



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
PARA EL ANÁLISIS DE SEIS BISFENOLES EN AGUA
MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA
SEGUIDA DE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS
CON DETECCIÓN UV**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN QUÍMICA INDUSTRIAL

PRESENTA:

DIEGO VELASCO MARTÍNEZ

ASESOR:

DR. JOSÉ DE JESÚS OLMOS ESPEJEL

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN



UNAM
CUAUTITLÁN

DEPARTAMENTO
DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de tesis y examen profesional.

Desarrollo y validación de un método para el análisis de seis bisfenoles en agua mediante extracción en fase sólida seguida de cromatografía de líquidos con detección UV.

Que presenta el pasante: **Diego Velasco Martínez**

Con número de cuenta: **314252252** para obtener el título de: **Químico Industrial**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 08 de Junio de 2023.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.F. María del Rosario Rodríguez Hidalgo	
VOCAL	M.C. Pablo Hernández Matamoros	
SECRETARIO	Dr. José de Jesús Olmos Espejel	
1er. SUPLENTE	Dra. Dolores Molina Jasso	
2do. SUPLENTE	Dr. Adrián Ricardo Hipólito Najera	

NOTA: Los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional.

En caso de que algún miembro del jurado no pueda asistir al examen profesional deberá dar aviso por anticipado al departamento

A mis padres, **Raymundo Velasco Rojas**
y **Marcela Martínez Fernández**.

Jamás voy a poder terminar de agradecerles
todo lo que han hecho y hacen por mí.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Marcela y Raymundo por todo el apoyo que me han brindado y todo lo que han sacrificado. Por la crianza que me dieron y nunca dejarme solo. Es por ustedes que he llegado hasta aquí. Espero algún día poder regresarles aunque sea una parte de lo que me han dado. Los amo.

A mi hermano Arturo, eres una persona muy importante para mí. Te deseo lo mejor y que logres todo lo que te propongas.

A Salma y Poncho, mis amigos y compañeros durante la carrera, tantas conversaciones, ayuda, buenos momentos y recuerdos. Ahora a seguir adelante con la maestría.

A todos mis compañeros y amigos durante la carrera, gracias por su apoyo y amistad. En especial a Ulises, Daira y Karina.

Al Dr. José de Jesús Olmos Espejel, por su asesoramiento y consejos, no solo durante la realización de este trabajo sino también a nivel personal.

A mis compañeros del laboratorio L-12, Liliana, Abigail, Héctor, Evelyn y Vanessa, por hacer más agradable el trabajo y los días en el laboratorio.

A mis mascotas, nunca subestimen lo bien que te hacen sentir y lo mucho que te apoyan.

A la UNAM, prepa 4 y FESC por permitirme formarme profesionalmente, descubrir nuevos gustos y aficiones y permitirme conocer a grandes personas a lo largo del camino.

A todos los profesores que he tenido, tanto en clases formales como por fuera del aula. Gracias por sus enseñanzas y conocimientos.

A los miembros del jurado por el tiempo y trabajo dedicado a la revisión, corrección y mejora de este trabajo. De igual forma, gracias a las personas que me brindaron su apoyo y punto de vista para elaborar y pulir este trabajo.

A la UNAM-DGAPA por el financiamiento del proyecto FESC PIAPI 2038 y a la FES Cuautitlán por brindar las instalaciones y equipos requeridos en la realización de este trabajo.

*El cosmos es todo lo que es, todo lo que fue y todo lo que alguna vez será.
Nuestras más ligeras contemplaciones del cosmos nos hacen estremecer:
sentimos como un cosquilleo nos llena los nervios, una voz muda,
una ligera sensación como de un recuerdo lejano
o como si cayéramos desde gran altura.
Sabemos que nos aproximamos al más grande de los misterios.*

-Carl Sagan.

Al cabo de diez mil años el hombre había hallado al fin algo tan excitante como la guerra.

-Arthur C. Clarke, 2001: Una odisea espacial.



El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio L-112 de la Sección de Química Analítica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1 y en el laboratorio L-12 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en el Campo 4.

Parte de este trabajo se presentó en:

2^{do} Congreso Iberoamericano de Ciencia, Educación y Tecnología
organizado por la FES Cuautitlán-UNAM del 6 al 9 de diciembre del 2022 en la modalidad de cartel (mini-video).



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Otorga la presente

CONSTANCIA a:

Diego Velasco Martínez, José de Jesús Olmos Espejel

Por la **presentación del cartel titulado:** DETERMINACIÓN DE BISFENOLES EN MUESTRAS DE AGUA MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.

Folio: 202200445



Dr. David Quintanar Guerrero

Director de la Facultad
de Estudios Superiores
Cuautitlán

09 diciembre 2022



ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
ABREVIATURAS	XIV
1 RESUMEN	1
2 INTRODUCCIÓN	2
3 ANTECEDENTES	4
3.1 PRODUCCIÓN Y USO DE LOS BISFENOLES.	5
3.2 PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS BISFENOLES.	8
3.3 BISFENOLES COMO CONTAMINANTES EMERGENTES.	10
3.4 TOXICIDAD DE LOS BISFENOLES.	12
3.5 METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BISFENOLES EN AGUA Y NIVELES REPORTADOS.	16
3.6 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).	19
3.6.1 Fundamentos de la CLAR.	19
3.6.2 Parámetros cromatográficos en CLAR.	20
3.7 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS).	21
3.8 PARÁMETROS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO.	23
3.8.1 Linealidad.	23
3.8.2 Exactitud.	25
3.8.3 Repetibilidad inter-día.	26
3.8.4 Límites de detección y cuantificación.	26

3.9	EVALUACIÓN DE LA REPETIBILIDAD EN UN ANÁLISIS MEDIANTE LA TEORÍA DE HORWITZ.	27
4	OBJETIVOS	29
4.1	OBJETIVO GENERAL.	29
4.2	OBJETIVOS PARTICULARES.	29
5	METODOLOGÍA	30
5.1	MATERIALES.	30
5.2	EQUIPO E INSTRUMENTACIÓN.	30
5.3	PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES ESTÁNDAR.	32
5.4	OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE AGUA.	32
5.5	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN Y ANÁLISIS ÓPTIMAS.	33
5.5.1	Selección de la longitud de onda	33
5.5.2	Selección de las condiciones de separación.	34
5.6	EVALUACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.	34
5.6.1	Linealidad del sistema.	34
5.6.2	Repetibilidad inter-día.	35
5.6.3	Límites de detección y cuantificación.	35
5.7	OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.	35
5.7.1	Elección de fase adsorbente.	36
5.7.2	Volumen de desorción.	37
5.7.3	Polaridad de la matriz.	37
5.8	VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE EFS-CLAR-DAD.	37
5.8.1	Linealidad.	37
5.8.2	Exactitud.	38
5.8.3	Repetibilidad inter-día.	38
5.8.4	Límites de detección y cuantificación.	38
5.9	ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE AGUA.	39
6	RESULTADOS Y ANÁLISIS	40

6.1	OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN Y ANÁLISIS ÓPTIMAS.	40
6.1.1	Selección de la longitud de onda.	40
6.1.2	Selección de las condiciones de separación.	40
6.2	EVALUACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.	41
6.2.1	Linealidad del sistema.	41
6.2.2	Repetibilidad inter-día.	43
6.2.3	Límites de detección y cuantificación.	44
6.3	OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.	44
6.3.1	Elección de fase adsorbente.	44
6.3.2	Volumen de elución.	45
6.3.3	Polaridad de la matriz.	46
6.4	VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE EFS-CLAR-DAD.	49
6.4.1	Linealidad.	49
6.4.2	Exactitud.	51
6.4.3	Repetibilidad.	52
6.4.4	Límites de detección y cuantificación.	53
6.5	ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE AGUA.	53
7	CONCLUSIONES	58
8	PERSPECTIVAS	59
	REFERENCIAS	60
A	CROMATOGRAMAS	65
B	GRÁFICAS	67
C	ESPECTROS DE ABSORCIÓN	71
D	MEMORIA DE CÁLCULO	75
D.1	OBTENCIÓN DE LOD Y LOQ.	75
D.2	CÁLCULO DE RECOBRO.	76

ÍNDICE DE FIGURAS

3.1	Estructura del BPA y algunos de sus análogos.	4
3.2	Reacción de síntesis del bisfenol A.	5
3.3	Mercado global de BPA. Tasa de crecimiento por región, 2022 - 2027	6
3.4	Distribución del BPA producido por uso final, 2020.	7
3.5	Contaminantes emergentes y su ciclo con el agua.	11
3.6	Representación del mecanismo de acción del bisfenol A a nivel celular.	13
3.7	Diagrama de los componentes de un equipo de CLAR.	20
3.8	Etapas de la extracción en fase sólida.	23
3.9	Trompeta de Horwitz.	28
5.1	Estanques del criadero de peces localizado en Morelos.	33
5.2	Procedimiento general para la EFS empleado.	36
6.1	Picos correspondientes a cada analito y el orden de elución.	41
6.2	Curva de calibración del sistema cromatográfico (BPZ y BPA).	42
6.3	Área promedio de los bisfenoles en función de la fase adsorbente empleada.	45
6.4	Área promedio para el primer y segundo mililitro recuperado tras la elución.	46
6.5	Metodología optimizada para la extracción y análisis de bisfenoles.	48
6.6	Curva de calibración del método EFS-CLAR-DAD (BPZ y BPA).	50
6.7	Curva de recobro global del método EFS-CLAR-DAD (BPZ y BPA).	51
6.8	Recipientes de plástico de donde se tomó la muestra.	53
6.9	Muestras de agua contenida en garrafón.	54
6.10	Muestras de agua superficial de criadero de peces.	54
6.11	Cromatograma de un estándar y una muestra de recipiente.	56

