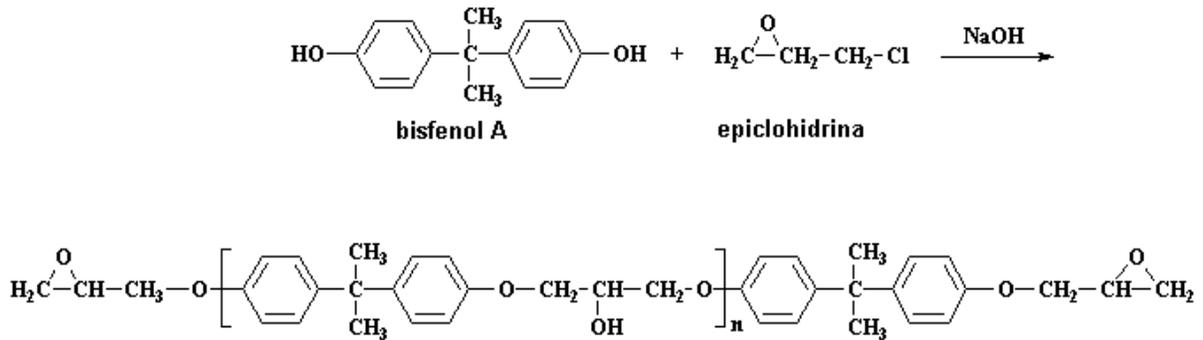


Figura 1.3 Síntesis del prepólmero para la resina epoxi a base de BPA.

La polimerización de la resina epoxi puede no estar completa, lo que significa que una cierta cantidad de monómero residual migre del envase al alimento (Errico *et al.*, 2014). La migración puede incrementarse en latas revestidas que son sometidas al proceso de esterilización y a procesos bajo presión (Brotos *et al.*, 1995).

La concentración de BPA en alimentos y bebidas contenidos en envases metálicos es significativamente alta en comparación con otros materiales de empaque (plásticos, papel, cartón, vidrio) (Sakhi *et al.*, 2014). Se han realizado estimaciones de un consumo de BPA a través del agua embotellada y una cantidad lixiviada de latas para alimentos de 0.17 $\mu\text{g}/\text{día}$ y 20 μg por lata, respectivamente (Allard, 2014; Félix *et al.*, 2013).



1. ANTECEDENTES

En los últimos años se ha analizado la exposición a BPA en la población en general. Estudios han informado que la ingesta de BPA se ha estimado de 30 ng/kg peso corporal-día (Miyamoto *et al.*, 2006; Von Goetz *et al.*, 2010) a 1400 ng/kg peso corporal-día para los adultos que consumen alimentos enlatados (European Union, 2003).

En 2015 Lorber y colaboradores analizaron el contenido de BPA en muestras de alimentos, para lo cual se realizaron dos rondas de muestreo. En la primera ronda BPA fue encontrado en el 73% de las 112 muestras de enlatados evaluadas, mientras que sólo fue encontrado en el 7% de las muestras no enlatadas, en concentraciones bajas. En la segunda ronda el 70% de las muestras enlatados presentaban BPA (esto es 26 muestras de 37), mientras que en sólo 5 de 79 no enlatados, o el 6%, se detectó BPA. La concentración encontrada en estas muestras está en el rango de 0.24 ng/g en durazno fresco a 149.0 ng/g en ejotes enlatados (Lorber *et al.*, 2015).



1. ANTECEDENTES

1.3.3 Exposición de bisfenol A en niños

La exposición infantil es estimada por dos diferentes enfoques. El enfoque “*Forward*” usa información sobre la concentración de BPA en alimentos y otros medios ambientales (aire, agua, etc.) combinando tasas medias de cada ruta de exposición. El enfoque “*Backward*” se basa en un biomonitoreo urinario, extrapolando hacia atrás a la ingesta que habría conducido al nivel de biomarcador observado (Christensen & Lorber, 2014).

El análisis “*Forward*” ha mostrado que el consumo de BPA en Estados Unidos está dominado por el consumo de alimentos enlatados, y los consumos son más altos para las edades jóvenes. La ingesta media estimada oscila entre 125 ng/kg peso corporal-día para niños de 1 año de edad y 73 ng/kg peso corporal-día para un rango de 16-20 años de edad. El consumo basado en biomonitoreo muestra la misma tendencia de menor consumo para edades mayores, con un estimado de 121 a 153 ng/kg pesocorporal-día para edades de 2-6 años, comparado con 33 a 66 ng/kg peso corporal-día para edades de 16-20 años (Christensen & Lorber, 2014).



1. ANTECEDENTES

De manera general, el consumo infantil fue estimado en el rango de 46 a 137 ng/kg peso corporal-día. Este análisis sugiere que los métodos “*Forward*” y “*Backward*” proveen resultados comparables e identifican a los alimentos enlatados como una fuente potencialmente importante de exposición a BPA en niños (Christensen & Lorber, 2014).

La relación inversa entre el consumo de BPA y la edad se debe a que un niño de menor edad consume mayor cantidad de alimentos en relación a su peso corporal respecto a una persona adulta; por ejemplo, un niño entre 1-2 años de edad consume en promedio 113 g alimento/kg peso corporal-día, mientras que un adulto de 16-20 años consume 28 g alimento/kg peso corporal-día (Calafat *et al.*, 2009).

La población infantil representa el sector más vulnerable a BPA y por ello en varios países se han tomado medidas preventivas para disminuir la exposición. En 2008 varios Estados de EUA (California, Connecticut, Maryland, Massachusetts, Minnesota, New York) prohibieron la manufactura, distribución y venta de ciertos juguetes y productos para el cuidado de los niños que contienen BPA. En este mismo año el NTP (*National Toxicology Program*) a través del Centro para la Evaluación de Riesgos en la Reproducción Humana (CERHR) de EUA concluyó que la exposición humana a BPA es preocupante por los efectos en el desarrollo de glándulas de la próstata, cerebro y para los efectos en fetos, y niños (Erler *et al.*, 2010).



1. ANTECEDENTES

En enero de 2011 debido a la relación que existe entre la exposición a BPA y algunos desórdenes patológicos, tales como enfermedades cardiovasculares, obesidad, endometriosis y cáncer, la Unión Europea adopta la directriz 2011/8/EU prohibiendo el empleo de BPA en biberones de policarbonato (*European Commission, 2011*).

En 2012, la FDA (*Food and Drug Administration*) ya no admite el uso de policarbonatos a base de BPA para la fabricación de biberones, tazas para bebés y el uso de resinas epoxi a base de BPA como recubrimiento en empaque para fórmulas infantiles (FDA, 2012, 2013).

A principios de 2015, la EFSA estimó una exposición media de BPA para niños de entre 6 meses a 10 años de edad de 290-375 ng/kg peso corporal-día debido a los alimentos enlatados. A pesar de esto la EFSA concluye que las asociaciones reportadas no aportan pruebas suficientes para inferir una relación entre la exposición de BPA en diversos grupos de edades y los efectos adversos sobre la salud (EFSA, 2015).

Una evaluación confiable de los riesgos a la salud que ocasiona la exposición de BPA se basa fundamentalmente en su identificación inequívoca y determinación precisa en los alimentos. En la actualidad se han desarrollado varias técnicas analíticas para la preparación de la muestra, que constituye el paso más importante en la cuantificación de BPA (Ballesteros *et al.*, 2009).



1.4 Métodos de extracción de bisfenol A en alimentos (Ballesteros *et al.*, 2009)

La determinación de BPA en alimentos usualmente requiere una preparación extensiva de la muestra previa al análisis instrumental. Los pasos típicos en la preparación de la muestra incluyen un pre-tratamiento, extracción, limpieza, concentración y algunas veces derivatización (**figura 1.4**).

La extracción con solventes y la extracción en fase sólida son las técnicas más utilizadas para aislar BPA de muestras sólidas y líquidas, respectivamente, principalmente por su simplicidad y amplio rango de aplicación; sin embargo, las repetidas extracciones con solventes orgánicos que son necesarias para la completa remoción y limpieza de BPA involucran el uso de grandes volúmenes que inevitablemente tienen que ser evaporados para concentrar el analito, esto hace que el tratamiento de la muestra sea laborioso, caro, poco amigable con el ambiente y que consuma mucho tiempo.

Actualmente se han desarrollado diferentes métodos para la determinación de BPA en alimentos; sin embargo, muchas veces es necesario un tratamiento especial dependiendo de la composición de la matriz; por ejemplo, las bebidas carbonatadas son desgasificadas, las muestras con alto contenido de proteína requieren la remoción de las proteínas por precipitación, los alimentos enlatados son usualmente filtrados y llevado a cabo un tratamiento de separación.



1. ANTECEDENTES

En general, la combinación de diferentes técnicas de extracción y limpieza es usualmente inevitable, y frecuentemente los métodos llegan a ser dependientes de la matriz por lo que pueden existir tantas técnicas de extracción como matrices alimentarias. La **figura 1.4** resume las técnicas de extracción de BPA en alimentos más estudiadas.



1. ANTECEDENTES

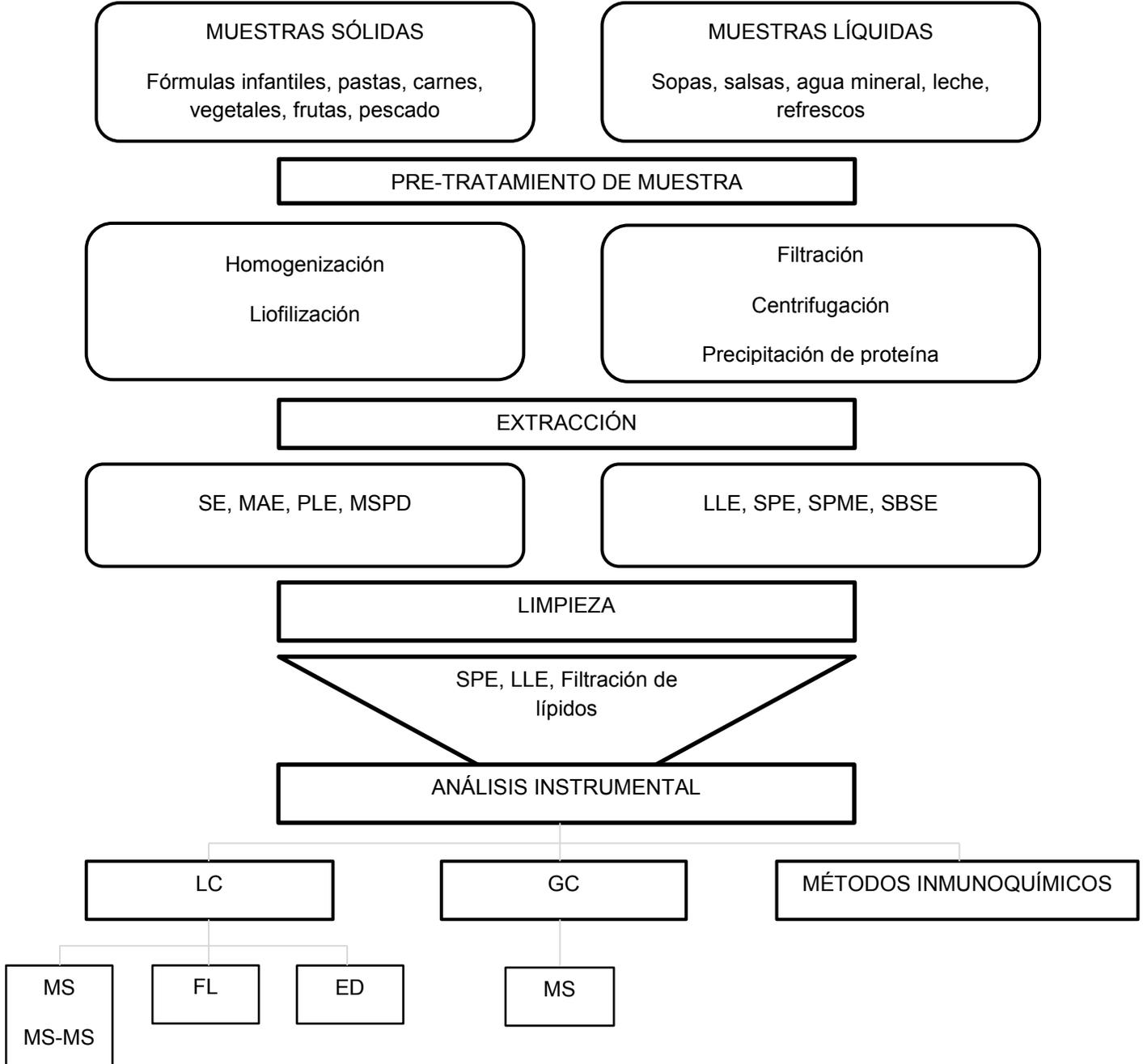


Figura 1.4 Métodos analíticos para determinar bisfenol A en alimentos. Abreviaturas: SE, extracción con solvente; MAE, extracción asistida con microondas; PLE, extracción con líquido presurizado; MSPD, dispersión con matriz en fase sólida; LLE, extracción líquido-líquido; SPE, extracción en fase sólida; SPME, microextracción en fase sólida; SBSE, extracción de barras magnéticas; MS, detector de masas, FL, detector de fluorescencia; ED, detector electroquímico (Extraído de Ballesteros *et al.*, 2009).