6.12	Cromatograma de un estándar y una muestra de agua de garrafón.	56
6.13	Cromatograma de un estándar y una muestra de agua de criadero.	57
A.1	Cromatograma de estándar y blanco de agua.	65
A.2	Cromatograma de un estándar y un blanco resultante de EFS.	66
A.3	Cromatograma de un estándar y un extracto de muestra fortificada.	66
B.1	Curva de calibración del sistema cromatográfico (BPS y BADGE).	67
B.2	Curva de calibración del sistema cromatográfico (BPF y BPAF).	68
B.3	Curva de calibración del método EFS-CLAR-DAD (BPS y BADGE).	68
B.4	Curva de calibración del método EFS-CLAR-DAD (BPS y BADGE).	69
B.5	Curva de recobro global del método EFS-CLAR-DAD (BPS y BADGE).	69
B.6	Curva de recobro global del método EFS-CLAR-DAD (BPF y BPAF).	70
C.1	Espectro de absorción del BPA a $12.48 \mu\text{g mL}^{-1}$	71
C.2	Espectro de absorción del BPS a $12.48 \mu\text{g mL}^{-1}$	72
C.3	Espectro de absorción del BPF a $12.48 \mu\text{g mL}^{-1}$	72
C.4	Espectro de absorción del BPAF a $12.48 \mu\text{g mL}^{-1}$	73
C.5	Espectro de absorción del BPZ a $12.48 \mu\text{g mL}^{-1}$	73
C.6	Espectro de absorción del BADGE a $12.48 \mu\text{g mL}^{-1}$	74
C.7	Comparación de espectros de absorción experimentales.	74

ÍNDICE DE TABLAS

3.1	Aplicaciones de los análogos del BPA estudiados y producción estimada.	7
3.2	Propiedades fisicoquímicas de los bisfenoles empleados en este trabajo.	9
3.3	Afectaciones a la salud asociadas al BPA.	15
3.4	Metodologías reportadas para el análisis de bisfenoles en agua ambiental.	17
3.5	Metodologías reportadas para el análisis de bisfenoles en agua embotellada.	18
5.1	Lista de material empleado para el desarrollo del método de análisis.	31
5.2	Muestras analizadas mediante el método EFS-CLAR-DAD desarrollado.	32
5.3	Condiciones del sistema cromatográfico.	34
5.4	Parámetros y condiciones por evaluar para la optimización de la EFS.	35
6.1	Orden de elución y tiempos de retención promedio.	40
6.2	Linealidad del sistema.	42
6.3	Repetibilidad en el sistema cromatográfico.	43
6.4	Proporción de Horwitz para el sistema cromatográfico.	43
6.5	Límites de detección y cuantificación en el sistema cromatográfico.	44
6.6	Evaluación de la polaridad de la matriz.	47
6.7	Condiciones óptimas del método EFS-CLAR-DAD.	49
6.8	Linealidad del método EFS-CLAR-DAD.	50
6.9	Recobros globales del método EFS-CLAR-DAD.	52
6.10	Valores obtenidos de %RSD y proporción de Horwitz.	52
6.11	Límites de detección y cuantificación del método EFS-CLAR-DAD.	53

ABREVIATURAS

%RSD	Percent Relative Standard Deviation (Porcentaje de desviación típica relativa)
ACN	Acetonitrilo
AOAC	Association of Official Analytical Chemists (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales)
BADGE	Diglicidil Éter del Bisfenol A
BPA	Bisfenol A
BPAF	Bisfenol AF
BPF	Bisfenol F
BPS	Bisfenol S
BPZ	Bisfenol Z
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección de Riesgos Sanitarios
DAD	Detector de Arreglo de Diodos
EDCs	Endocrine-disrupting chemicals (Compuestos Disruptores del Sistema Endocrino)
EFS	Extracción en Fase Sólida
EPA	Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental)
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
HorRat	Proporción de Horwitz
LOD	Limit of Detection (Límite de detección)
LOQ	Limit of Quantification (Límite de cuantificación)
MeOH	Metanol
S/N	Signal-to-Noise Ratio (Relación Señal-Ruido)
UE	Unión Europea
EFSA	European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
PET	Polietileno tereftalato
PC	Policarbonato

CAPÍTULO 1

RESUMEN

Durante el presente trabajo se muestra el desarrollo, optimización y validación de un método para la preparación y posterior determinación de seis bisfenoles -Bisfenol A, Bisfenol S, Bisfenol F, Bisfenol AF, Bisfenol Z y Diglicidil Éter del Bisfenol A- en muestras acuosas.

Los bisfenoles son compuestos orgánicos ampliamente usados en la fabricación de resinas epóxicas y polímeros. Su uso en la industria ha ocasionado la dispersión en el medio natural considerándose contaminantes emergentes. De igual forma, se ha demostrado que actúan como disruptores endocrinos y se han relacionado con una amplia lista de afectaciones a la salud en ambos sexos. La principal vía de exposición es la oral, concretamente por la ingesta de alimentos y bebidas contenidas en envases plásticos que incluyen a estos compuestos.

El método presentado en este trabajo hace uso de la técnica de extracción en fase sólida (EFS). La cual se utiliza ampliamente en la preparación de muestras líquidas debido a que permite tanto la limpieza de la muestra como la preconcentración de los analitos.

Se prepararon soluciones estándar de los bisfenoles y a partir de ellas se generaron muestras simuladas que contenían a los seis bisfenoles. Las condiciones óptimas para la extracción fueron 300 mg de fase C18 y 40 μm de diámetro de partícula, la activación y acondicionamiento se llevó a cabo con 5 mL de MeOH y 5 mL de agua, respectivamente. Se hizo pasar la muestra (30 mL $\text{H}_2\text{O}:\text{MeOH}$ 9:1) y se secó con vacío durante 10 minutos. La elución de los analitos se realizó con 1 mL de MeOH.

Las muestras fueron inyectadas en el sistema cromatográfico, la separación se llevó a cabo en una columna Zorbax Eclipse XDB C18 4.6mm \times 150 mm, 3.5 μm . Como fase móvil se empleó una mezcla de MeOH:Agua en gradiente, comenzando con una proporción 50:50 y llegando a 100:0 en un tiempo 10 minutos, con un flujo de 1 mL min^{-1} y temperatura de 40 $^\circ\text{C}$. El tiempo de análisis se fijó en 10 minutos con un tiempo de equilibrio de 5 minutos entre inyecciones. La detección de los analitos se realizó mediante un detector UV a longitudes de onda de 235 y 260 nm.

El método desarrollado mediante EFS-CLAR-DAD fue evaluado en el intervalo de 26 a 888 ng mL^{-1} obteniendo recobros en el rango 83% - 103%, una buena linealidad con $r^2 > 0.99$ y buena repetibilidad inter día con %RSD < 11%.

El método se probó en muestras de agua embotellada en garrafones, en muestras de agua contenidas en recipientes plásticos, así como en muestras de agua superficial recogidas en un criadero de peces. No se detectó a ninguno de los analitos en las muestras estudiadas.

INTRODUCCIÓN

Los bisfenoles son una familia de compuestos orgánicos ampliamente relacionados con la industria de los plásticos, ya sea que estos sean los monómeros que los conforman o simplemente se empleen en los procesos de fabricación.

Diversos estudios han demostrado que estos compuestos tienen una actividad estrogénica considerándose como disruptores del sistema endocrino por lo que afectan la producción, procesamiento y función de las hormonas en el cuerpo. De igual manera, estos compuestos se han relacionado con afectaciones a la salud como diabetes, obesidad, problemas cardiovasculares, enfermedades crónicas respiratorias, problemas en los riñones, cáncer de mama y próstata, problemas neuroconductuales, problemas en la dentición y desordenes reproductivos en ambos sexos.

Debido a esto, diversas agencias y organizaciones de salud a nivel internacional han expresado su preocupación respecto al uso de estos compuestos, en especial a su miembro más conocido que es el bisfenol A.

Los grandes cambios en el estilo de vida surgidos tras los eventos de la primera mitad del siglo XX han supuesto que gran parte de nuestros alimentos y bebidas estén ahora contenidos en envases de plástico o enlatados. Como consecuencia de esto, ingresamos al organismo pequeñas cantidades de bisfenoles siendo esta la principal vía de exposición en las personas.

De igual manera, derivado del proceso de producción tanto de los compuestos en sí, como de los productos en los que se emplea como materia prima, se ha liberado en el medio y se han encontrado estos compuestos en muestras de agua y suelo.

Durante este trabajo se muestra el desarrollo, optimización y validación de un método de la química analítica instrumental para el análisis de seis bisfenoles -BPA, BPS, BPZ, BPF, BPAF y BADGE- en muestras acuosas.

El método hace uso de una técnica de preparación conocido como extracción en fase sólida, que es ampliamente usada para el tratamiento de muestras líquidas. La técnica hace uso de cartuchos empacados con una fase cromatográfica que retiene los analitos y posteriormente se permite la elución de estos con un disolvente adecuado. Con lo anterior se consiguen dos cosas, la limpieza de la muestra al permitir lavar los interferentes y la preconcentración de los analitos, ya que estos se recuperan en un volumen menor al de la muestra que los contenía.

Los extractos obtenidos tras la EFS son analizados mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. Esta técnica instrumental permite la separación de los analitos en función de las diferentes afinidades que estos presenten con la fase estacionaria y la fase móvil. Una vez que se

separan, los analitos pasan por un detector de arreglo de diodos que genera una respuesta en función de la cantidad de analito presente, lo que se puede extrapolar a la concentración de los analitos en la muestra.

El presente trabajo se ha organizado de la siguiente forma, en primer lugar, se muestra una investigación documental acerca de los bisfenoles, incluyendo su naturaleza, propiedades fisicoquímicas, producción, uso y toxicidad. De igual manera se muestran otros métodos empleados para el análisis de estos compuestos en matrices acuosas. También se muestra una explicación más detallada de la extracción en fase sólida, los factores de los que depende, así como sus ventajas y desventajas.

Posteriormente se presenta la metodología empleada, detallando los materiales, disolventes y equipos con los que se llevó a cabo la actividad experimental. Se describe cómo se llevó a cabo la preparación de las disoluciones estándar de los bisfenoles de estudio, así como la recolección y obtención de las muestras. De igual forma se presenta la optimización y evaluación de las condiciones de extracción y separación cromatográfica, así como la validación del método evaluando los parámetros de linealidad, exactitud, repetibilidad, límite de detección y límite de cuantificación. Finalmente se describe cómo se lleva a cabo el análisis de las diferentes muestras de agua con el fin de probar el método.

El trabajo continua con los resultados obtenidos tras aplicar la metodología presentada y el análisis de estos mismos resultados. Para terminar, se presentan las conclusiones a las que se llegaron, así como las perspectivas a futuro derivadas de este trabajo.

ANTECEDENTES

Los bisfenoles son una familia de compuestos orgánicos que en años recientes han conseguido gran notoriedad en los medios, debido a su gran actividad biológica, sobre todo a nivel del sistema endocrino [1, 2].

De los integrantes que conforman esta familia de compuestos, el más reconocido y ampliamente usado es el bisfenol A. Este compuesto fue sintetizado por primera vez en 1891 por el químico ruso A. P. Dianin [3, 4].

El nombre del compuesto proviene de su estructura que consta de un átomo de carbono central al que se le unen dos grupos metilo y dos grupos fenol en la posición *para*. La forma general de esta estructura se repite en todos los demás compuestos de esta familia [2]. Las estructuras de los bisfenoles estudiados en este trabajo se muestran en la Figura 3.1.

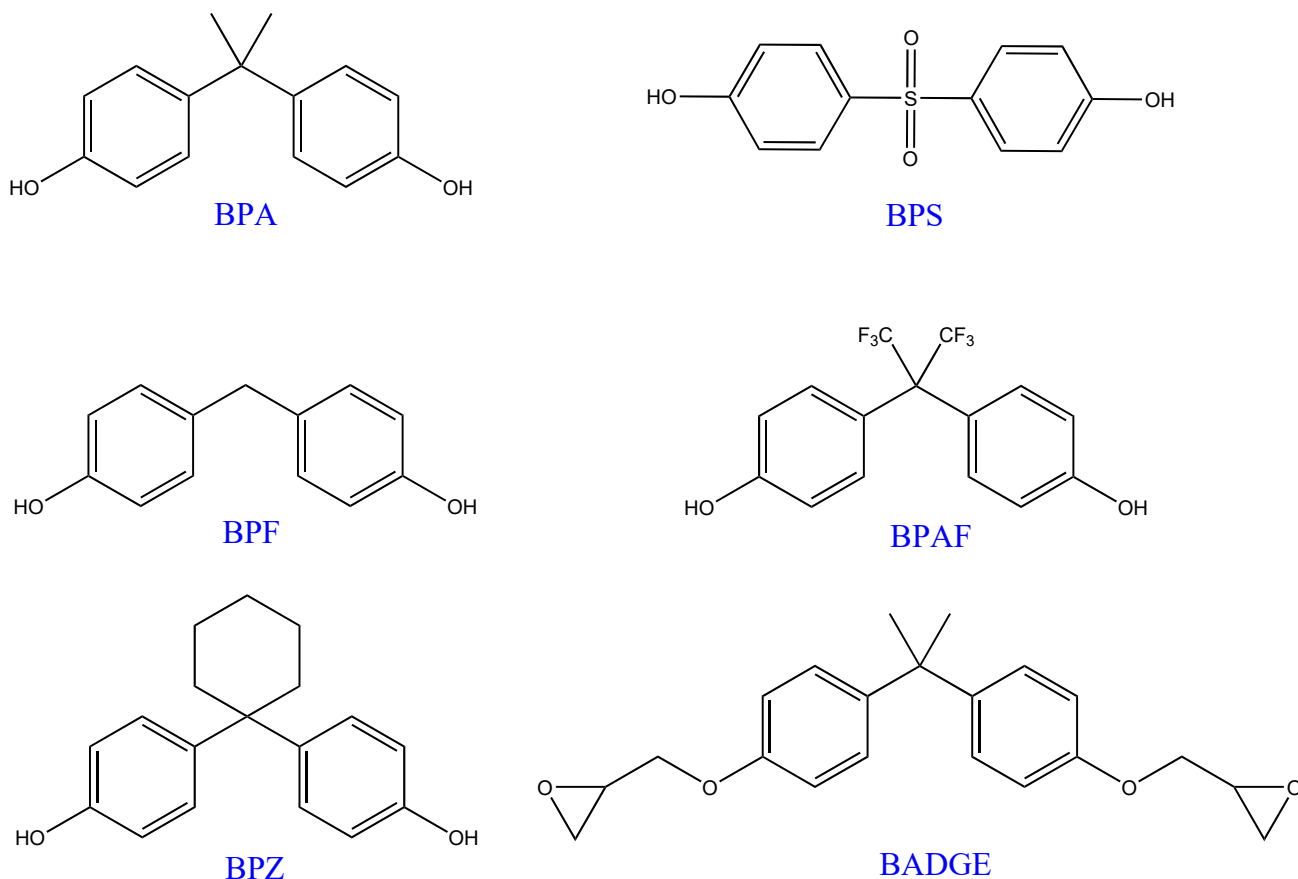


Figura 3.1: Estructura del BPA y algunos de sus análogos [2].
Estructuras realizadas con ChemDraw Profesional 17.0.

Fue hasta la década de los años 30 cuando se comenzó a notar su actividad como estrógeno [1,5]. Posteriormente, en la década de los 50, es cuando realmente se lleva a cabo el uso a gran escala de este compuesto, específicamente en la producción de resinas y polímeros [1,2].

Debido al uso del bisfenol A en muchos productos de uso cotidiano se especula que la exposición al BPA está muy extendida y que la gente está expuesta a niveles elevados del mismo [6].

Sección 3.1.

PRODUCCIÓN Y USO DE LOS BISFENOLES.

Debido a su actividad como estrógeno, en un primer momento se buscó aprovechar esta característica y generar tratamientos médicos con ella. Sin embargo, se descubrieron una gran variedad de efectos secundarios asociados a este compuesto (Ver Sección 3.4), lo que provocó que estos intentos cesaran y no prosperaran [1].

En los años 50 se descubrió la polimerización del BPA para producir policarbonatos [1,4]. Los policarbonatos presentan una serie de propiedades útiles como su resistencia a los impactos, al calor y a diferentes sustancias químicas. Esto conlleva a que se mantenga inalterado durante mucho tiempo. Aunado a su ligereza, transparencia, posibilidad de ser coloreado y a que es fácil de moldear y termoformar ha hecho que se produzcan grandes cantidades de estos plásticos [4].

Como consecuencia de esto, el BPA se convirtió en un producto químico de alto volumen de producción a pesar de sus ya reconocidas características como estrógeno sintético [2,4].

La producción a nivel industrial de BPA ocurre mediante la condensación de fenol con acetona en presencia de un catalizador ácido (como HCl) como se muestra en la Figura 3.2 [7,8].

De acuerdo con la firma *Mordor intelligence*, el mercado de BPA a nivel global se espera que alcance los 5.95 millones de toneladas para finales de 2023 [9].

Aunque a finales del siglo XX el país que más producía y demandaba bisfenol A era Estados Unidos, en los últimos años con el despegue de la región de Asia-Pacífico, sobre todo de China, el

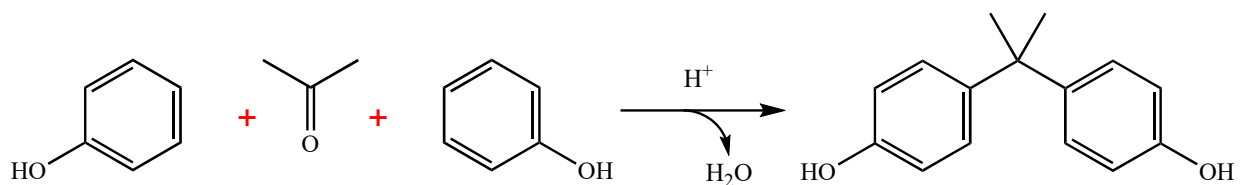


Figura 3.2: Reacción de síntesis del bisfenol [8].
Estructuras realizadas con ChemDraw Profesional 17.0.

mercado de bisfenol en esta región ha superado a la de Norte América [9,10].

Según estimaciones Asia produce el 35% del bisfenol A a nivel global, le siguen en orden de producción Europa y Norte América. También es en la región asiática donde se registra el mayor consumo de este compuesto, alrededor del 55% de la producción mundial, seguido nuevamente por Europa y Norte América [10].