1. ANTECEDENTES

Otras técnicas, como la extracción asistida con microondas, extracción con líquidos presurizado, dispersión en fase sólida, microextracción en fase sólida, extracción de barras magnéticas, extracción con fluido supercrítico, que actualmente se están desarrollando, pueden mejorar la separación de BPA en términos de consumo de tiempo y solventes orgánicos, automatización y tamaño de muestra.

1.4.1 Extracción de bisfenol A utilizando CO₂ supercrítico

Desde la década de 1990, se ha visto un aumento en la publicación de trabajos que describen las propiedades y aplicaciones de los fluidos supercríticos, en particular el dióxido de carbono y el agua supercríticos. Uno de los estímulos para este interés es la búsqueda de solventes verdes que sustituyan los compuestos orgánicos volátiles (Housecroft & Sharpe, 2006).

Un fluido supercrítico posee propiedades de solvente que se parecen a las de un líquido, pero también exhibe propiedades de transporte parecidas a las de un gas. De esta manera un fluido supercrítico no solo puede disolver solutos, sino que también es miscible con los gases ordinarios y puede penetrar en los poros de los sólidos (Housecroft & Sharpe, 2006). En un fluido supercrítico al aumentar la presión no existirá licuefacción y al aumentar la temperatura no se formará un gas (Vega, 2010).



1. ANTECEDENTES

Los fluidos supercríticos tienen una viscosidad más baja y un coeficiente de difusión más elevado que los líquidos. La densidad de un fluido supercrítico aumenta al aumentar la presión y, al aumentar la densidad, la solubilidad de un soluto en el fluido supercrítico aumenta considerablemente. (Housecroft & Sharpe, 2006).

El hecho de que las propiedades puedan ajustarse variando la presión y la temperatura tiene 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 fluido 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 reutilizarse invirtiendo el cambio en las condiciones de temperatura y presión (Housecroft & Sharpe, 2006).

La extracción utilizando fluidos supercríticos como solventes es una nueva tecnología verde para remover contaminantes químicos, una alternativa al uso de extracciones con solventes orgánicos ya que ofrece ventajas al ambiente, la salud, y a los procesos químicos. Los beneficios al ambiente residen en que estos fluidos pueden sustituir el uso y demanda de solventes orgánicos y disminuir el consumo de energía, los beneficios a la salud se deben a que los fluidos supercríticos más utilizados (H₂O y CO₂) son no cancerígenos, no tóxicos, no mutagénicos, no inflamables, se presentan con alta pureza y son termodinámicamente estables; en



1. ANTECEDENTES

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 de componentes que es posible utilizando cambios en los parámetros de proceso (Jin *et. al.*, 2013; Anggrianto *et al.*, 2014).

El CO₂ es el fluido supercrítico más comúnmente usado debido a su baja temperatura crítica (31.1 °C) y su moderada presión crítica (72.8 bar). Además, el CO₂ también muestra ventajas de no toxicidad, no flamable, no explosivo y fácilmente disponible a bajo costo (Jin *et. al.*, 2013). La **figura 1.5** muestra el diagrama de fases del CO₂.

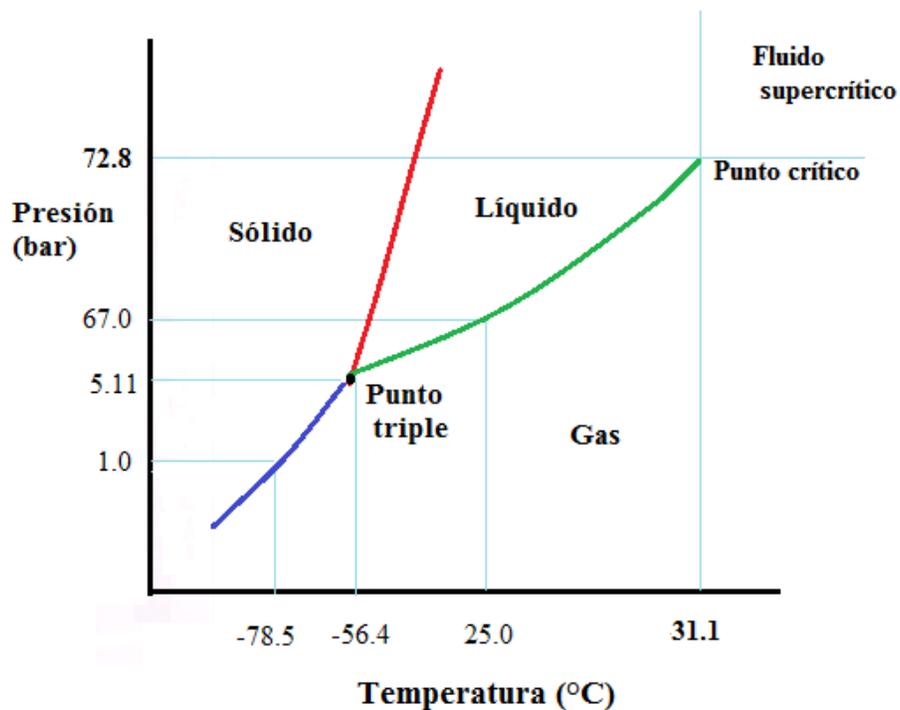


Figura 1.5 Diagrama de fases del CO₂.



1. ANTECEDENTES

La extracción de compuestos de fuentes naturales con fluidos supercríticos ha sido usada con gran éxito en comparación con técnicas convencionales (Herrero *et al.*, 2010; Boutin *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2011; Zahedi & Azarpour, 2011). Se ha reportado la extracción de BPA en lodos mediante CO₂ supercrítico, obteniendo rendimientos muy variables de << 10% (Meesters & Schöder, 2002) y > 90 % (Lee & Peart, 2000).

Algunas áreas en las que el CO₂ en estado supercrítico es comercialmente importante son en los procesos de extracción de la industria alimentaria, la industria tabaquera (extracción de nicotina) y la farmacéutica. El CO₂ supercrítico 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 del lúpulo en la industria cervecera. La extracción de pesticidas del arroz también se realiza comercialmente utilizando CO₂ supercrítico. Estos son algunos de los ejemplos de aplicaciones comerciales de esta tecnología ambientalmente limpia y es de esperarse que en años próximos haya un aumento en el uso de fluidos supercríticos en procesos industriales (Housecroft & Sharpe, 2006). Cabe señalar que al día de hoy no existe reporte alguno referente a la extracción de BPA en matrices alimentarias empleando CO₂ en estado supercrítico.



2. JUSTIFICACIÓN

Bisfenol A (BPA) es un compuesto químico industrial cuya producción global anual es de más de 2.7 millones de toneladas. Uno de los principales usos del BPA es en la síntesis de resinas epoxi que son empleadas en recubrimientos para latas. La ingesta es considerada como la principal vía de exposición a BPA y los alimentos enlatados constituyen la mayor fuente de este compuesto químico. La exposición infantil a BPA es especialmente preocupante debido a la evidencia de los efectos que provoca sobre el desarrollo en los seres humanos y animales; por ejemplo, diversos bioensayos han mostrado los efectos del BPA en el desarrollo embrionario, cerebral, metabólico, del sistema endócrino y reproductivo en modelos animales. Las extracciones de contaminantes químicos por métodos convencionales emplean una cantidad considerable de solventes orgánicos volátiles dañinos a la salud y al medio ambiente. En contraste, la extracción de compuestos a través del uso de fluidos supercríticos (SFE- por sus siglas en inglés, *supercritical fluid extraction*) es un método verde, accesible, sin el consumo de solventes, que permite mayor transferencia de masa, y por lo tanto minimiza el tiempo y trabajo de extracción respecto a las técnicas convencionales. Por lo anterior, se considera que el uso y optimización de una técnica SFE para la detección del contenido de BPA en alimentos enlatados constituye un paso importante para generar una opción sustentable de análisis.



3. HIPÓTESIS

Preguntas de Investigación.

¿Es posible utilizar la extracción asistida con CO₂ supercrítico como un pre-tratamiento para la cuantificación de BPA en alimentos por cromatografía de gases?

¿Es posible extraer BPA de cereal enlatado empleando CO₂ supercrítico?

¿La extracción de BPA en alimentos empleando CO₂ supercrítico obtiene mejores rendimientos que una extracción convencional por Soxhlet?



4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Desarrollar una técnica de extracción de BPA utilizando como solvente CO_2 en estado supercrítico y con ello proponer un método de pre-tratamiento para la cuantificación de BPA por cromatografía de gases acoplado a masas.

4.2 Objetivos particulares

- Extraer BPA de una muestra de cereal enlatado para infantes empleando CO_2 en estado supercrítico.
- Comparar el porcentaje de extracción de BPA utilizando CO_2 en estado supercrítico con el obtenido mediante una extracción convencional con acetonitrilo por el método de Soxhlet.
- Proponer un método de pre-tratamiento asistido con CO_2 supercrítico para la determinación de BPA en alimentos por cromatografía de gases acoplado a masas.



5. METODOLOGÍA

5.1 Estrategia experimental

La **figura 5.1** muestra la estrategia experimental llevada a cabo en este trabajo. La primera etapa de la experimentación fue la prueba de concepto: la extracción de fenoles de una muestra dopada con indofenol utilizando CO_2 supercrítico. Se variaron las condiciones de proceso presión y temperatura para encontrar las que permitieran obtener un mayor porcentaje de extracción. Una vez que se obtuvieron resultados positivos de la prueba de concepto se realizó la extracción de BPA de una muestra dopada con BPA y de muestra sin dopar. Paralelo a la extracción con CO_2 supercrítico, se realizó la extracción de BPA de la muestra sin dopar mediante un método convencional de extracción con acetonitrilo en Soxhlet para comparar el porcentaje de recuperación de BPA utilizando CO_2 supercrítico contra la metodología convencional de extracción Soxhlet. Para evaluar la cantidad de monómero residual que presenta una lata antes de ser utilizada y que puede ser removido con CO_2 supercrítico, se probó extraer BPA de un trozo de lata mediante la técnica asistida con CO_2 supercrítico.

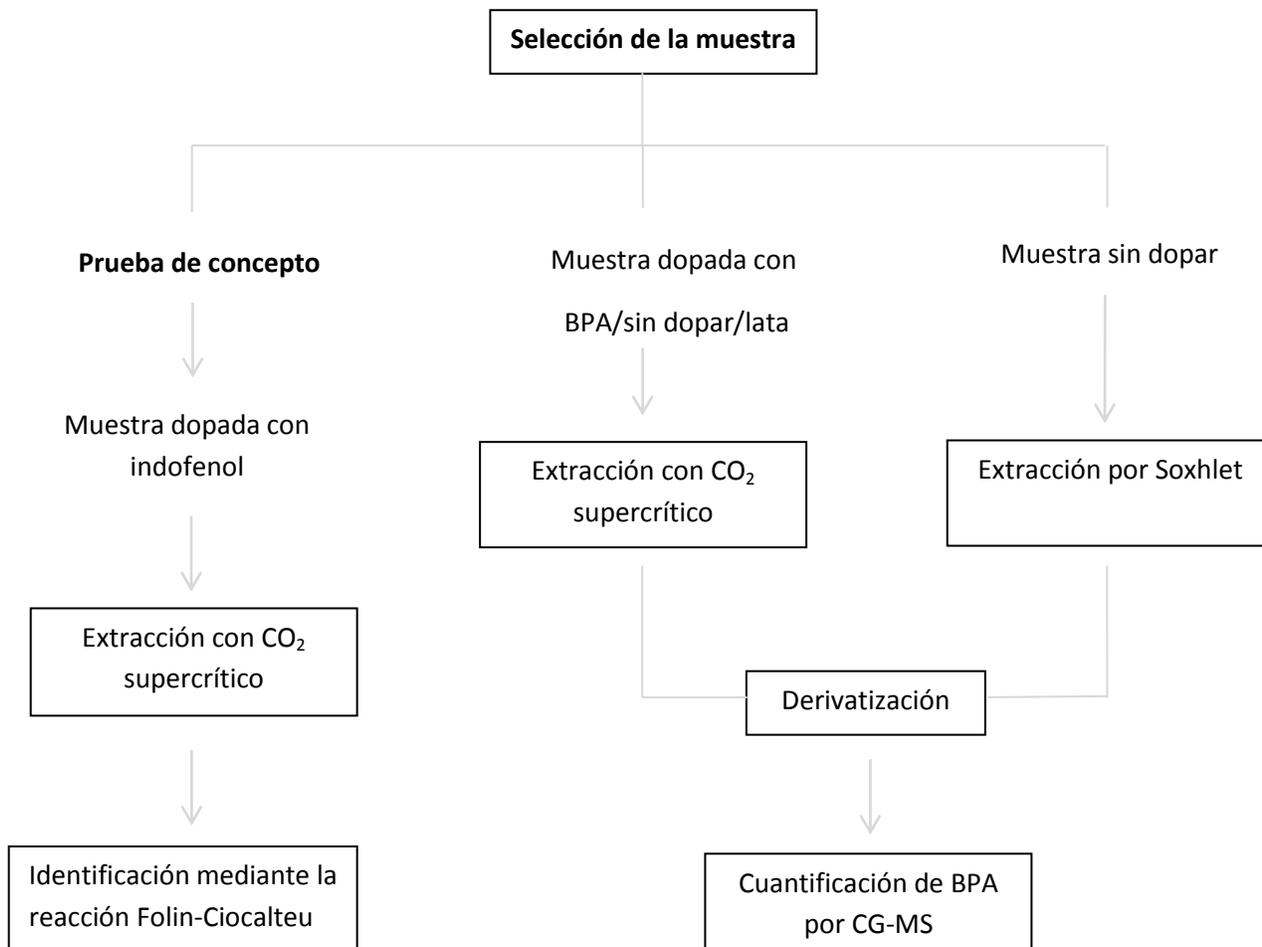


Figura 5.1 Diagrama experimental.