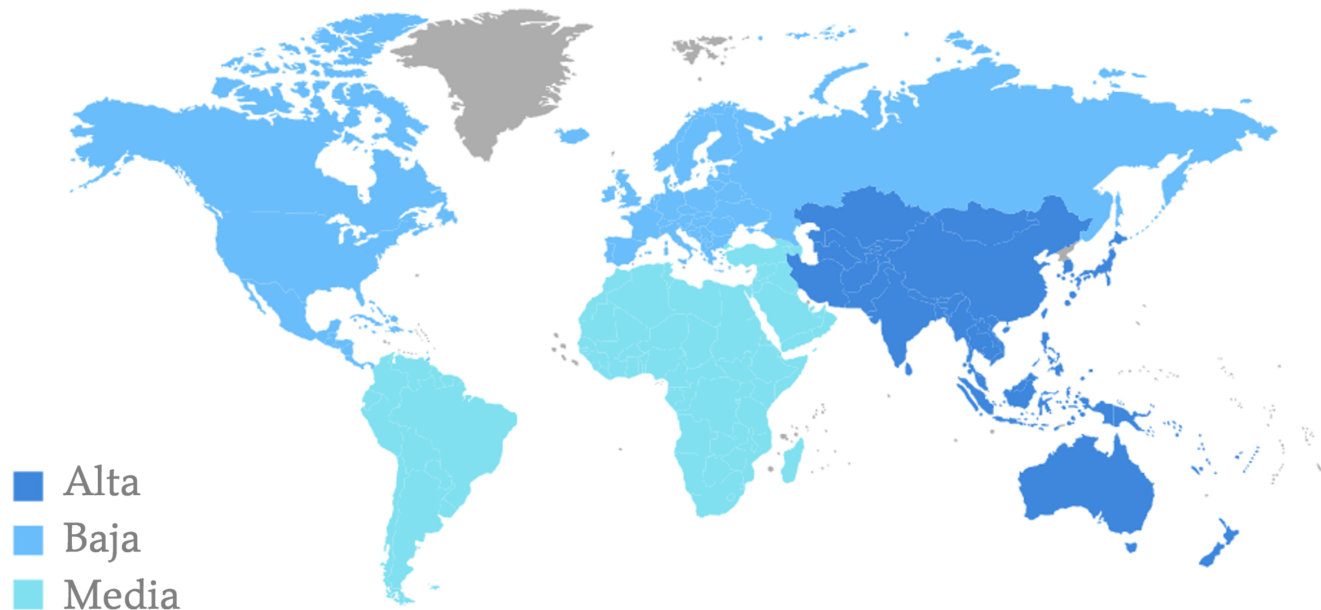


Figura 3.3: Mercado global de BPA. Tasa de crecimiento por región, 2022 - 2027
Imagen editada a partir de la encontrada en [9].

De toda la producción de bisfenol A en el 2020, se estima que la mitad se destina a la producción de policarbonatos mientras que un 20% se destinó a la fabricación de resinas epóxicas (Figura 3.4) [10].

En años recientes, se han comercializado productos con la etiqueta libre de BPA, sin embargo, muchos de estos productos sustituyen al BPA por algunos de sus análogos [2].

Además, los análogos se usan en muchas otras aplicaciones. En la Tabla 3.1 se muestran las aplicaciones principales a las que se destinan así como la cantidad estimada producida [2,11,12].

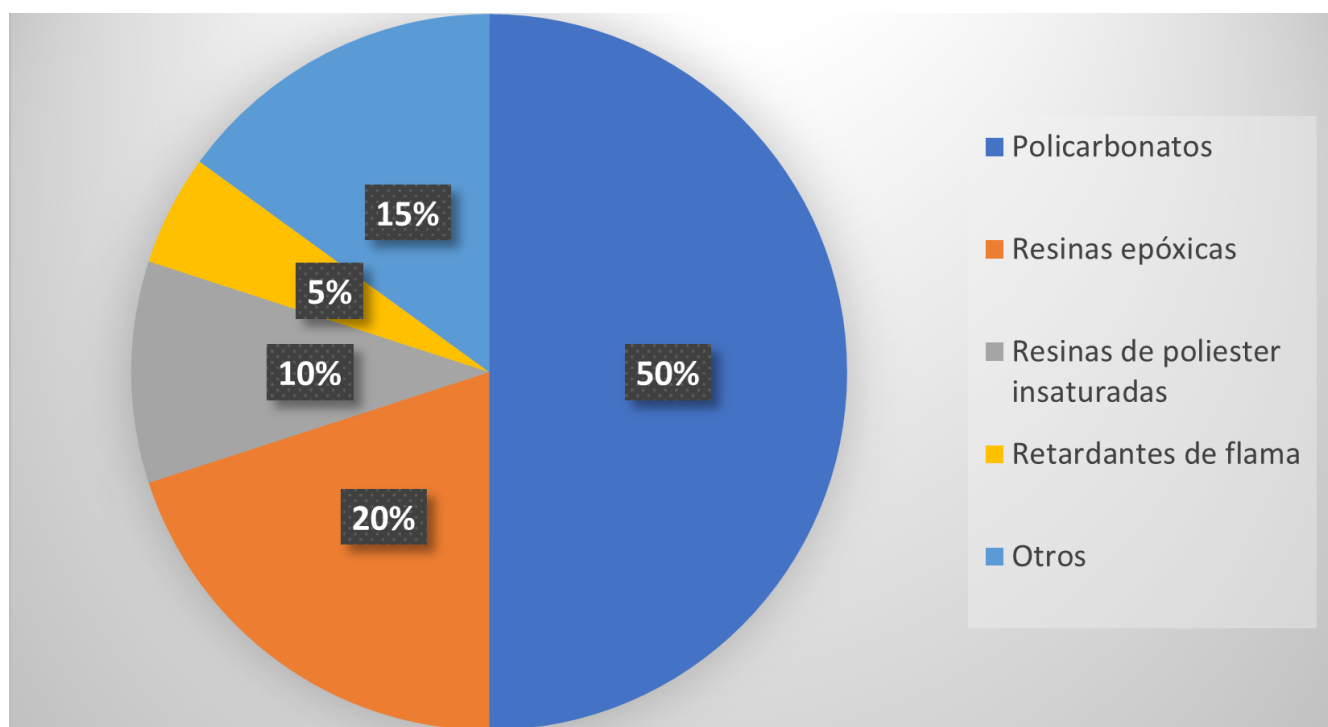


Figura 3.4: Distribución del BPA producido por uso final, 2020 [10].

Tabla 3.1: Aplicaciones de los análogos del BPA estudiados y producción estimada.

Compuesto	Aplicaciones	Producción estimada en toneladas año ⁻¹
BPS	Principal reemplazo del BPA en la producción de policarbonatos y productos de este material, producción de retardantes de fuego, papel térmico, intermediario en colorantes y pesticidas [2, 12].	10,000 – 100,000 (Espacio Económico Europeo, 2020) [2].
BPF	Resinas epóxicas y recubrimientos (Lacas, barnices, adhesivos plásticos, sellador dental y. empaques de comida) [2, 12].	1,000 – 10,000 (Espacio Económico Europeo, 2020) [2].
BPAF	Agente de entrelazamiento para fluoroelastómeros, monómero de poliimidas, poliamidas, poliésteres, copolímeros de policarbonato y polímeros que están en contacto con comida [2, 12].	100 – 1,000 (Espacio Económico Europeo, 2020) [2].
BPZ	Producción de películas de policarbonato [11].	No reportado
BADGE	Monómero en la producción de resinas epóxicas usado en contenedores de comida y bebida [2].	453 – 9,072 (EE.UU., 2015) [2].

Sección 3.2.

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS DE LOS BISFENOLES.

El bisfenol A y la mayoría de sus compuestos análogos son sustancias sólidas de color blanco a temperatura ambiente. Una excepción es el BADGE, que se presenta como un líquido viscoso en condiciones normales.

En la Tabla 3.2 se muestran algunas de las propiedades fisicoquímicas de los bisfenoles de estudio en este trabajo.

Aunque en la tabla solo se incluyan los bisfenoles con los que se llevó a cabo este trabajo es importante mencionar que existen una gran cantidad de compuestos dentro de la familia de los bisfenoles. A continuación se mencionaran algunos comportamientos de los bisfenoles en general, de acuerdo a las propiedades fisicoquímicas que presentan.

Los bisfenoles en general presentan un valor para la presión de vapor bajo, en el rango de 6.01×10^{-11} (BPP) a 5.23×10^{-7} (BPAF) mmHg a 25 °C. Esto, junto con su alto punto de ebullición nos indican que, en general, los bisfenoles tienen una baja volatilidad [2, 13, 14].

Dado el coeficiente de reparto octanol-agua ($\log K_{ow}$) de los bisfenoles, que se encuentra en el rango de 1.65 (BPS) a 6.25 (BPP) se presenta una variedad de comportamientos diferentes [14]. Por ejemplo, se considera que los contaminantes con valores de $\log K_{ow} > 3$ tienden a acumularse en los sedimentos y a bioacumularse en los tejidos de organismos acuáticos [2, 7]. Dado el valor de $\log K_{ow}$ del BPA se espera que tenga una baja bioacumulación mientras que muchos de los análogos del bisfenol A tienen una mayor capacidad de bioacumulación. Caso contrario ocurre con el BPS, que presenta un valor de $\log K_{ow} = 2.32$, lo que lo hace más hidrofílico y por tanto, no se espera que tenga una capacidad de bioacumulación significativa [2].

La solubilidad en agua de los bisfenoles también presenta un amplio rango de valores aunque se considera que tienen una solubilidad de muy baja a moderada. Incluso los bisfenoles más solubles en agua presentan una solubilidad en el orden de unos cuantos g L^{-1} [2]. Las diferencias en la solubilidad entre los bisfenoles pueden explicarse debido a los diferentes sustituyentes y grupos funcionales presentes en la estructura [15].

La vida media de los bisfenoles en diferentes matrices es variada, pero en general, se alarga en suelos y sedimentos y presentan valores bajos en el caso de aire y agua debido a procesos que se explicaran más adelante [2].

Tabla 3.2: Propiedades físicoquímicas de los bisfenoles empleados en este trabajo [2, 14].