5.2 Muestra

La muestra evaluada fue una mezcla comercial de cereales para bebé envasada en latas de hojalata con recubrimiento de resinas epoxi. Se eligió este alimento porque se trata de una muestra con bajo contenido de grasa que posiblemente pueda interferir en la técnica de extracción.



5.3 Extracción con CO₂ supercrítico

10 gramos de muestra fueron utilizados para la experimentación. La **figura 5.2** muestra el diagrama esquemático del equipo utilizado para la extracción. La muestra se colocó en una canastilla de acero inoxidable para permitir una mayor remoción del analito de la muestra. La canastilla se introdujo dentro del reactor. Se utilizó un reactor de 100 mL (**figura 5.3**). La presión fue variada de 80 a 300 bar, y la temperatura de 50 °C a 80 °C para encontrar las mejores condiciones de extracción. La velocidad de flujo del CO₂ fue de 20 mL/min.

Se realizaron 3 lotes de extracción. Lote 1, muestra agregando una concentración conocida (dopada) de indofenol; lote 2, muestra dopada con BPA; lote 3, muestra sin dopar. La extracción se llevó a cabo en estado estacionario con un periodo de experimentación de 60 min. Las condiciones anteriores fueron basadas en estudios de extracción de fenoles en matrices vegetales utilizando CO₂ supercrítico (Anggrianto *et al.*, 2014, De Melo *et al.*, 2014) y en la solubilidad de BPA en CO₂ supercrítico (Jin *et. al.*, 2013).

Terminada la etapa de extracción para los lotes 1 y 2 se liberó el gas y se utilizaron 2 mL de agua (lote 1) y 4 mL de acetonitrilo (lote 2) para disolver y remover el analito. En el lote 3 una vez terminado el tiempo de extracción se disminuyó la temperatura del reactor hasta 5 °C aproximadamente, y con ello descendió la presión hasta 40 bar, se liberó el gas y se realizaron lavados en las



5. METODOLOGÍA

paredes externas de la canastilla e internas del reactor con 30 mL de acetonitrilo para remover el BPA. Se evaporó el solvente hasta aproximadamente 10 mL.

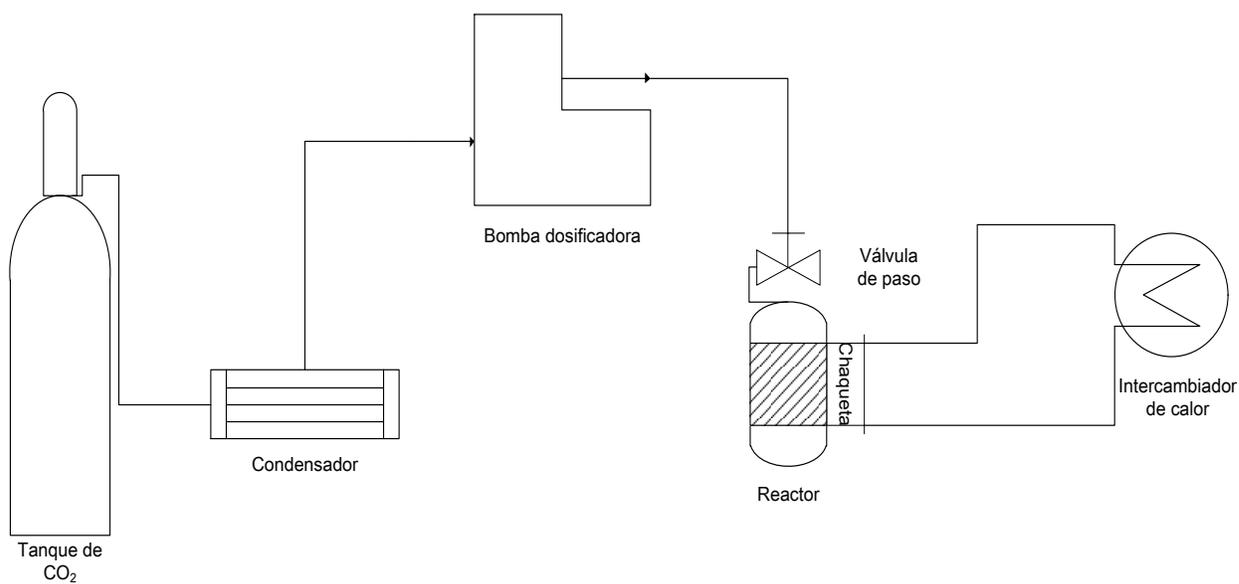


Figura 5.2 Diagrama esquemático del equipo utilizado para la extracción con CO₂ supercrítico.



Figura 5.3 Reactor de 100 mL utilizado para la extracción con CO₂ supercrítico.

5.4 Cuantificación analítica de fenoles. Método Folin-Ciocalteu

1 mL de muestra fue transferido a tubos con 5 mL de solución 1/10 de reactivo de Folin-Ciocalteu. Se agregó 4 mL de solución de carbonato de sodio (7.5% w/w). Se agitó y posteriormente se reposó por 60 minutos a temperatura ambiente, y se midió la absorbancia a 765 nm (Ferrado *et al.*, 2008). Se realizó una curva patrón de indofenol de 20 a 100 ppm.



5.5 Extracción convencional. Técnica Soxhlet

10 gramos de muestra fueron analizados. La muestra se colocó en un cartucho de celulosa. Se utilizaron 200 mL de acetonitrilo para la extracción. La temperatura de extracción fue de 104 °C en un periodo de 5 horas. La **figura 5.4** muestra el equipo Soxhlet utilizado para la extracción.

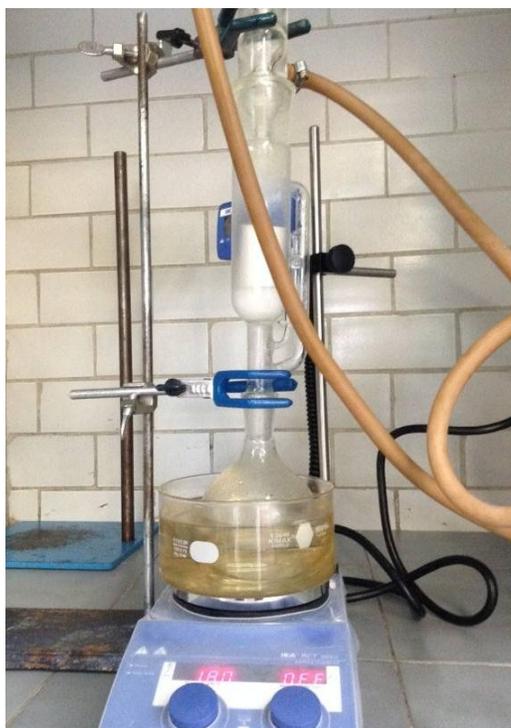


Figura 5.4 Equipo Soxhlet utilizado para la extracción de BPA con acetonitrilo.



5.6 Análisis instrumental

5.6.1 Derivatización

10 mL de solución K_2CO_3 1 M y 200 μ L de anhídrido acético se añadieron a 1 mL de extracto seguido de agitación a baja velocidad. Otros 200 μ L de anhídrido acético se agregaron después de 5 minutos, se continuó agitando por 10 minutos. 5 mL de iso-octano se adicionaron a las muestras. Se ajustó pH por arriba de 10 con 0.5 mL de solución K_2CO_3 3 M y se verificó usando tiras indicadoras de pH. Se añadió 100 μ L más de anhídrido acético, se agitó por 10 minutos. Se reposó por 10 minutos para la formación de dos fases. La fase de iso-octano se transfirió a una columna de vidrio empacada con Na_2SO_4 . La fase acuosa se re-extrajo con 5 mL de tolueno. La fase de tolueno se transfirió a la columna de Na_2SO_4 . Se evaporó el solvente de la muestra a temperatura ambiente hasta sequedad. El extracto se aforó a 1 mL con tolueno. La muestra se transfirió a viales de cromatografía de gases para su análisis (Cao *et al.*, 2009).



5.6.2 Cromatografía de gases

Se utilizó un cromatógrafo de gases acoplado a detector de masas (CG-MS) con monitoreo de ion selectivo (Sistema GC 6890N network, y detector selectivo de masas 5973 network, Agilent Technologies) para la cuantificación analítica de BPA. Las condiciones empleadas se basaron en un reporte previo de análisis de BPA en alimentos para infantes (Cao *et al.*, 2009), y se muestran en la **tabla 5.1**.

Tabla 5.1. Condiciones empleadas en la determinación de BPA por cromatografía de gases acoplado a masas.

Gas acarreador	Helio
Velocidad de flujo	1.2 mL/min
Temperatura del inyector	280 °C
Volumen de muestra inyectada	1 mL
Rampa de temperatura	
Temperatura inicial	100 °C durante 1 min
Temperatura intermedia	225 °C durante 5 min
Temperatura final	325 °C durante 1 minuto



5.7 Extracción de bisfenol A en lata con CO₂ supercrítico

Se cortó un rectángulo de 15 cm² de lata. Se realizó la extracción con CO₂ supercrítico con las siguientes condiciones: 300 bar, 60 °C, con una velocidad de flujo de 20 mL/min y un periodo de extracción de 60 minutos. Una vez pasado el periodo de extracción se disminuyó la temperatura del reactor hasta 5 °C aproximadamente, y con ello descendió la presión hasta 40 bar, se liberó el gas y se realizaron lavados en las paredes externas del reactor y en la superficie del trozo de lata con 30 mL de acetonitrilo para remover el BPA; se evaporó el solvente hasta aproximadamente 10 mL.

Finalmente la muestra se derivatizó y analizó por cromatografía de gases acoplado a masas como ya se ha descrito anteriormente.



6. RESULTADO Y DISCUSIÓN

6.1 Prueba de concepto. Extracción de fenoles con CO₂ supercrítico

6.1.1 Cuantificación de fenoles mediante la reacción Folin-Ciocalteu

Se realizó una curva patrón de indofenol (**figura 6.1**) mediante la reacción Folin-Ciocalteu para la cuantificación de fenoles y con ello la determinación del grado de extracción al utilizar CO₂ supercrítico como solvente. Se utilizó indofenol para la experimentación por su menor grado toxicológico en comparación con el BPA, su mayor disponibilidad y su estructura química similar al BPA (**figura 6.2**).

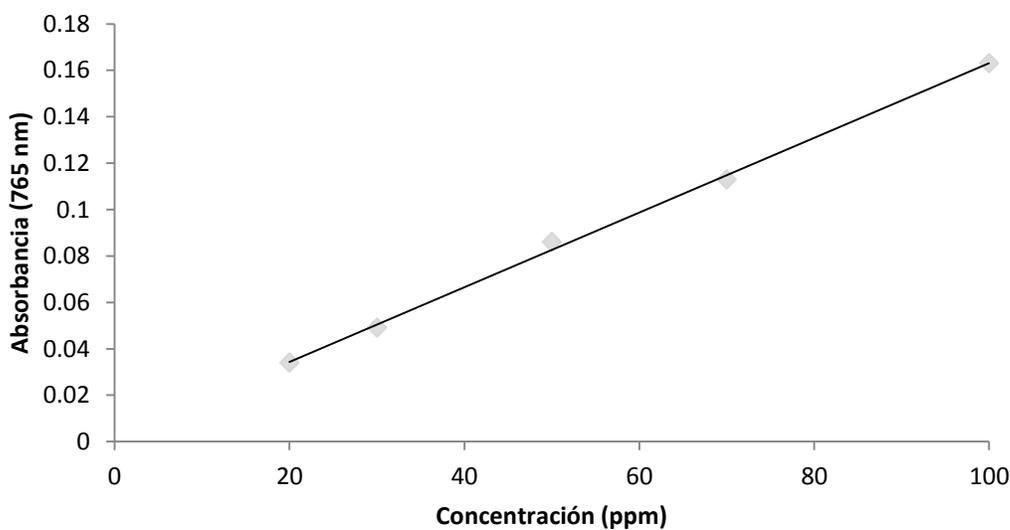


Figura 6.1 Curva patrón de Indofenol. Factor de correlación: $R^2 = 0.9984$.

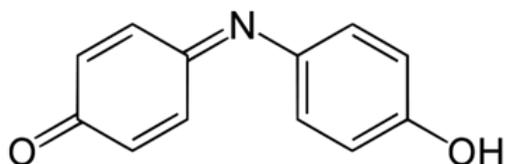


Figura 6.2 Estructura química del Indofenol.

6.1.2 Extracción de indofenol con CO₂ supercrítico.

Se desarrolló y optimizó el proceso de extracción asistido con CO₂ supercrítico modificando las variables presión y temperatura para obtener el mejor rendimiento de extracción.

A la muestra de cereal se le agregó una concentración conocida de indofenol para probar la viabilidad de la técnica y encontrar las condiciones de presión y temperatura que permitan obtener el mayor rendimiento en la extracción. Para posteriormente aplicar estas condiciones en la extracción de BPA. La **tabla 6.1** muestra los rendimientos de extracción en las corridas realizadas.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6.1 Rendimientos de extracción de indofenol con diferentes condiciones de proceso.

<i>Corrida</i>	<i>Presión (bar)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Concentración Inicial (ppm)</i>	<i>Concentración extraída (ppm)</i>	<i>Rendimiento de extracción (%)</i>
1	80	55	122.1	ND	ND
2	150	55	313.1	25.6	8.2
3	150	60	138.4	12.4	8.8
4	150	75	276.2	11.2	4.0
5	150	80	253.5	6.8	2.7
6	260	60	119.6	6.8	5.7
7	300	60	139.3	19.9	14.3

ND = No Detectado.

El mayor rendimiento en la extracción de indofenol se obtuvo con presión de 300 bar y 60 °C (14.3%). La **tabla 6.2** muestra las condiciones de proceso utilizadas en trabajos previos de extracción de fenoles con CO₂ supercrítico, así como los rendimientos de extracción reportados bajo esas condiciones.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6.2 Condiciones de proceso y rendimientos de extracción de fenoles de matrices naturales mediante CO₂ supercrítico reportados en trabajos previos.

<i>Matriz</i>	<i>Presión (bar)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Rendimiento de extracción (%)</i>	<i>Co-solvente (% EtOH)</i>	<i>Referencia</i>
Pimienta negra	90-150	40-50	0-12		Perakis <i>et al.</i> , 2005
Tomillo	80-400	40	0.5-4		Zekovic <i>et al.</i> , 2000
<i>Hibiscus</i>	534	80	11		Holser <i>et al.</i> , 2004
<i>Cuphea</i>	270	50	28		Eller <i>et al.</i> , 2011
Romero	100-400	40	0.5-3	0-7	Herrero <i>et al.</i> , 2010
Canola	300-500	40-60	2-10	10	Li <i>et al.</i> , 2010
Té	300-400	60-80	7-30	0-15	Rajaei <i>et al.</i> , 2005
Eucalipto	300	50-70	0.3-0.5	15-20	Santos <i>et al.</i> , 2012
Maravilla	300-689	50	0.5-5.5	0.5-20	Hamburger <i>et al.</i> , 2004

(Adaptado de De Melo *et al.*, 2014).

La **tabla 6.2** muestra que el rango de presión reportado para la extracción de fenoles (80-689 bar) es considerablemente mayor que el empleado en este trabajo (80-300 bar). Para este trabajo se seleccionó 300 bar como presión máxima con el objetivo de no comprometer la capacidad del equipo utilizado y la seguridad en el trabajo de laboratorio. El rango de temperatura reportada en trabajos previos es similar al utilizado en este trabajo.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los rendimientos de extracción para fenoles mostrados en la **tabla 6.2** son comparables con los obtenidos en la extracción de indofenol (**tabla 6.1**). Cabe señalar que cada compuesto químico tiene un comportamiento particular en las extracciones con fluidos supercríticos debido a la solubilidad en el fluido, la cual se modifica al variar las condiciones de proceso (presión y temperatura).

Muchas de las investigaciones de extracción utilizando fluidos supercríticos reportan el uso de un co-solvente, como se observa en la **tabla 6.2**, el cual permite modificar la polaridad del solvente, haciéndolo más selectivo para determinado analito, y con ello mejorar el rendimiento de extracción. En este trabajo no se utilizó un co-solvente porque se pretende diseñar un método de pre-tratamiento ambientalmente limpio, libre de solventes orgánico.

La extracción con fluidos supercríticos es tradicionalmente definida como una tecnología que utiliza altas presiones y esta variable es de hecho de gran importancia por muchos aspectos técnicos y económicos. La propiedad más propensa a ser afectada por la variación de presión es la densidad, que puede modificar el poder del solvente como líquido. Cuando se estudia la influencia de la densidad sobre el comportamiento de la extracción con fluidos supercríticos (íntimamente relacionada con el poder del solvente), la presión es la variable que se prefiere modificar ya que ofrece un rango considerablemente amplio para su manipulación, más que la temperatura (De Melo *et al.*, 2014).



6.1.3 Efecto de la presión y la temperatura sobre el rendimiento de extracción

La solubilidad aumenta cuando aumenta la presión, esto es porque la interacción entre las moléculas del solvente y las del soluto también aumenta causando el incremento en la solubilidad del sólido en el CO₂ supercrítico (Jin *et al.*, 2013).

Al aumentar la presión del sistema la densidad del CO₂ supercrítico aumenta (**figura 6.3**), y al aumentar la densidad, la solubilidad de un soluto en el fluido supercrítico aumenta de manera considerablemente (Jin *et al.*, 2013). Lo anterior explica el mayor rendimiento de extracción al aumentar la presión del sistema manteniendo la temperatura constante, como es el caso de 80 y 150 bar a 55°C, y 150 y 300 bar a 60 °C.

La **figura 6.3** muestra las isotermas de la relación densidad-presión para el CO₂, la isoterma en 57 ° C que se muestra en azul, es la que se aproxima más a 55° C, temperatura a la cual la solubilidad de BPA en CO₂ es mayor (Jin *et al.*, 2013).



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

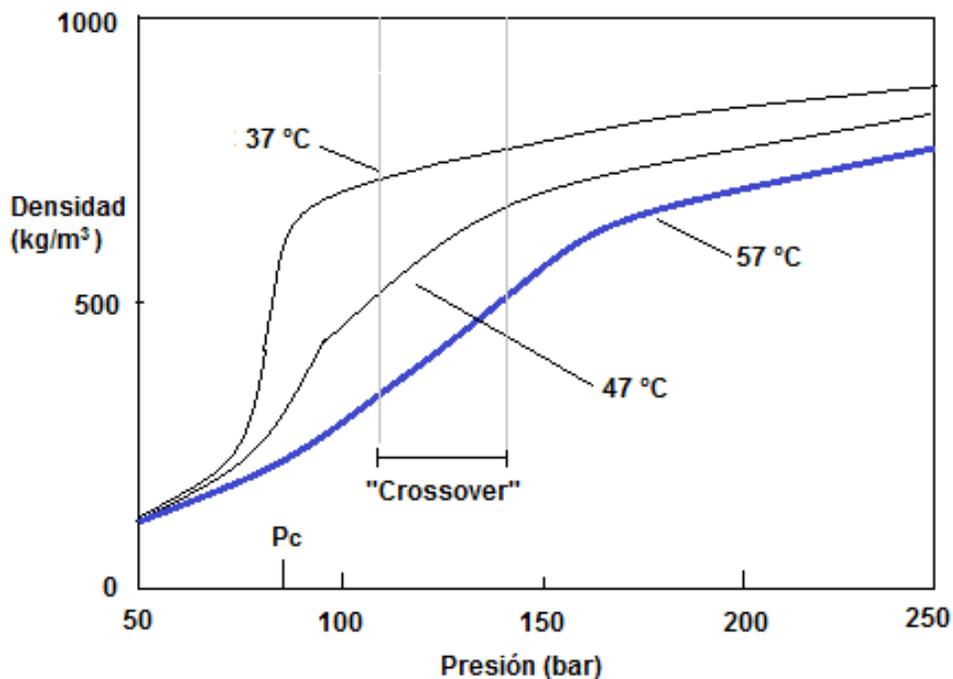


Figura 6.3 Isothermas de densidad-presión para el CO₂. (Adaptado de Williams & Clifford, 2000).

La temperatura tiene doble efecto sobre la solubilidad, el aumento en la energía media de las moléculas aumenta la probabilidad de interacción entre las moléculas del soluto y las del solvente y así aumenta la solubilidad. El decremento en el número de moléculas de solvente, reduce la probabilidad de interacción entre moléculas. Esta combinación de efectos de temperatura genera una región de intercambio entre 110 y 140 bar, conocida generalmente como “crossover” (figura 6.3) en donde el aumento de temperatura, manteniendo la



presión constante, genera un decremento en la solubilidad del BPA en CO₂ supercrítico (Jin *et. al.*, 2013).

El efecto de la región de intercambio probablemente genera el decremento del porcentaje de extracción de indofenol al mantener la presión constante, a 150 bar, y aumentar la temperatura en el rango de 60 a 80 °C.

6.2 Extracción de bisfenol A de cereal, mediante CO₂ supercrítico

Una vez que se obtuvieron resultados positivos en la prueba de concepto con fenoles, se realizó la extracción de BPA. Primero se llevó a cabo la extracción en una muestra dopada (agregando una concentración conocida) de BPA, para conocer el comportamiento de BPA en el CO₂ supercrítico; posteriormente, se realizó la extracción en una muestra sin dopar.



6.2.1 Extracción en muestra dopada

La muestra de cereal se dopó con una concentración conocida de BPA para asegurar una lectura en la reacción Folin-Ciocalteu y cuantificar el rendimiento de extracción. Se probaron las dos mejores condiciones de extracción de indofenol: 300 bar/60 °C y 150 bar/60 °C para conocer el comportamiento de BPA en el fluido supercrítico y evaluar el efecto de la densidad del CO₂ supercrítico sobre el rendimiento de extracción en la isoterma a 60°C (ver **figura 6.3**). La temperatura seleccionada (60 ± 5 °C) ha sido reportada por Jin y colaboradores con la mayor solubilidad de BPA en CO₂ supercrítico (Jin et al., 2013). La **tabla 6.3** resume los resultados de la extracción de BPA en muestra dopada, y la **figura 6.4** muestra el resultado de la reacción de Folin-Ciocalteu llevada a cabo para identificar la extracción de BPA.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6.3 Rendimiento de extracción de BPA a diferentes condiciones de proceso.

<i>Corrida</i>	<i>Presión (bar)</i>	<i>Temperatura (°C)</i>	<i>Concentración inicial (ppm)</i>	<i>Concentración extraída (ppm)</i>	<i>Rendimiento de extracción (%)</i>
1	150	60	219.5	18.1	8.2
2	300	60	229.6	56.8	24.7

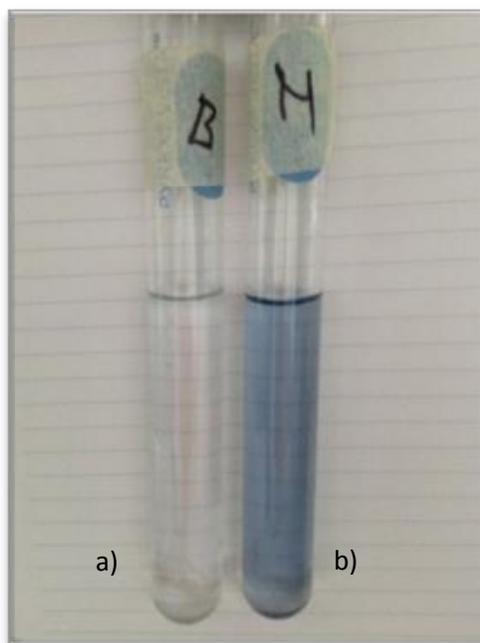


Figura 6.4 Extracción de BPA de una muestra dopada, identificación mediante la reacción de Folin-Ciocalteu, **a)** Blanco de reactivos; **b)** BPA extraído.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La **tabla 6.3** muestra que el rendimiento de extracción aumenta considerablemente al incrementar la presión de 150 bar a 300 bar, manteniendo la temperatura constante. Lo anterior comprueba lo establecido en la **figura 6.3**, al aumentar la presión del sistema la densidad del CO₂ supercrítico aumenta, con ello incrementa la solubilidad del BPA en el fluido supercrítico y esto permite obtener mayores rendimientos de extracción.

Los resultados muestran que a las condiciones de 300 bar/60 °C el CO₂ supercrítico es 72.7% más selectivo para BPA que para indofenol. Las condiciones anteriores se probarán en la extracción de BPA de la muestra de cereal sin dopar.

Los estudios de extracción de BPA mediante fluidos supercríticos son escasos. Sólo se ha reportado en dos ocasiones (Lee & Peart, 2000 y Meesters & Schöder, 2002) la extracción de BPA con fluidos supercríticos en matrices de lodos; sin embargo, a la fecha no existe reporte alguno de extracción de BPA de alimentos utilizando fluidos supercríticos.

En uno de los estudios de extracción de BPA en lodos se utilizaron temperaturas de 80 y 150 °C, presiones de 140 y 300 bar, con metanol y ácido fórmico como co-solventes, en este estudio y bajo estas condiciones, se obtuvieron rendimientos de extracción <<10% (Meesters & Schöder, 2002). En contraste, se logran porcentajes de recuperación >90 % en muestras de lodos al realizar una acetilación *in situ* de fenoles en presencia de pequeñas cantidades (μL) de



anhídrido acético y trietilamina bajo las condiciones de extracción del CO₂ supercrítico (80 °C/370 bar) (Lee & Peart, 2000).

Por ello, entre los factores que intervienen para lograr rendimientos altos en las extracciones asistidas con fluidos supercríticos están principalmente las condiciones de presión y temperatura empleadas, la solubilidad del analito en el fluido supercrítico, la metodología de recuperación, el tratamiento de la muestra y el uso de co-solventes.