Bisfenol	Formula química	Peso molecular (g mol ⁻¹)	log K _{ow} *	Solubilidad en agua a 25 °C (mg L ⁻¹)	Presión de vapor (mmHg)	pK _a	Punto de ebullición (°C)	Vida media (días)			
								Aire	Agua	Suelos	Sedimento
BPA	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	228.29	3.32	120	2.27×10 ⁻⁷	9.8 - 10.4	363.54	0.13	38	75	338
BPS	C ₁₂ H ₁₀ O ₄ S	250.27	2.32	1774	4.72×10 ⁻¹⁰	7.4 - 8.0	422.52	0.13	38	75	338
BPF	C ₁₃ H ₁₂ O ₂	200.23	3.46	617.64	3.72×10 ⁻⁷	9.8 - 10.5	351.92	0.13	15	30	135
BPAF	C ₁₅ H ₁₀ F ₆ O ₂	336.23	4.47 ^E	4.30	5.23×10 ⁻⁷	9.1 - 9.7	347.16	0.13	180	360	1621
BPZ	C ₁₈ H ₂₀ O ₂	268.36	5.48 ^E	1.47	8.75×10 ⁻⁹	9.8 - 10.4	408.98	0.13	38	75	338
BADGE	C ₂₁ H ₂₄ O ₄	340.4	3.84 ^E	0.74	1.1×10 ⁻⁷	NR	Descomposición	0.16	60	120	542

*Coeficiente de reparto octanol-agua.
E = Estimado.

Sección 3.3.

BISFENOLES COMO CONTAMINANTES EMERGENTES.

En 1962, Rachel Carson publicó su libro *Primavera silenciosa*, en el se describen los efectos perjudiciales de los pesticidas, específicamente del DDT (Diclorodifeniltricloroetano), para el medio ambiente y para la salud humana. Como consecuencia de su trabajo se empezó a volcar la atención pública y científica a las consecuencias de la liberación de compuestos químicos de origen humano al medio ambiente [16].

No existe un acuerdo unánime en cuanto a la definición de contaminantes emergentes [16], se suele considerar aquellos compuestos de naturaleza química cuya presencia en el ambiente no se considera significativa ya sea por su distribución o su concentración y debido a ello, pasan desapercibidos [17–19]. Esto trae como consecuencia una falta de regulaciones [20].

Con el avance de los métodos analíticos, estos compuestos están siendo ampliamente detectados y se estudia su potencial impacto ecológico y los impactos a la salud [17].

Aunque los contaminantes emergentes pueden estar presentes en todo el medio ambiente, es sobretodo en el agua donde su presencia es más advertida y estudiada [21]. La llegada de estos compuestos al agua ocurre en una multitud de puntos, desde la industria química, la industria ganadera o los hogares [16]. Un diagrama de la interacción de los contaminantes emergentes y el ciclo del agua se muestra en la Figura 3.5.

Uno de los compuestos habitualmente hallado en las listas de contaminantes emergentes es el bisfenol A. Su presencia en el medio ha sido detectada en agua y sedimentos y sus niveles han ido incrementando [2]. La encuesta nacional de reconocimiento para algunos fármacos y otros contaminantes emergentes detectó el bisfenol A en un 20% de las muestras en un estudio efectuada a cuerpos de agua destinadas al consumo humano [22]. De igual forma, en un estudio llevado a cabo en el Reino Unido, se detectó el bisfenol A en agua superficial de ríos del sur de Gales [23].

El bisfenol A liberado al ambiente en condiciones aerobias (como en ríos) posee una vida media relativamente corta de 4.5 - 4.7 días siendo degradado principalmente por bacterias [24] como *Bacillus thuringiensis*, *Pseudomonas putida* YC-AE1 y *Sphingomonas paucimobilis* FJ-4 que han demostrado su capacidad de degradar el BPA [25].

No obstante, la liberación continua de estos al ambiente por parte de las industrias y consumidores hace que se encuentre presente de manera continua, por ello se considera un compuesto químico pseudo-persistente [7].

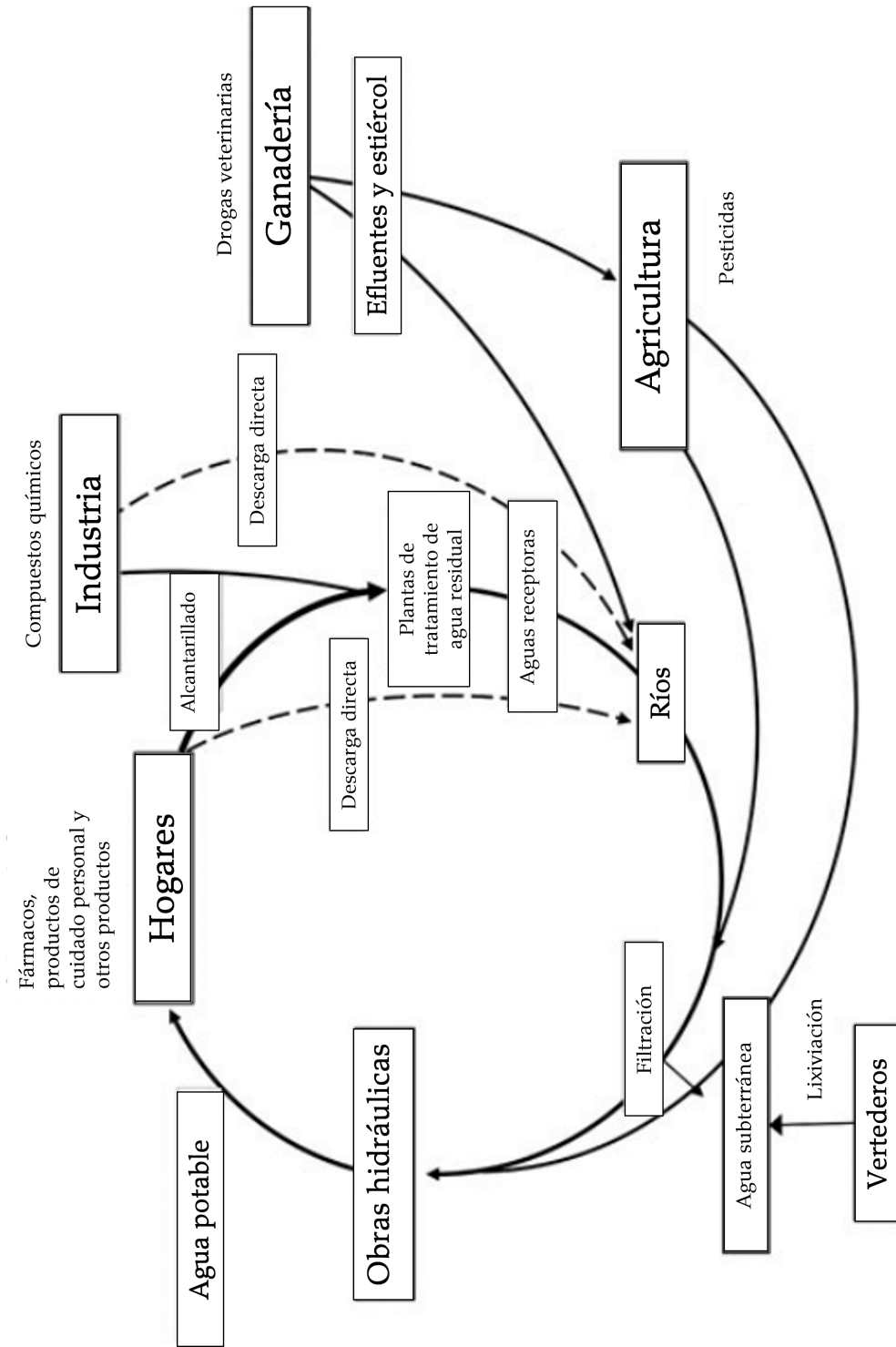


Figura 3.5: Contaminantes emergentes y su ciclo con el agua. Imagen modificada a partir de [16].

En condiciones anaerobias la biodegradación es limitada y se esperan concentraciones más altas [24]. De modo opuesto, la presencia en el aire representa menos del 1% de la cantidad de bisfenol A en el medio ambiente debido en parte a su baja volatilidad y a que en la atmósfera se lleva a cabo la foto-oxidación del BPA por lo que la concentración decae rápidamente [7].

La presencia de los bisfenoles en el medio ambiente surge de fuentes pre- y post-consumo. Las liberaciones pre-consumo ocurren principalmente durante la manufactura de policarbonatos y resinas epóxicas, por la liberación de los efluentes de las plantas de producción [26, 27].

Las liberaciones post-consumo se deben a la degradación de plásticos usados y otros artículos que contienen BPA o resinas [27] así como las descargas de las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales, lixiviación en los vertederos y la combustión de desechos domésticos [7].

Solo en el 2008 se estima que la liberación en Estados Unidos de bisfenol A durante la manufactura o el procesamiento ascendía a las 577 toneladas [7]. En la Unión Europea, la cantidad total liberada al medio ambiente es similar a la de los Estados Unidos [26].

Las consecuencias de la liberación del bisfenol A en el medio se reflejan sobretodo en la salud de la vida salvaje. Estudios han demostrado que a niveles de concentración encontrados en la naturaleza existen alteraciones tanto en vertebrados como invertebrados [24].

Los organismos acuáticos parecen ser los más afectados por la presencia de bisfenol [7, 28], estudios muestran que el BPA puede afectar el crecimiento, la reproducción y el desarrollo de estos organismos [29]. Se ha detectado que en el rango de concentraciones de 1.1 a 12.8 mg L⁻¹ presenta una toxicidad a nivel sistémico para varios taxones como son los dáfidos (pulgas de agua), misidáceos (camarones marsupiales) y peces de agua dulce y salada [7].