6.2.2 Extracción en la muestra de cereal

Una vez establecidas las condiciones que permiten extraer un mayor porcentaje de BPA (60 °C/300 bar), se evaluó la muestra de cereal sin dopar. Cabe señalar, que en ambos casos (cereal dopado/cereal sin dopar) el contenido de BPA se adsorbe en el cereal sin ninguna evidencia o reporte de interacción química. La muestra se sometió al proceso de extracción por un periodo de 60 min a 60 °C/300 bar, se utilizó acetonitrilo para recuperar el BPA extraído, posteriormente se derivatizó y cuantificó mediante cromatografía de gases acoplado a masas.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha probado la solubilidad del BPA en CO₂ supercrítico (Jin *et. al.*, 2013). En este estudio se muestra que cuando el tiempo de reacción entre el BPA y el CO₂ supercrítico es menor a 30 minutos la fracción mol de BPA cambia considerablemente, mientras que la fracción mol se mantiene aproximadamente constante y toma su máximo valor cuando el tiempo de equilibrio es más de 30 minutos. Por lo anterior se eligió un periodo de extracción de 60 minutos, para asegurar que se ha logrado la máxima solubilidad de BPA en CO₂ supercrítico.

La **tabla 6.4** presenta la concentración de BPA encontrada en el cereal enlatado en las cinco repeticiones realizadas, cabe señalar que la muestra se tomó de la misma lata de cereal para las 5 repeticiones. Se utilizó una curva patrón de BPA con $R^2 = 0.9977$ (**Anexo I**). La **figura 6.5** muestra los cromatogramas de BPA en la muestra de cereal, el pico con tiempo de retención de 9.5 min corresponde a BPA.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6.4 Concentraciones de BPA extraída de la muestra de cereal enlatado utilizando CO₂ supercrítico.

Repetición	Concentración (ng/g)
1	415.5
2	390.2
3	354.5
4	223.4
5	214.9
Promedio	319.7 ng/g
Desviación estándar	94 ng/g
Coefficiente de variación	29.5 %



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

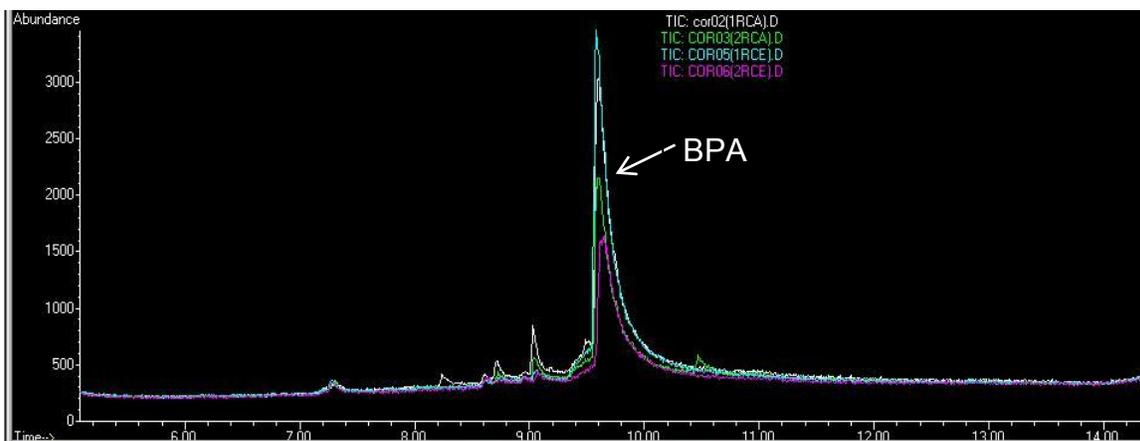


Figura 6.5 Cromatogramas de la muestra de cereal sin dopar. La señal de BPA aparece en 9.5 minutos.

Como se puede observar en la **figura 6.6**, la extracción de BPA empleando CO_2 en estado supercrítico es selectiva, ya que no aparecen otras señales en el cromatograma como pudieran ser compuestos fenólicos solubles, no solubles o ligandos, tales como el ácido ferúlico, entre otros (De la Parra *et al.*, 2007); sin embargo, se obtiene una desviación estándar alta por lo que es necesario estandarizar la metodología.



6.3 Extracción de bisfenol A de la muestra de cereal mediante la técnica convencional Soxhlet

Se realizó la extracción de BPA mediante la técnica Soxhlet del mismo lote de cereal que se utilizó en la extracción con CO₂ supercrítico. Para la extracción Soxhlet se utilizó acetonitrilo como solvente, con un periodo de extracción de 5 horas, ya que se ha reportado la recuperación del 80-95% del BPA presente en muestras de lodo con un periodo de extracción menor a 4 horas (Meesters & Schröder, 2002). En este caso se realizó la extracción por 5 horas para asegurar una recuperación del 100% del BPA contenido en la muestra. El objetivo de realizar la extracción en Soxhlet es comparar el porcentaje de extracción obtenido con esta técnica, considerada la metodología convencional, contra el obtenido mediante la técnica de extracción con CO₂ supercrítico. Se considera que con la extracción Soxhlet el 100% del BPA lixiviado se logra extraer de la muestra. En la **tabla 6.5** se muestran los resultados obtenidos en la extracción Soxhlet realizada por triplicado. La **figura 6.6** muestra los cromatogramas de la extracción de BPA mediante la técnica Soxhlet.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 6.5 Extracción de BPA de cereal enlatado mediante la técnica convencional Soxhlet.

Repetición	Concentración (ng/g)
1	786.7
2	729.5
3	726.1
Promedio	747. 4 ng/g
Desviación estándar	34 ng/g
Coefficiente de variación	4.5 %

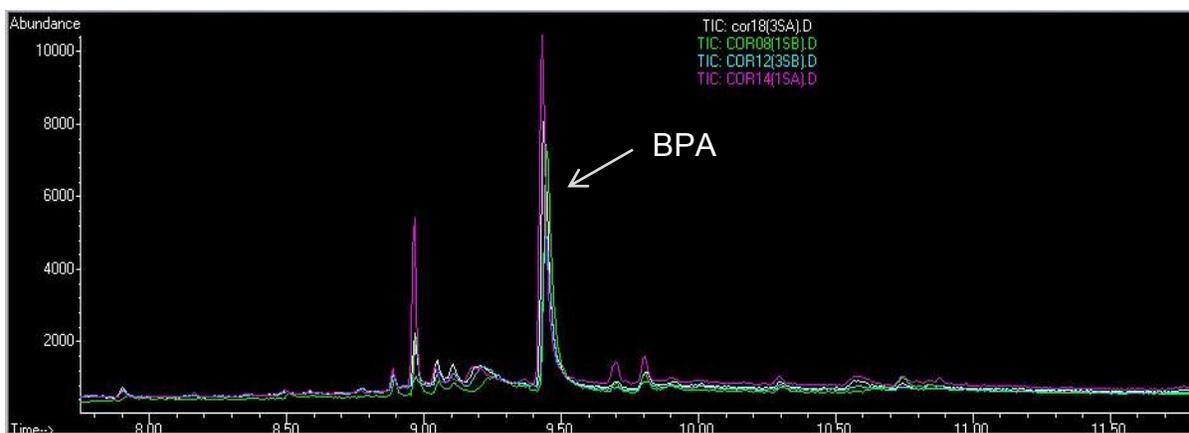


Figura 6.6 Cromatogramas de la extracción de BPA mediante la técnica Soxhlet.

La señal de BPA aparece en 9.5 min.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como puede observarse en la **figura 6.6**, a diferencia de la extracción de BPA con CO₂ en estado supercrítico, el cromatograma presenta diversos picos probablemente relacionados con otros compuestos fenólicos como ya se ha mencionado.

Para cada una de las técnicas (CO₂ supercrítico y Soxhlet) se realizó el promedio de las concentraciones obtenidas para calcular el rendimiento de extracción de BPA logrado con la técnica asistida con CO₂ supercrítico. La concentración extraída con la técnica Soxhlet se considera como el 100% del BPA presente en la muestra.

Para la extracción convencional en Soxhlet se obtiene un promedio de 747.4 ng/g, con una desviación estándar de ± 34 ng/g, mientras que con la técnica CO₂ supercrítico se obtiene un promedio de 319.7 ± 94 ng/g lo que representa el **42.8 %** de lo extraído con la técnica Soxhlet. La **figura 6.7** presenta la concentración promedio obtenida con cada una de las técnicas.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

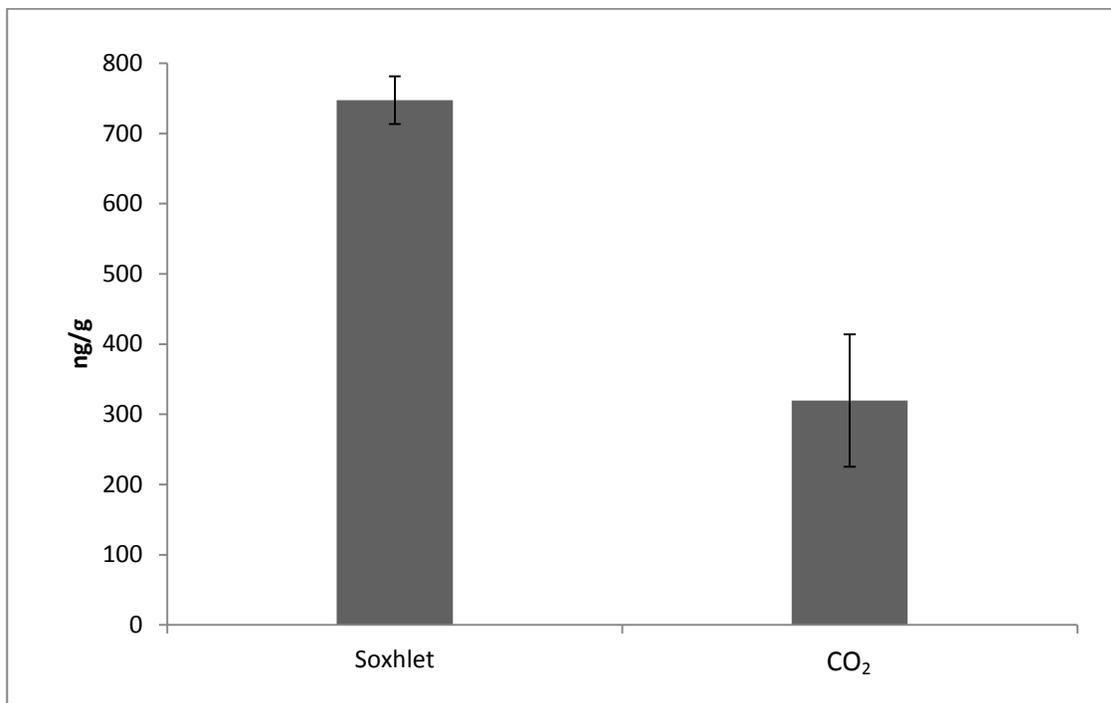


Figura 6.7 Comparación de la concentración obtenida de BPA de la muestra de cereal por la técnica convencional Soxhlet y la técnica asistida con CO₂ supercrítico.

Los resultados con ambas técnicas muestran una concentración de BPA en el rango de 214.9-786.7 ng/g. De acuerdo a reportes anteriores la concentración de BPA en cereales se encuentra en el rango de 0-4 ng/g (Niu *et al.*, 2012; Sakhi *et al.*, 2014; Niu *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016) mientras que en fórmulas infantiles y otros productos no lácteos para bebé está en el rango de 9-384 ng/g (Ballesteros *et al.*, 2009).



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración aumenta significativamente en enlatados debido al contacto del alimento con la resina epoxi utilizada en el recubrimiento de las latas (Sakhi *et al.*, 2014). Estudios en Estados Unidos han mostrado que 73% de los alimentos enlatados presentan BPA (Lorber *et al.*, 2015). Evaluaciones de BPA en alimentos enlatados han determinado una concentración en el rango de 21.9–1858.7 ng/g de BPA (Sungur *et al.*, 2014).

De acuerdo a lo anterior la concentración encontrada en la muestra de cereal (214.9-786.7 ng/g) se encuentra dentro del rango de concentraciones reportado para los alimentos enlatados (21.9–1858.7 ng/g), y se confirma que el enlatado influye considerablemente en la alta concentración de BPA, esto debido a la migración de monómero residual de BPA de la resina epoxi utilizada como recubrimiento en la lata.

Además de determinar la concentración de BPA en el cereal es importante evaluar o interpretar el riesgo toxicológico que representa la concentración encontrada en este alimento dirigido hacia la población infantil, para esto se recurrió a una metodología adaptada de trabajos anteriores (Christensen & Lorber, 2014; Lorber *et al.*, 2015) que permite evaluar el riesgo toxicológico debido a la ingesta de BPA a través de los alimentos.



6.4 Estimación del consumo de bisfenol A a través del cereal

Un enfoque “*Forward*” será utilizado para estimar el consumo diario de BPA a través de cereal enlatado para un bebé de 6 meses de edad. Este enfoque combina información sobre la concentración de BPA en el cereal con el consumo diario. La siguiente ecuación fue adaptada de Lorber *et al.*, 2015 y describe el cálculo realizado para evaluar el consumo de BPA.

$$I_{BPA} = C_{BPA} * I_C * W_B^{-1}$$

Donde:

I_{BPA} = Ingesta de BPA, ng/kg–día

C_{BPA} = Concentración de BPA en el cereal, ng/g

I_C = Consumo promedio diario de cereal para un bebé de 6 meses, g

W_B = Peso corporal promedio de un bebé de 6 meses, kg

Con los datos obtenidos de concentración de BPA en la muestra de cereal, el consumo diario de este alimento, según lo recomendado por el producto, y el peso promedio de un bebé de 6 meses de edad se calculó la ingesta de BPA debido al consumo de esta muestra de cereal.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

$C_{BPA} = 747.4$ ng/g tomando la concentración de BPA extraída mediante la técnica Soxhlet que en este trabajo se considera como el 100% de BPA contenido en la muestra.

$I_c = 15$ g. Consumo diario de cereal según la recomendación del producto.

$W_B = 7.2$ kg. Peso corporal promedio de un bebé de 6 meses (NOM-008-SSA2-1993).

$$I_{BPA} = \left(747.4 \frac{ng}{g}\right) \left(15 \frac{g}{día}\right) (7.2 \text{ kg})^{-1} = \mathbf{1557.1 \text{ ng/kg.día}}$$

Lo que equivale a **1.6 µg/kg peso corporal-día**.

La EFSA ha emitido varios dictámenes científicos sobre los riesgos asociados a la exposición y consumo de BPA. En 2006 evaluó los riesgos asociados a BPA, incluyendo la evaluación de la exposición dietética. En ese año la EFSA estableció una ingesta diaria tolerable (TDI) de 50 µg/kg peso corporal-día, basado en un nivel de efectos no adversos de 50 mg/kg peso corporal-día generado en múltiples estudios con roedores y aplicando un factor de incertidumbre de 100 (EFSA, 2006). En 2014 la EFSA realizó una re-evaluación del TDI, debido a los riesgos asociados a BPA dados de estudios en modelos animales, estableciendo un TDI de 5 µg/kg peso corporal-día (Niu *et al.*, 2015).



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En 2015 la EFSA estimó la exposición a BPA debido a alimentos enlatados para niños de 6 meses a 10 años. Considerando como **exposición media** de 290 a 375 ng/kg peso corporal-día, y como **exposición alta** de 813 a 857 ng/kg peso corporal-día. En este mismo año la EFSA re-establece el valor del TDI y declara una ingesta diaria tolerable temporal (TDI-t) de 4 µg/kg peso corporal-día (EFSA, 2015).

De acuerdo a los datos anteriores la exposición calculada debido al consumo de cereal se cataloga como exposición alta, y se encuentra por debajo del TDI-t de 4 µg/kg peso corporal-día; sin embargo, esta exposición, que representa el 40% del TDI-t, sólo se debe al consumo de un alimento, por lo que la ingesta total de BPA para un bebé de 6 meses posiblemente se encuentre cercana al TDI-t.

Basado en la Organización Mundial de la Salud la estimación internacional de la exposición dietética a BPA está en el rango de 0.4-4.2 µg/kg peso corporal-día (Milic *et al.*, 2015). Para infantes de 0-3 años el consumo estimado de BPA está por arriba de 0.875 µg/kg peso corporal-día (EFSA, 2015). La ingesta de BPA debido al cereal enlatado (1.6 µg/kg peso corporal-día) se encuentra en el rango establecido por la Organización Mundial de la Salud; sin embargo, representa el doble del consumo de BPA que establece la EFSA para un infante de 0-3 años, lo cual representa un riesgo evidente para la población infantil porque se trata de



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

la ingesta debido a un sólo alimento, además de que se ha establecido recientemente que una exposición de 2.5 a 25,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal-día son las dosis reportadas en la literatura científica que inducen efectos adversos en la salud humana (Heindel *et al.*, 2015).

Además de la ingesta, existen otras rutas de exposición como la inhalación y adsorción dérmica, por lo que una combinación de las múltiples rutas de exposición, así como una exposición a largo plazo resulta verdaderamente preocupante para la población infantil, la cual al tener su sistema endócrino en desarrollo constituye el sector más vulnerable a disrupción endócrina.

Existen numerosos estudios y ensayos en modelos animales que han establecido la relación de BPA con diversas enfermedades. Se ha reportado que BPA puede ocasionar la disrupción de la función de la célula con dosis menores a 0.23 ng/L en modelos celulares (Ballesteros *et al.*, 2009). Además se ha demostrado que el organismo humano es más susceptible a los daños tóxicos de BPA que los roedores (Rubin, 2011).



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A pesar de que la lista de efectos adversos producidos en la salud debido a la exposición a BPA es cada vez mayor, en el reporte científico de la EFSA de 2015, después de la evaluación de las rutas de exposición (ingesta, inhalación, adsorción dérmica) y las concentraciones reportadas para cada ruta de exposición, se establece que *«No existe un problema de salud para cualquier grupo de edad debido a la ingesta ni para cualquier ruta de exposición a BPA»* (EFSA, 2015).

Por lo anterior, en la actualidad los riesgos asociados con la exposición a BPA son fuente de interminable debate, ya que a pesar de que la relación entre la exposición a BPA y diversas enfermedades se ha establecido en múltiples investigaciones, el dictamen de la EFSA en 2015 establece que las asociaciones reportadas no aportan pruebas suficientes para inferir una relación causal entre la exposición al BPA durante cualquier etapa en el desarrollo del ser humano y los efectos adversos en la salud humana.

Por ello, se requiere mayor investigación en la determinación de BPA y en la validación de los métodos para determinarlo en alimentos, que constituyen la principal vía de exposición; además, en el desarrollo de nuevos materiales de empaque que sustituyan el uso de BPA y/o la innovación en tecnologías para removerlo de los empaques para alimentos.



6.5 Propuesta de prototipo para la extracción de bisfenol A en latas mediante CO₂ supercrítico

Se realizó la extracción del monómero residual de BPA de una muestra de lata con la técnica de CO₂ supercrítico, para evaluar la cantidad de monómero residual que puede extraerse mediante CO₂ supercrítico en una lata, antes del proceso de enlatado. Las condiciones utilizadas para la extracción fueron 300 bar/60 °C, condiciones con las cuales se logra una mayor extracción de BPA en la muestra de cereal.

La concentración de BPA encontrada en la muestra de lata fue de **176 ng/cm²**. La **figura 6.8** muestra el cromatograma obtenido en la extracción de BPA de la muestra de lata junto con su patrón de fragmentación, el pico de BPA aparece en 10.2 minutos.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

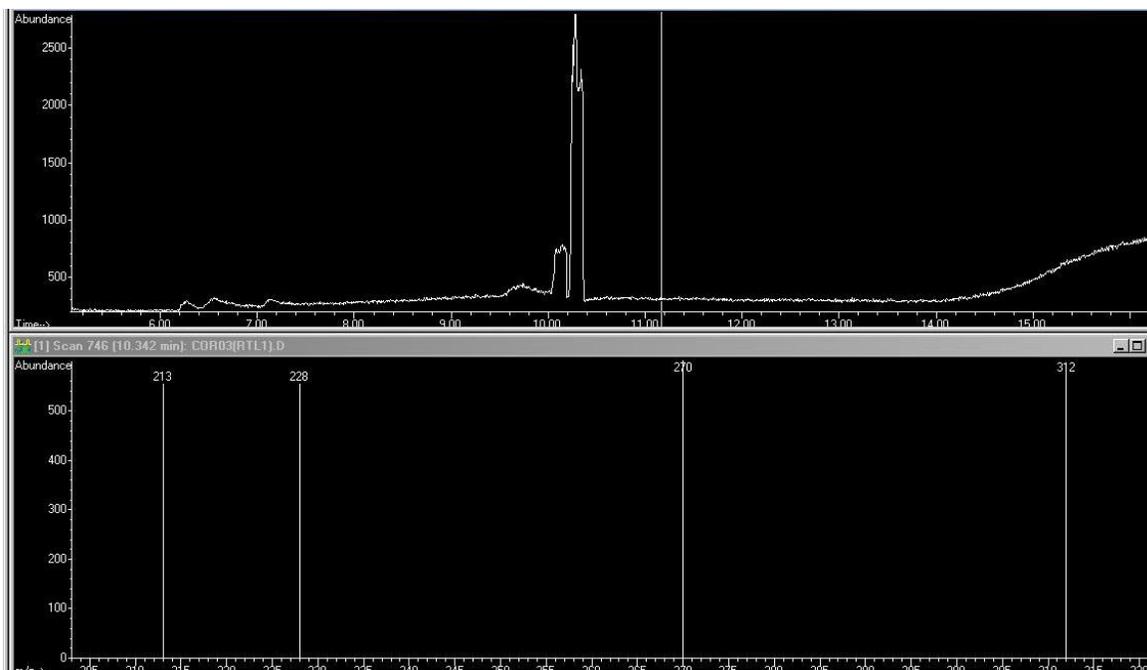


Figura 6.8 Cromatograma y patrón de fragmentación de BPA extraído de la muestra de lata. El pico de BPA aparece en 10.2 minutos. El ion con m/z 213 es característico para BPA.

De la **figura 6.8** es importante resaltar que se encontraron otras señales; por ejemplo, iones a m/z 208, 220 y 312, a diferencia de la extracción en cereal. Lo anterior puede ser explicado debido a que en el recubrimiento existen compuestos derivados del BPA tales como BADGE- H_2O y BADGE- $2H_2O$ que pudieron haber sido extraídos por el CO_2 y que de otra manera no migrarían al cereal. Reportes han indicado que la migración de este tipo de compuestos se favorece en medios líquidos bajo condiciones ácidas (Petersen *et al.*, 2003).



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Si se considera una lata de dimensiones 303 X 406, la cual presenta un área superficial de aproximadamente de 378.5 cm², se tendría una cantidad de monómero residual de 66.6 µg por lata, susceptible a migrar del envase al alimento. Se ha reportado una cantidad lixiviada de BPA en latas de 20 µg por lata (Allard, 2014; Félix *et al.*, 2013), por lo que el valor encontrado en la extracción de BPA en lata es considerablemente mayor al reportado en la literatura; sin embargo, cabe resaltar que la cantidad de monómero residual susceptible a migrar depende totalmente del tamaño de la lata, el cual no se especifica en la literatura, y del grado de polimerización de la resina epoxi.

La tecnología con fluidos supercríticos tiene amplias aplicaciones en la industria de alimentos en la extracción de diversos compuestos (aceites, antioxidantes, esencias, cafeína, aromas, sabores, etc.), las presiones de operación empleadas están en un rango desde 50 bar hasta por arriba de 2500 bar en las unidades de extracción de ultra-alta presión (Knez *et al.*, 2010). Las condiciones de proceso para la descafeinización del café se encuentran entre 70-90 °C y 160-250 bar (Williams & Clifford, 2000) y para la extracción de aceites de semillas de oleaginosas están entre 40-80 °C y 80-600 bar (Velasco *et al.*, 2007).



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Actualmente no existe un método de extracción de BPA a nivel industrial utilizando CO_2 en estado supercrítico como solvente, ni alguna patente relacionada; por ello, y debido a que los alimentos enlatados son la mayor fuente de BPA, y a los resultados positivos en la extracción de BPA de una muestra de lata, se propone el desarrollo de un método de limpieza asistido con CO_2 supercrítico para remover el monómero residual, antes del proceso de enlatado. La **figura 6.9** muestra el diagrama propuesto para la extracción industrial de BPA en latas.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

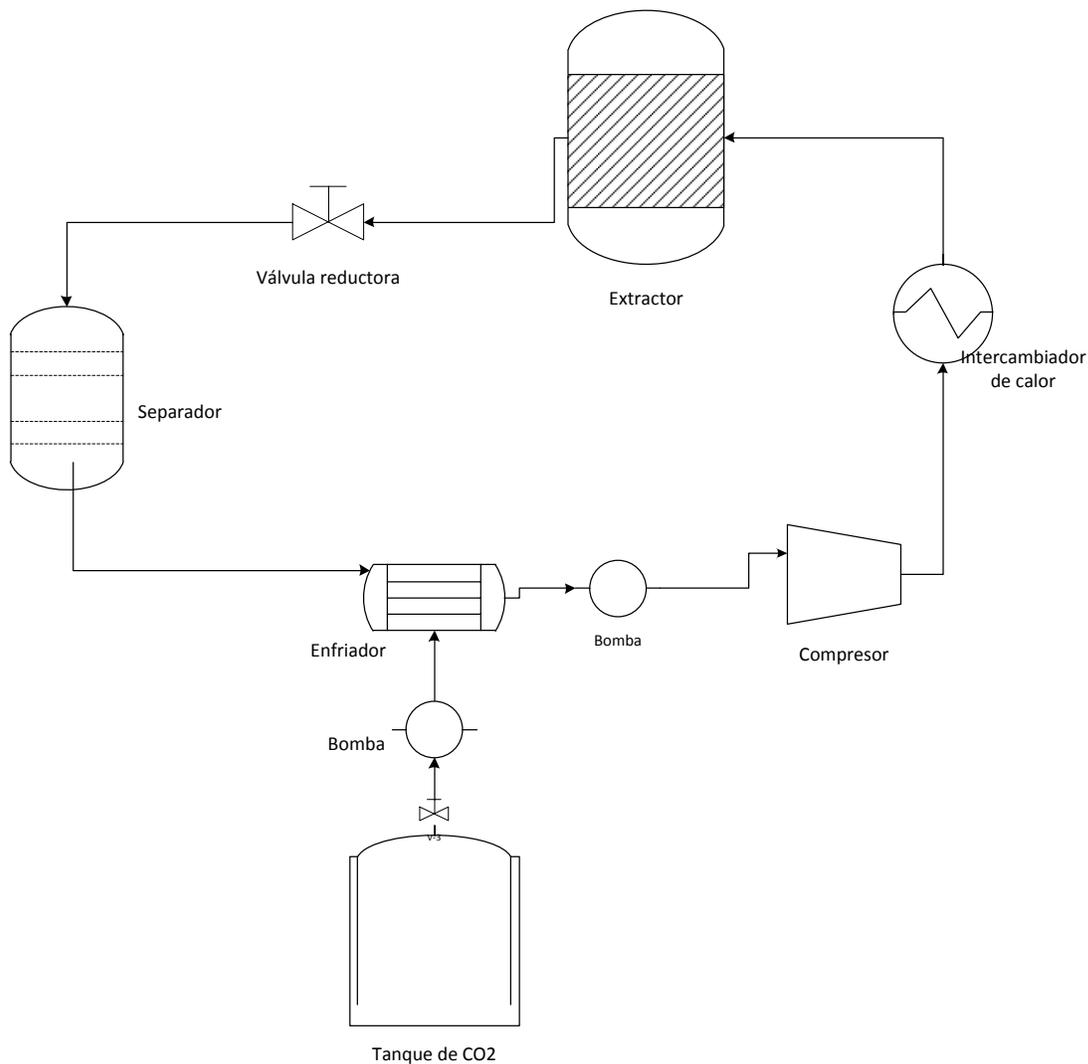


Figura 6.9 Diagrama esquemático del método de limpieza propuesto para la remoción de BPA de latas utilizando CO₂ en estado supercrítico como solvente.