La información de los análogos del bisfenol como contaminantes emergentes se encuentra muy limitada. Dado el uso de estos compuestos como sustituto del bisfenol A en la industria, es de esperar la presencia cada vez más amplia de estos compuestos en el medio. Algunos estudios han detectado la presencia de estos bisfenoles en agua superficial y subterránea [30]. No obstante, el verdadero alcance de estos en el ambiente requiere más estudios.

Sección 3.4.

TOXICIDAD DE LOS BISFENOLES.

Los bisfenoles forman parte de los compuestos disruptores del sistema endocrino.

La EPA define a los disruptores endocrinos como:

“Un agente exógeno que interfiere con la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación de las hormonas naturales en el cuerpo que son responsables del mantenimiento de la homeostasis, reproducción, desarrollo y/o comportamiento” [31].

En este sentido, el bisfenol A es capaz de imitar las hormonas endógenas e interactuar con sus receptores, alterando la respuesta celular lo que lleva a desordenes en el cuerpo humano (Figura 3.6) [32, 33].

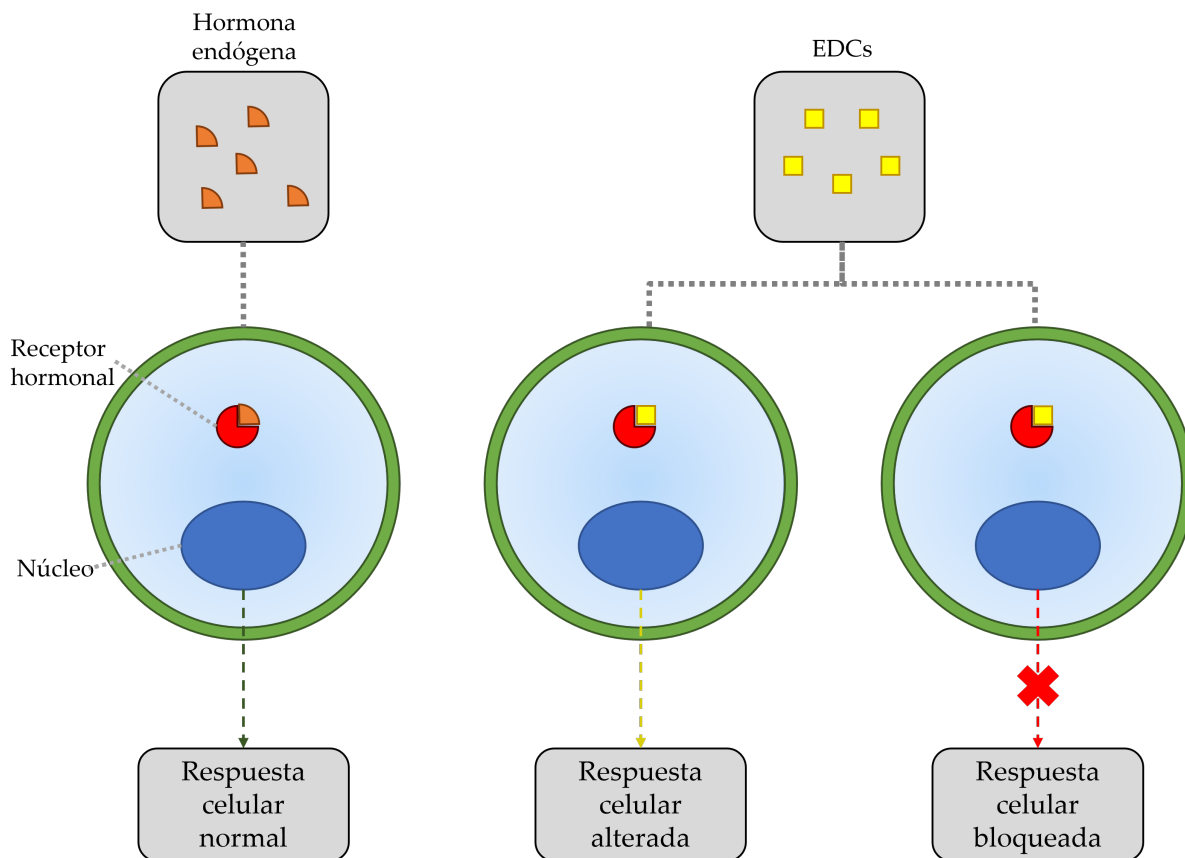


Figura 3.6: Representación del mecanismo de acción del bisfenol A a nivel celular. Imagen modificada a partir de [32].

El bisfenol A presenta una estructura similar a oestradiol y dietilestilbestrol y debido a ello puede estimular la respuesta celular al unirse a los receptores oestrógenos [32]. A pesar de poseer menos actividad que estos dos compuestos, su actividad no debe de ser ignorada [3].

Existe cada vez más evidencia de que el bisfenol A puede ser peligroso para la salud humana y estas consecuencias pueden darse incluso en concentraciones muy bajas [30, 32].

Se ha detectado la presencia de BPA en humanos en diversos tejidos y fluidos como son la orina, leche materna, cordón umbilical y placenta [34].

La presencia de bisfenol en el cuerpo humano se ha asociado además, a una gran variedad de afectaciones a la salud en diversos ámbitos [1, 4]. Entre las afectaciones a la salud que se han asociado con BPA se encuentran la diabetes [35], obesidad y problemas cardiovasculares [36, 37],

enfermedades crónicas respiratorias, problemas en los riñones, cáncer de mama y próstata, problemas neuroconductuales, problemas en la dentición y desordenes reproductivos en ambos sexos [12, 32, 38, 39].

En la Tabla 3.3 se muestran las afectaciones a la salud encontradas a diferentes dosis de BPA [32].

Pese a la cantidad limitada de estudios en los análogos del bisfenol, los resultados apuntan a que el BPS, BPF y BPAF presentan un mecanismo de acción similar y en el mismo orden de magnitud que el BPA en cuanto a su actividad endocrina [30]. De igual forma estos análogos han presentado alteraciones similares a las del BPA al estar presentes en el organismo [4, 30, 34, 40, 41]. Por ello, no se espera que los artículos que han reemplazado el BPA por algunos de sus análogos sean necesariamente más seguros [12, 30].

Debido a las crecientes preocupaciones por la afectación a la salud por parte del bisfenol A, Canadá en el año 2008, tomó medidas precautorias clasificando a este compuesto como tóxico. Por otra parte, tanto la FDA (EE.UU) como la EFSA (UE) declaran que el BPA es seguro a los niveles cotidianos de exposición humana para un adulto [1].

La EPA establece una Ingesta Diaria Tolerable (TDI) en $50 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$, Canadá ha establecido el límite en $25 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ [33].

A pesar de eso, la EFSA ha prohibido el uso de BPA en artículos destinados a bebés e infantes, e incluso ha rebajado el umbral anterior de seguridad de $50 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ a solo $4 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ en una ingesta diaria tolerable temporal (t-TDI) [42].

En México, la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), no ha regulado el uso del BPA ni de ninguno de sus componentes análogos [42].

Tabla 3.3: Afectaciones a la salud asociadas al BPA [32].

Etapa - sexo	Dosis (ng mL ⁻¹)	Efecto observado
Adulto - M	2.8	<ul style="list-style-type: none"> • 95% de los hombres tienen concentraciones detectables en orina con una asociación positiva entre las concentraciones de BPA y los niveles de hormona luteinizante (LH) en sangre, encargada de la producción de testosterona. • Reduce la fertilidad, decremento en el conteo de espermatozoides, proporción de espermatozoides normales y volumen seminal.
Adulto	2.8	<ul style="list-style-type: none"> • Hiperandrogenismo, disfunción sexual y problemas de nacimiento.
Adulto	3.91	<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedades cardiovasculares, diabetes y anomalías en enzimas hepáticas. • Diferencias fisiológicas y de comportamiento.
Adulto - F	3.91	<ul style="list-style-type: none"> • Irregularidades en el ciclo menstrual, Síndrome de ovario poliquístico, fallo ovárico prematuro, anomalías metabólicas y resistencia a la insulina. • Efectos en el sistema reproductor, alteración de la diferenciación sexual en el cerebro.
Niñez	3.91	<ul style="list-style-type: none"> • Hiperactividad en niños y niñas tras exposición prenatal.
Niñez	3, 050 (prenatal) 5, 280 (postnatal)	<ul style="list-style-type: none"> • Cambios emocionales y de comportamiento. • Altos niveles de ansiedad, depresión, agresión e hiperactividad.
Niñez	366	<ul style="list-style-type: none"> • Cambios neuroconductuales.
Niñez	1.08	<ul style="list-style-type: none"> • Daño oxidativo al ADN. • Incremento en presión sanguínea. • Bajos niveles de testosterona total en adolescentes masculinos y altos niveles de testosterona total en adolescentes femeninas.

Sección 3.5.

METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BISFENOLES EN AGUA Y NIVELES REPORTADOS.

Investigaciones previas en otros países han encontrado presencia de bisfenoles en muestras de agua potable envasada. Por ejemplo, en botellas fabricadas con polietilentereftalato (PET) se ha encontrado BPA en un rango de 12.4 - 44.9 ng L⁻¹ [40] y 70 - 4210 ng L⁻¹ [43]. De igual forma, se ha encontrado en agua contenida en botellas de policarbonato (PC) en el rango de 111.8 - 6452.8 ng L⁻¹ [40].

Algunos de esos estudios no se limitan solo al BPA si no que buscan los compuestos análogos. Se ha detectado el bisfenol S en botellas de PC en el orden de 0.6 ng L⁻¹ [40] o el bisfenol AF que se ha encontrado tanto en PET como PC en concentraciones de 4.9 ng L⁻¹ [40].