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las presiones más comúnmente utilizadas en el desarrollo e investigación de extracciones con fluidos supercríticos se muestran en la **figura 6.10**. No hay una tendencia clara hacia una mayor o menor presión; sin embargo, como parte de la investigación y desarrollo, y en la presentación de las patentes para la extracción con CO₂ supercrítico, se utilizan presiones en el rango de 100 a 700 bar (Knez *et al.*, 2010).

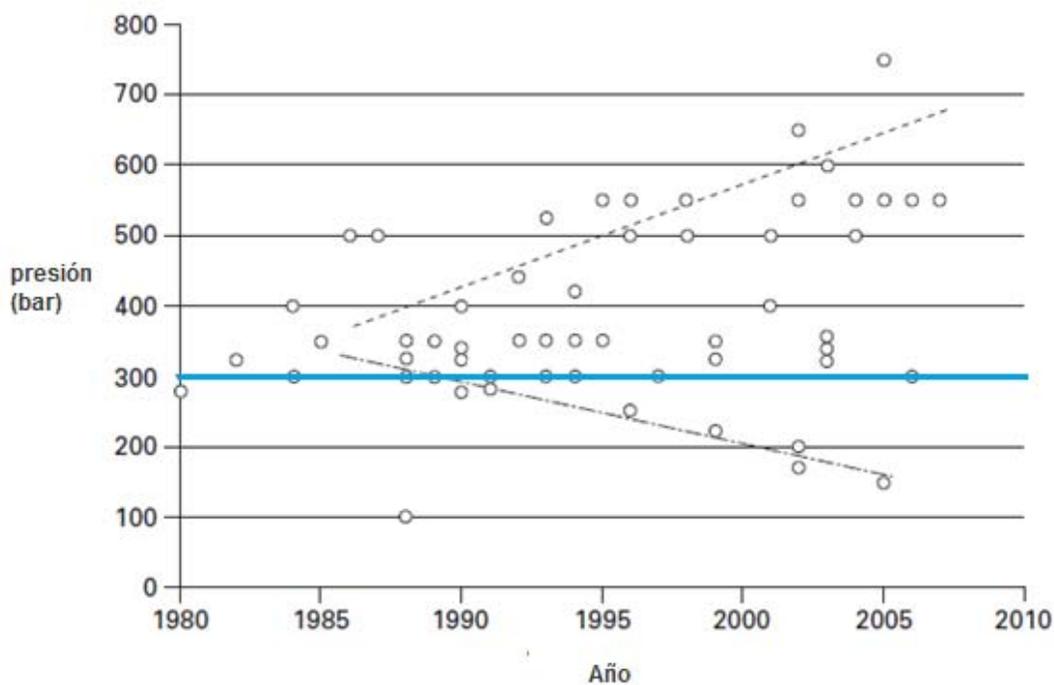


Figura 6.10 Presiones más utilizadas en el desarrollo e investigación de extracciones con fluidos supercríticos. (Adaptado de Knez *et al.*, 2010).



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La línea azul de la **figura 6.12**, que se encuentra en 300 bar, ilustra que la presión utilizada para la extracción de BPA en este trabajo se encuentra por debajo de la media de presiones utilizadas comúnmente en las extracciones con fluidos supercríticos, lo que hace que la propuesta de un prototipo para la extracción de BPA como un método de limpieza a 300 bar de presión sea una técnica accesible industrialmente.

Esta es una tecnología ambientalmente limpia, sin el uso de solventes orgánicos, que permite la remoción del BPA residual de las latas sin dejar trazas de compuestos químicos ajenos al envase o solventes orgánicos. Es una metodología que permite una buena transferencia de masa debido a las propiedades de solvente y de transporte del fluido supercrítico, lo que se traduce en altos porcentajes de recuperación y bajos tiempos de extracción.



7. CONCLUSIONES

- Es posible utilizar la extracción asistida con CO₂ supercrítico como un pre-tratamiento para la determinación de BPA en alimentos por cromatografía de gases acoplado a masas.
- Es posible extraer BPA de cereal enlatado empleando CO₂ supercrítico
- La extracción de BPA en alimentos empleando CO₂ supercrítico obtiene mejores resultados que una extracción en Soxhlet en términos de selectividad, pero tiene una reproducibilidad más baja.
- De las condiciones de extracción con CO₂ supercrítico ensayadas, las mejores fueron 300 bar, 60°C, 1 hora.
- Se encontró una concentración promedio de BPA en el cereal enlatado para bebé de 747.4±34 ng/g con la técnica Soxhlet, y de 319.6 ± 94 ng/g mediante la técnica asistida con CO₂ supercrítico. Por lo que se logró un porcentaje de extracción del 42.8% con la técnica asistida CO₂ supercrítico comparada con la técnica convencional Soxhlet.
- De acuerdo a los resultados obtenidos con la técnica Soxhlet, realizados por triplicado, la ingesta diaria posible de BPA calculada para un niño de 6 meses de edad debido al consumo de cereal enlatado es de 1.6 µg/kg peso corporal-día.



8. RECOMENDACIONES

- Realizar la acetilación *in situ* del BPA de la muestra bajo las condiciones de extracción del CO₂ supercrítico, que permitirá mejorar el rendimiento de extracción, si la determinación se hace por cromatografía de gases acoplado a masas.
- Determinar el BPA extraído mediante la técnica HPLC acoplado a detector de masas, ya que con este análisis instrumental se evita la etapa de derivatización de la muestra, una etapa muy sensible a pérdidas del analito.
- Estandarizar la metodología de extracción de BPA asistida con CO₂ supercrítico para disminuir la desviación estándar.
- Realizar el análisis del contenido de BPA en fórmulas infantiles, ya que representa el alimento de mayor consumo en infantes de 6 meses de edad.
- Realizar la extracción de BPA de la muestra de lata bajo menores condiciones de presión y temperatura, considerando la solubilidad del BPA en CO₂ supercrítico, que permitan crear una técnica más accesible industrialmente.



9. REFERENCIAS

- Alberto, B., Sánchez, C., García, A., Pérez, R., Tadeo, J. (2015) Ultrasound assisted extraction of emerging contaminants from environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry*, doi 10.1016/j.trac.2015.03.015.
- Allard, P. (2014) Bisphenol A. In: Biomarkers in Toxicology. Ed. R. Gupta USA, pages: 459-474.
- 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.
- Arpe, H. (1996) Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry Vol. A18. New York: Wiley-VHC.
- Atkinson, A. & Roy, D. (1995) In vivo DNA adduct formation by bisphenol A. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 26, 60-66.
- 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.
- Barceló, D. L. & López, M. J. (2011) Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Convenio Universidad de Sevilla-Ministerio de Medio Ambiente. [en línea] [Fecha de consulta: 1/03/2016] Disponible en: <http://documents.mx/documents/contaminacion-y-calidad-quimica-del-agua-el-problema-de-los-contaminantes-emergentes-27-06-2011.html>
- Bergman, A., Heindel, J., Jobling, S., Kidd, K., Zoeller, T. (2012) State of the Science of Endocrine Disruption Chemicals. *World Health Organization*.
- Boutin, O., Nadai, A.D., Perez, A.G., Ferrasse, J.H., Beltran, M., Badens, E., (2011) Experimental and modelling of supercritical oil extraction from rapeseeds and sunflower seeds. *Chemical Engineering Research and Design* 89, 2477-2484.
- Brotons, J., Olea, M., Villalobos, M., Pedraza, V., Olea, N. (1995) Xenoestrogens released from lacquer coating in food cans. *Environmental Health Perspectives* 103, 608-612.
- Calafat, A., Weuve, J., Ye, X., Jia, L., Hu, H., Ringer, S., Hutter, K., Hauser, R. (2009) Exposure to bisphenol A and other phenols in neonatal intensive care unit premature infants. *Environmental Health Perspectives* 117, 639-344.



9. REFERENCIAS

- Cao, X., Corriveau, J., Popovic, S., Clement, G., Beraldin, F., Dufresne, G. (2009) Bisphenol A in baby food products in glass jars with metal lids from Canadian markets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 5345-5351.
- Chen, G., Ding, W., Ku, H., Chao, H., Chen H., Huang, M., (2010) Alkylphenols in human milk and their relations to dietary habits in central Taiwan. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (7), 1939-1944.
- Chen, W., Shen Y., Chen, S. (2016) Assessing bisphenol A (BPA) exposure risk from long-term dietary intake in Taiwan. *Science of the Total Environment* 543, 140-146
- Christensen, K. & Lorber, M. (2014) Exposure to BPA in Children-Media-Based and Biomonitoring-Based Approaches. *Toxics* 2, 134-157.
- De la Parra, C., Serna, S., Hai, L. (2007) Effect of processing on the phytochemical profiles and antioxidant activity of corn for production of masa, tortillas, and tortilla chips. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 4177-4183.
- De Melo, R., Silvestre, A., Silva, C. (2014) Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. *The Journal of Supercritical Fluids* 92, 115-176.
- Dodds, E. & Lawson, W. (1938) Molecular structure in relation to estrogenic activity. Compounds without a phenanthrene nucleus. *Proc. R. Soc. London Ser. B BiolSci*125, 222-232.
- Edmonds, J. Nomachi, M., Terasaki, M., *et al.*, (2004) The reaction of bisphenol A 3,4-quinone with DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319, 556-561.
- Erler, C., Novak, J. (2010) Bisphenol A Exposure: Human Risk and Health Policy. *Journal of Pediatric Nursing* 25, 400-407.
- Eller, F., Cermak, S., Taylor, S. (2011) Supercritical carbon dioxide extraction of cuphea seed oil. *Industrial Crops and Products* 33, 554-557.
- 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 Commission, (2011) Commission directive 2011/8/EU of 28 January 2011 amending directive 2002/72/EC as regards the restriction of use of bisphenol A in plastic infant feeding bottles.



9. REFERENCIAS

<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:026:0011:0014:EN:PDF>.

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). Question number EFSA-Q-2005-100, adopted on 29 November 2006. The EFSA Journal 428,1, available online at

http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-11786207538121178620772817.htm.

European Food Safety Authority (EFSA), (2015) Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. EFSA Journal 2015 13 (1), 3978

European Union, (2003) *European Union Risk Assessment Report: 4,4'-isopropylidenediphenol (bisphenol-a)*; cas no: 80-05-7, einecs no: 201-245-8; European Union: Luxembourg.

Félix, T., Durán, J., Jiménez, B. (2013) The occurrence and distribution of a group of organic micropollutants in Mexico City's water sources. *Science of the Total Environment* 454-455, 109-118.

Food and Drug Administration (FDA), (2012) Indirect food additives: polymers. Final Rule 77 FR 41899. Food and Drug Administration, Washington, D.C. (July 17, 2012; <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2012-07-17/html/2012-17366.htm>. Accessed 11/1/2013).

Food and Drug Administration (FDA), (2013). Indirect Food Additives: Adhesives and Components of Coatings. Final Rule. Food and Drug Administration, Washington, D.C. (78 FR 41840, July 12, 2013

<https://www.federalregister.gov/articles/2013/07/12/2013-16684/indirect-foodadditives-adhesives-and-components-of-coatings>. Accessed 11/1/2013).

Ferrado, G., Filip, R. (2008) Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 9225-9229.

Gierthy, J. (2002) Testing for endocrine disruption: how much is enough? *Toxicological Sciences* 68, 1-3.

Gould J. C., Leonard L. S., Maness S. C., Wagner B. L., Conner K., Zacharewski T., Safe, S., McDonnell, D. P., Gaido, K. W. (1998) Bisphenol A interacts with the estrogen receptor in a distinct manner from estradiol. *Molecular and Cellular Endocrinology* 142, 203-14.