En muestras de agua superficial también se han realizado investigaciones para determinar el contenido de bisfenol A y, en menor medida, de sus compuestos análogos. Un estudio realizado en agua superficial de ríos de la provincia de Jiangsu, China encontró la presencia de BPA en un rango de 78.9 y 310.0 ng L⁻¹ [44]. En el mismo estudio se detectó BPB (0 - 7.9 ng L⁻¹), BPF (21.3 - 230.0 ng L⁻¹), BPS (3.2 - 7.8 ng L⁻¹) y BPZ (0 - 2.8 ng L⁻¹) [44].

En Francia, se detectó BPA en agua superficial y subterránea a una concentración máxima de 1, 275 y 1, 430 ng L⁻¹ respectivamente, de igual forma se detectó BPF con máximos de 10 y 20 ng L⁻¹ [43].

En México, un estudio realizado en aguas residuales del área metropolitana de la Ciudad de Monterrey encontró niveles de BPA menores a 450 ng L⁻¹ [45]. Mientras que otro estudio realizado en la misma zona encontró BPA en el rango de 5, 900 y 16, 600 ng L⁻¹ [46].

Los métodos analíticos desarrollados para el análisis de estos compuestos son variados. En la Tabla 3.4 se muestra una recopilación de publicaciones en donde se ha llevado a cabo la determinación de bisfenoles en muestras de agua ambiental y en la Tabla 3.5 se muestra la recopilación de estudios realizados en agua embotellada.

3.5. METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BISFENOLES EN AGUA Y NIVELES REPORTADOS.

Tabla 3.4: Metodologías reportadas para el análisis de bisfenoles en agua ambiental.

Muestra	Analitos	Técnica de extracción	Condiciones	Técnica de análisis	Recobro (%)	LOD LOQ	Ref.
Agua de foso	BPF, BPA, BPB, BPAF y BPZ	SLSC-ME	25 mg del polímero se añaden a 25 mL de muestra. Baño de agua a 50°C. Se añade Na ₂ SO ₄ para aglomerar. Se recupera en un vial y se añaden 150 µL de ACN para redisolver. Se filtra y se inyecta en el sistema cromatográfico.	CLAR-UV	44-77	200-900 ng L ⁻¹ 680-3,010 ng L ⁻¹	[47]
Agua de río	BPA	MSPE	40 mg de β-CD-Fe ₃ O ₄ /SiO ₂ se activan con MeOH y agua. Se agregan a 250 mL de BPA (50 ng mL ⁻¹) y se somica por 12 min. Reposo de 5 min y se separa con un imán. Lavado con 0.5 mL de agua. Desorción con 0.7 mL de 2% HAc:MeOH tres veces. Se secaron y redisolvieron en 1 mL de 2% HAc:MeOH.	CLAR-DAD	86.6±2	0.05 ng L ⁻¹ 0.15 ng L ⁻¹	[48]
Agua residual y agua superficial	BPE, BPC, BPA-DMC, BPBP, BPF, BADGE, BPADAC, BPZ, BPFL, BPAF, BPS y BPA	EFS	Se acondiciona con 3 mL MeOH y 3 mL agua. Se carga una muestra de 100 mL de agua. Lavado con 3 mL de MeOH al 5%, secado, lavado con 3 mL hexano. Elución con 3 + 3 mL de MeOH. Se seca y se derivatiza con 50 µL de BSTFA+1%TMCS (30 minutos, 30°C). La solución se inyecta en el sistema.	CG-EM	87-133	0.3-17.0 ng L ⁻¹ 1.0-50.0 ng L ⁻¹	[49]
Agua de estanque y agua residual	BPA	MIP-SPME	Se construyeron barras del polímero de 1.8 cm. Se sumergen en 30 mL de muestra y se agita a 150 rpm durante 120 minutos. Se recuperan las barras y se desorbe en 200 µL de MeOH:HAc (9:1) durante 10 minutos a 150 rpm.	CLAR-DAD	65.56-88.84	3 ng L ⁻¹ 10 ng L ⁻¹	[50]
Agua de grifo, lago y río	BPA	MSPE	10 g del solvente magnético se agregan a 100 mL de la muestra. Se agita en vortex 5 min. Se separa con un imán. Lavado doble con 1 mL de agua. Elución con agitación con 3 mL de ACN (2 min). Se separa el solvente, se seca y se redissuelve en 0.2 mL de MeOH al 50%, se filtra y se inyecta.	UHPLC-HRMS	44-77	0.2 ng L ⁻¹ 0.6 ng L ⁻¹	[51]
<p>SLSC-ME: Microextracción por Conversión Sólido-Líquido-Sólido. MSPE: Extracción en Fase Sólida Magnética. EFS: Extracción en Fase Fólida. MIP-SPME: Microextracción en Fase Sólida con Polímeros Impresos Molecularmente. CLAR: Cromatografía de Líquidos de Alta resolución. UV: Detector ultravioleta. DAD: Detector de Arreglo de Diodos. CG: Cromatografía de Gases. EM: Espectrometría de Masas. UHPLC: Cromatografía de Líquidos de Ultra Alta Resolución. HRMS: Espectrometría de Masas de Alta Resolución. BSTFA: N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida. TMCS: Clorotrimetilsilano. HAc: Ácido acético.</p>							

3.5. METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE BISFENOLES EN AGUA Y NIVELES REPORTADOS.

Tabla 3.5: Metodologías reportadas para el análisis de bisfenoles en agua embotellada.

Muestra	Analitos	Técnica de extracción	Condiciones	Técnica de análisis	Recobro (%)	LOD LOQ	Ref.
Agua embotellada	BPA	Th-MOF-SPE	Se prepara Th-MOF a partir de $\text{Th}(\text{NO}_3)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Se empacan 3 mg de Th-MOF entre tapones de algodón en una punta de micropipeta de 10 μL . Se cargan 40 mL de la muestra con ayuda de una jeringa y una punta de micropipeta de 100 μL . La elución se da con 400 μL de MeOH. La muestra se inyecta en el sistema cromatográfico	CLAR-DF	93-107	0.001 ng mL ⁻¹ 0.0032 ng mL ⁻¹	[52]
Agua embotellada (Expuesta al sol)	BPA	BSLPME-ID ⁴	Una mezcla binaria de DCM (74.2 μL) y DCE(125.8 μL) y acetona (1.56 mL) como solvente dispersante se agregó a 8.0 g de muestra. Se sometió a vortex por 45 s y se centrifugó por 2 minutos. La fase inferior se recuperó con una pipeta y se inyectó en el sistema CG-EM.	CG-EM	100.3	0.30 ng g ⁻¹ 0.99 ng g ⁻¹	[53]
Agua embotellada	BPA, BPB, BPC, BPE, BPF, BPP, BPS, BPZ, BPAP, BPAF	EFS	Acondicionamiento con 6 mL de MeOH y 10 mL de agua. Se carga muestra de 1000 mL de agua con BPA-d16 a 50 ng mL ⁻¹ . Secado de 2h a vacío. Elución con 3 mL EtAC y 3 mL MeOH. Se seca con N ₂ y se derivatiza con 50 μL de DMF y 50 μL de BSTFA+1%TMCS. Se seca y resuspende en 1 mL EtAC. Se inyecta en sistema CG-EM.	CG-EM	73.3-114.8	0.61-2.30 ng L ⁻¹ 2.04-7.67 ng L ⁻¹	[40]
Agua embotellada	BPA	EFS-L	Se añadió Na ₂ S ₂ O ₃ para eliminar cloro residual. Se centrifugaron las muestras para eliminar sólidos suspendidos. Se cargaron 4 mL de la muestra en una precolumna acoplada al equipo y luego se eluyeron directamente al sistema cromatográfico.	CL-EM/EM	123	8.3 ng L ⁻¹ 25 ng L ⁻¹	[43]

Th-MOF: Marco organometálico de Torio. **EFS:** Extracción en Fase Sólida. **BSLPME-ID4:** Microextracción en fase líquida con solventes binarios con dilución de isótopos cuádrupolares. **EFS-L:** Extracción en Fase Sólida en Línea. **CLAR:** Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. **DF:** Detector de Fluorescencia. **CG:** Cromatografía de Gases. **EM:** Espectrometría de Masas. **DCM:** Diclorometano. **DCE:** 1,2-dicloroetano. **DMF:** Dimetilformamida. **BSTFA:** N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida. **TMCS:** Clorotrimetilsilano. **EtAC:** Acetato de etilo.

Sección 3.6.

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).

3.6.1 Fundamentos de la CLAR.

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una de las técnicas analíticas más usadas con fines científicos y mediciones en laboratorio. La técnica de CLAR fue desarrollada en la década de 1970 basado en los mismos principios de la cromatografía en columna [54].

Es ampliamente usada en el análisis químicos, farmacéuticos y biomédicos, como también en el monitoreo de drogas debido a su habilidad para analizar, separar y purificar una variedad de muestras [55, 56]. La técnica ha ganado mucha popularidad debido principalmente a su confiabilidad y versatilidad [56].

La CLAR hace uso de una bomba de alta presión para impulsar la fase móvil a través de una columna empacada [54]. La separación de los componentes de una muestra se da cuando esta es inyectada en el seno de la fase móvil e impulsada por esta a través de la columna [54, 57].

El mecanismo de separación de los compuestos de interés se basa en las interacciones entre la fase estacionaria, la fase móvil y el o los analitos [56]. Así, los distintos compuestos recorren la columna a diferentes velocidades consiguiendo la separación [54].