9. REFERENCIAS

- Hamburger, M., Baumann, D., Adler, S. (2004) Supercritical carbon dioxide extraction of selected medicinal plants – effects of high pressure and added ethanol on yield of extracted substances. *Phytochemical Analysis* 15, 46–5
- Heindel, J., Newbold, R., Bucher, J., Camacho, L., Delclos, K., Lewis, S., Vanlandingham, M., Churchwell, M., Twaddle, N., McLellen, M., Chidambaram, M., Bryant, M., Woodling, K., Gamboa da Costa, G., Ferguson, S., Flaws, J., Howard, P., Walker, N., Zoeller, R., Fostel, J., Favaro, C., Schug, T. (2015) NIEHS/FDA CLARITY-BPA research program update. *Reproductive Toxicology* 58, 33-44.
- Herrero, M., Mendiola, J.A., Cifuentes, A., Ibañez, E. (2010) Supercritical fluid extraction: recent advances and applications. *Journal of Chromatography A* 1217, 2495–2511.
- Herrero, M., Plaza, M., Cifuentes, A., Ibañez, E. (2010) Green processes for the extraction of bioactives from rosemary: chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry and in vitro assays. *Journal of Chromatography A* 1217, 2512–2520.
- Holser, R., Bost, G. (2004) Hybrid hibiscus seed oil compositions. *Journal of the American Oil Chemists Society* 81, 795–797.
- Housecroft, C. & Sharpe A. (2006) Química Inorgánica, 2da Edición, Pearson Educación S. A. Madrid, España. 530-532.
- Hugo, E., Brandebourg, T., Wood, J. *et al.* (2008) Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibit adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environmental Health Perspectives* 116, 1642-1647.
- Inoue, H., Yokota, H., Makino, T., Yuasa, A., and Kato, S. (2001) Bisphenol A glucuronide, a major metabolite in rat bile after liver perfusion. *Drug Metabolism and Disposition* 29, 1084-1087.
- Inoue, H., Tsuruta, A., Kudo, S., Ishii, T., Fukushima, Y., Iwano, H., Yokota, H., Kato, S. (2005) Bisphenol A glucuronidation and excretion in liver of pregnant and nonpregnant female rats. *Drug Metabolism and Disposition*. 33, 55-59.
- Iso, T., Watanabe, T., Iwamoto, T., Shimamoto, A., Furuichi, Y. (2006) DNA damage caused by BPA and estradiol through estrogenic activity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 2, 206-210.
- Izzotti, A., Kanitz, S., D'Agostini, F., Camoirano, A., De Flora, S. (2009) Formation of adducts by bisphenol A, an endocrine disruptor, in DNA in vitro end liver and mammary tissues of mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 679, 28-32.



9. REFERENCIAS

- 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.
- Knez, Z., Skerget, M., Knez, M. (2010) Principles of supercritical fluid extraction and applications in the food, beverage and nutraceutical industries. Principles of supercritical fluid extraction and applications. Woodhead Publishing Limited.
- Krishnan, A., Stathis, P., Permuth, S., Tokes, L., Feldman, D. (1993) Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132, 2279-2286.
- 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 bisphenolA on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neuroscience Research* 45, 345-356.
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B., Gustafsson, S. (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139, 4252-63.
- Lee, H. & Peart, T. (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.
- Li, H., Wu, H., Rempel, C., Thiyam, U. (2010) Effect of operating parameters on oil and phenolic extraction using supercritical CO₂. *Journal of the American Oil Chemists Society* 87, 1081-1089.
- Lorber, M., Schechter, A., Paepke, O., Shropshire, W., Christensen, K., Birnbaum, L. (2015) Exposure assessment of adult intake of bisphenol A (BPA) with emphasis on canned food dietary exposure. *Environment International* 77, 55-62.
- Markey, C. M., Wadia, P. R., Rubin, B. S., Sonnenschein, C., Soto, A. (2005) Long-term effect of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol A in the female mouse genital tract. *Biology of Reproductive* 72 1344-1351.
- Meesters, R. & Schröder, H. (2002) Simultaneous determination of 4-Nonylphenol and Bisphenol A in sewage sludge. *Analytical Chemistry* 74, 3566-3574.



9. REFERENCIAS

- Milic, N., Cetojevic-Simin, D., Milanovic, M., Sudji, J., Milosevic, N., Curic, N., Abenavoli, L., Medic-Stojanoska, M. (2015) Estimation of *in vivo* and *in vitro* exposure to bisphenol A as food contaminant. *Food and Chemical Toxicology* 83, 268-274.
- Miyagawa, K., Narita, M., Akama, H., Suzuki, T. (2007) Memory impairment associated with a Dysfunction of the hippocampal cholinergic system induced by prenatal and neonatal exposures to bisphenol A. *Neuroscience Letters* 418, 236-241.
- 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.
- Miyamoto, K.; Kotake, M. (2006) Estimation of daily bisphenol A intake of Japanese individuals with emphasis on uncertainty and variability. *Environmental Science* 13, 15–29.
- 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.
- 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* 117, 879-885.
- Niu, Y., Zhang, J., Wu, Y., Shao, B. (2012) Analysis of Bisphenol A and Alkylphenols in cereals by Automated On-line Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 24, 6116-6122.
- 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-008-SSA2-1993, Control de la nutrición, crecimiento y desarrollo del niño y del adolescente. Criterios y procedimientos para la prestación del servicio. Secretaría de Salud. [En línea] [Fecha de consulta: 01/03/2016] Disponible en:
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/008ssa23.html>



9. REFERENCIAS

- Pennic, W., Aldridge, T., (1998) Differential activation by xenoestrogens of ER and ER when linked to different response elements. *Journal of Endocrinology* 158,R11–4.
- Perakis, C., Louli, V., Magoulas, K. (2005) Supercritical fluid extraction of black pepper oil. *Journal of Food Engineering*, 71. 386–393.
- Petersen, H., Schaefer, A., Buckow, C. A., Simat, T. J., Steinhart, H. (2003) Determination of bisphenol A diglycidil ether (BADGE) and its derivatives in food: identification and quantification by internal standard. *European Food Research and Technology* 216, 355-364.
- Rajaei, M., Barzegar, M., Yamini, Y. (2005) Supercritical fluid extraction of tea seed oil and its comparison with solvent extraction. *European Food Research and Technology*, 220. 401–405.
- Richter, C., Birnbaum, L., Farabolini, F., Newbold, R., Rubin, B., Talsness, C., Vandenberg, J., Walser-Kuntz, D., VomSaal, F., (2007) In vivo Effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reproductive Toxicology* 24, 199-224.
- Rubin, B.S. (2011) Bisphenol A: an endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects. *Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology* 127 (1e2), 27e34.
- Sakhi, Ar., 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.
- Santos, S., Villaverde, J., Silva, C., Neto, C., Silvestre, A. (2012) Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from *Eucalyptus globulus* labill bark. *Journal of Supercritical Fluids* 71, 71–79.
- Schonfelder, G., Wittfoht, W., Hopp, H., Talsness, C., Paul, M., Chahoud, I. (2002) Parent bisphenol A accumulation in the human-maternal-fetal-placental unit. *Environmental Health Perspective* 110, A703-707
- Sendon Garcia, R., & Paseiro Losada, P. (2004) Determination of bisphenol A diglycidyl ether and its hydrolysis and chlorohydroxy derivatives by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1032, 37–43.
- Shi, B.J., Jin, J.S., Yu, E.P., Zhang, Z.T. (2011) Concentration of natural vitamin E using a continuous countercurrent supercritical CO₂ extraction-distillation dual column. *Chemical Engineering and Technology* 34, 914–920.



9. REFERENCIAS

- Shimizu, M., Ohta, K., Matsumoto, Y., Fukuoka, M., Ohno, Y., Ozawa, Y. (2002) Sulfation of bisphenol A abolished its estrogenicity based on proliferation and gene expression in human breast cancer MCF-7 cells. *Toxicology In Vitro* 16, 549-556.
- Snyder, R. w., Maness, S. C., Gaido, K. W., Welsch, F., Sumner, S., Fennell, T. (2000) Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* 168, 225-234.
- Steinmetz, R., Mitchner, N., Grant, A., Allen, D., Bigsby, R., Ben-Jonathan, N. (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 and Biology* 13, 891-897.
- Sungur, S., Köroglu, M., Özkan, A. (2014) Determination of bisphenol A migrating from canned food and beverages in markets. *Food Chemistry* 142, 87-91.
- Suzuki, A., Sugihara, A., Uchida, K., Sato, T., Ohta, Y., Kutsu, Y., Watanabe, H., Iguchi, T. (2002) Developmental effects of perinatal exposure to bisphenol-A and diethylstilbestrol on reproductive organs in female mice. *Reproductive Toxicology* 16, 107-116.
- Takahashi, O. & Oishi, S. (2003) Testicular toxicity of dietarily of parenterally administered bisphenol A in rats and mice. *Food and Chemistry Toxicology* 41, 1035-1044.
- Trasande, L., Attina, T.M., Blustein, J. (2012) Association between urinary bisphenol A concentration and obesity prevalence in children and adolescents. *JAMA* 308 (11).
- Valsecchi, S., Polesello, S., Mazzoni, M., Rusconi, M., Petrovic, M. (2015) One-line sample extraction and purification for the LC-MS determination of emerging contaminants in environmental samples. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* <http://dx.doi.org/10.1016/j.teac.2015.08.001>.
- Vandenberg, L., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W. (2007) Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology* 24, 139-177.
- Vega, A. (2010) Extracción de aceite de chía con dióxido de carbono supercrítico. Tesis de Licenciatura, UNAM.
- Velasco, R., Villada, H., Carrera, J. (2007) Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Scielo* 18(1), 53-65.



9. REFERENCIAS

- 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.
- Von Goetz, N., Wormuth, M., Scheringer, M., Hungerbühler, K. (2010) Bisphenol A: How the Most Relevant Exposure Sources Contribute to Total Consumer Exposure. *Risk Analysis* 30, 473–487.
- Welshons, W., Nagel, S., VomSaal, F. (2006) Large effects from small exposures, III. Endocrine mechanisms mediating effects of bisphenol A at levels of human exposure. *Endocrinology* 147, S56–69.
- Wetherill, Y., Akingbemi, B., Kanno, J., McLachlan, J., Nadal, A., Sonnenschein, C., Watson, C., Zoeller, T., Belcher, S. (2007) In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action. *Reproductive Toxicology* 24, 178–98
- Williams, J. R. & Clifford, A. A. (2000) *Supercritical Fluid Methods and Protocols* Human Press. Totowa, New Jersey. Pág. 5.
- Yaoi, T., Itoh, K., Nakamura, K., Ogi, H., Fujiwara, Y., Fushiki, S. (2008) Genome-wide analysis of epigenomic alterations in fetal mouse forebrain after exposure to low doses of bisphenol A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 376, 563-567.
- Yan, C., Nie, M., Yang, Y., Zhou, J., Liu, M., Baalousha, M., Lead, J. (2015) Effect of colloids on the occurrence, distribution and photolysis of emerging organic contaminants in wastewaters. *Journal of Hazardous Materials* 299, 241-248.
- Zahedi, G., Azarpour, A. (2011) Optimization of supercritical carbon dioxide extraction of passiflora seed oil. *Journal of Supercritical Fluids* 58, 40–48.
- Zekovic, Z., Lepojevic, Z., Vujic, D. (2000) Supercritical extraction of thyme (*Thymus vulgaris* L.), *Chromatographia* 51, 175–179.
- Zielinska, M., Cydzik-Kwiatkowska, A., Bernat, K., Bulkowska, K., Wojnowska-Baryla, I., (2014) Removal of bisphenol A (BPA) in a nitrifying system with immobilized biomass. *Bioresource Technology* 171, 305-313.

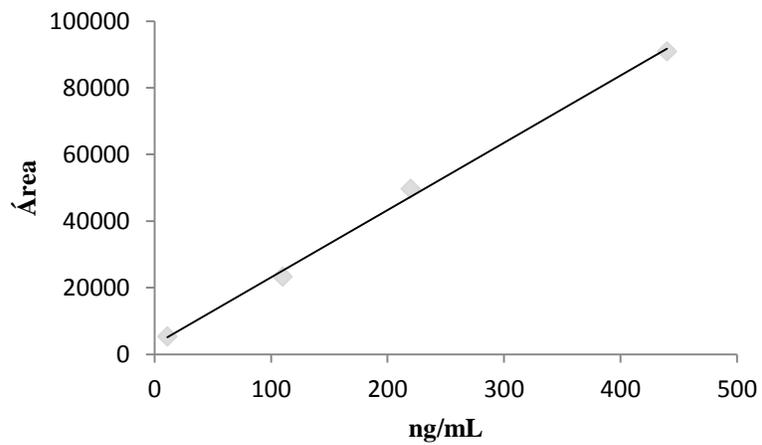


10. ANEXO I

10. ANEXO I

Curva de calibración de bisfenol A (BPA).

<i>ng/mL</i>	<i>Área</i>
11	5337
110	23317
220	49666
440	90968



$$\text{Área} = 201.7 X + 2933.5$$

$$R^2 = 0.9977$$

Donde:

X= Concentración (ng/mL)