La CLAR puede ser clasificada en dos tipos o modos:

- **Cromatografía en fase normal:** En este modo se emplea una columna de naturaleza polar (Por ejemplo, silica gel) mientras que la fase móvil es no polar. Debido a la naturaleza polar de la columna, los analitos polares interactúan más con la columna que aquellos no polares, por lo que estos últimos viajan más rápido y presentan tiempos de retención más cortos [54, 58].
- **Cromatografía en fase reversa:** En este modo la columna es de carácter no polar (Por ejemplo, C18 o C8) y se trabaja con una fase móvil polar. De esta forma, los analitos no polares interactúan más con la fase estacionaria que los compuestos polares. Por este motivo, los analitos no polares viajan más lento y se retienen más tiempo en la columna [54, 58].

La cromatografía en fase reversa es actualmente la más empleada en el análisis químico [59]. Es especialmente recomendada para la separación de compuestos de carácter hidrofóbico, es decir, aquellas que no tienen un carácter polar dominante. Sin embargo, la presencia de compuestos polares no excluye que se puede usar esta técnica [59, 60].

Como ya se mencionó, la CLAR hace uso de altas presiones. Esto debido a la necesidad de alcanzar buenos flujos a través de las columnas densamente empacadas con diámetros de partícula en el rango de 3 y 10 nm. Por ello, el equipo usado en CLAR suele ser más complejo que el empleado en otro tipo de técnicas cromatográficas [61]. En la Figura 3.7 se muestran los componentes típicos de un sistema para CLAR.

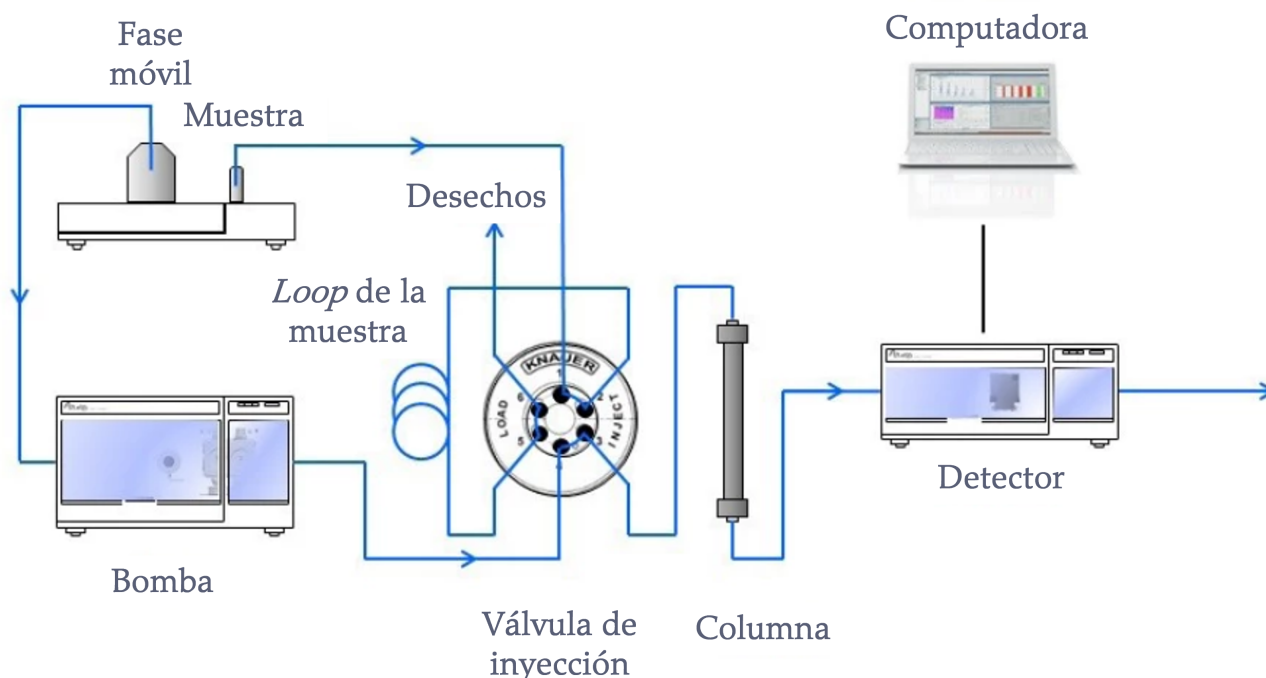


Figura 3.7: Diagrama de los componentes de un equipo de CLAR.
Imagen modificada a partir de la encontrada en [62]

Una vez separados los compuestos de interés estos pueden ser identificados y/o cuantificados mediante alguno de los detectores usados en CLAR [57]. Existe una variedad de detectores empleados en CLAR sin embargo, todos ellos se pueden agrupar en dos tipos: los que se basan en una propiedad de la solución (Como los detectores de índice de refracción, constante dieléctrica, etc.) y los que se basan en una propiedad del soluto o analito (Como los detectores UV o de fluorescencia) [61].

En este trabajo, se hace uso de un detector de arreglo de diodos (DAD) y un detector UV para la determinación de los bisfenoles estudiados. Estos detectores se fundamentan en la absorción de radiación electromagnética en la región UV por parte del analito. Además, el DAD permite medir la absorbancia a diferentes longitudes de onda, lo que permite la construcción de los espectros de absorción, de forma que puede ayudar con la identificación del analito [61, 63].

3.6.2 Parámetros cromatográficos en CLAR.

3.6.2.1 Tiempo de retención (t_r).

Se define como el tiempo transcurrido entre la introducción de la muestra y la máxima señal de respuesta detectada para un compuesto dado [59].

El tiempo de retención está estrechamente relacionado con las propiedades fisicoquímicas del

analito, por tanto puede proveer información cualitativa del compuesto [59]. En los casos en que la técnica de detección usada no es suficiente para conocer la identidad del compuesto, el tiempo de retención de la sustancia puede emplearse como identificador, siempre que haya sido previamente analizado un estándar de la misma sustancia [58, 59].

Es por esta razón que es sumamente importante que el tiempo de retención sea reproducible [58].

3.6.2.2 Resolución (R_s).

La resolución es un parámetro que permite medir el grado de separación entre dos señales [64]. De esta forma se describe la habilidad de la columna para separar los picos de interés, a mayor valor de resolución es más sencillo diferenciar la línea base entre dos picos adyacentes [65].

La resolución puede ser calculada mediante la ecuación 3.1 [64]:

$$R_s = \frac{2(t_{r2} - t_{r1})}{W_{b1} + W_{b2}} \quad (3.1)$$

Donde:

t_r = tiempo de retención.

W_b = Ancho del pico en la base (En unidades de tiempo).

Sección 3.7.

EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS).

La preparación de muestras es una parte crucial del análisis químico, pudiendo representar hasta un 80% del tiempo total del análisis [66]. La preparación de las muestras generalmente incluye la limpieza de la muestra, la preconcentración de los analitos y el fraccionamiento de la muestra [67].

Sin importar cual sea el método de preparación de la muestra, la importancia de esta parte del análisis no debe de ser subestimada en tanto que todos los errores que se cometan en esta parte, como lo puede ser un mal procesamiento de la muestra o una pérdida de los analitos, no pueden ser corregidos más adelante sin importar que tan buen desempeño presente la técnica de separación o análisis [66, 67].

Durante mucho tiempo, la técnica de preparación de muestras más usada era la extracción líquido-líquido que se basa en el reparto del analito entre una fase acuosa y una fase orgánica inmisible [66]. Sin embargo, esta técnica tiene ciertos inconvenientes como puede ser la gran cantidad de trabajo necesario para llevarla a cabo, dificultad para automatizar, formación de

emulsiones y el consumo de grandes volúmenes de solventes orgánicos [68].

Actualmente una técnica cada vez más empleada es la EFS. Esta técnica de análisis consiste en la transferencia de los analitos de interés de una fase acuosa a los sitios activos de una fase sólida y luego estos son recuperados con un solvente adecuado [66, 69]. Para que esto pueda llevarse a cabo, es esencial que los analitos a extraer tengan una mayor afinidad hacia la fase adsorbente que hacia la matriz que los contiene [66].

El uso de la EFS conlleva muchos beneficios durante la planeación y el procedimiento experimental como lo son su relativamente bajo costo, simplificación del proceso, reducción en los tiempos, produce menos desperdicios y conlleva un bajo consumo de solventes orgánicos [68, 69]. Además, tiene una cinética de absorción rápida, permite la limpieza de la muestra y la concentración de los analitos [69].

Estos dos últimos puntos cobran especial relevancia para el trabajo presentado aquí, puesto que en el análisis químico de contaminantes en el ambiente, los analitos de interés generalmente se encuentran en niveles de concentración realmente bajos, en el orden de ng g^{-1} o ng mL^{-1} y generalmente se encuentran dispersos en matrices complejas. Debido a esto, es esencial llevar a cabo la limpieza y la pre-concentración de las muestras ya que las técnicas analíticas no son lo suficientemente sensibles para la determinación directa de compuestos traza en muestras complejas [70].

La técnica actualmente ha ganado tanta aceptación que varias metodologías de la EPA incluyen la EFS como un procedimiento recomendado para la preparación de muestras en búsqueda de contaminantes orgánicos [67].

Los procedimientos de EFS generalmente consisten de cuatro etapas como se muestra en la Figura 3.8.

El acondicionamiento de la columna consiste en el empaquetamiento de la columna con la fase adsorbente así como la activación que consiste en el paso de un solvente adecuado para incrementar el área superficial efectiva [67, 68].

Al finalizar el acondicionamiento, una muestra que contenga el o los analitos a extraer se hace pasar a través del cartucho. Esto permite que los analitos e interferentes interactúen con la fase sólida y puedan quedar retenidos en esta si su naturaleza lo permite [71].

Posterior a la carga de la muestra y si la muestra lo requiere, se pueden hacer lavados para eliminar los interferentes [71]. Esta etapa puede omitirse si la matriz de la muestra no es compleja.

La elución de los analitos se da con un solvente adecuado y en un volumen menor al de la muestra original [72].

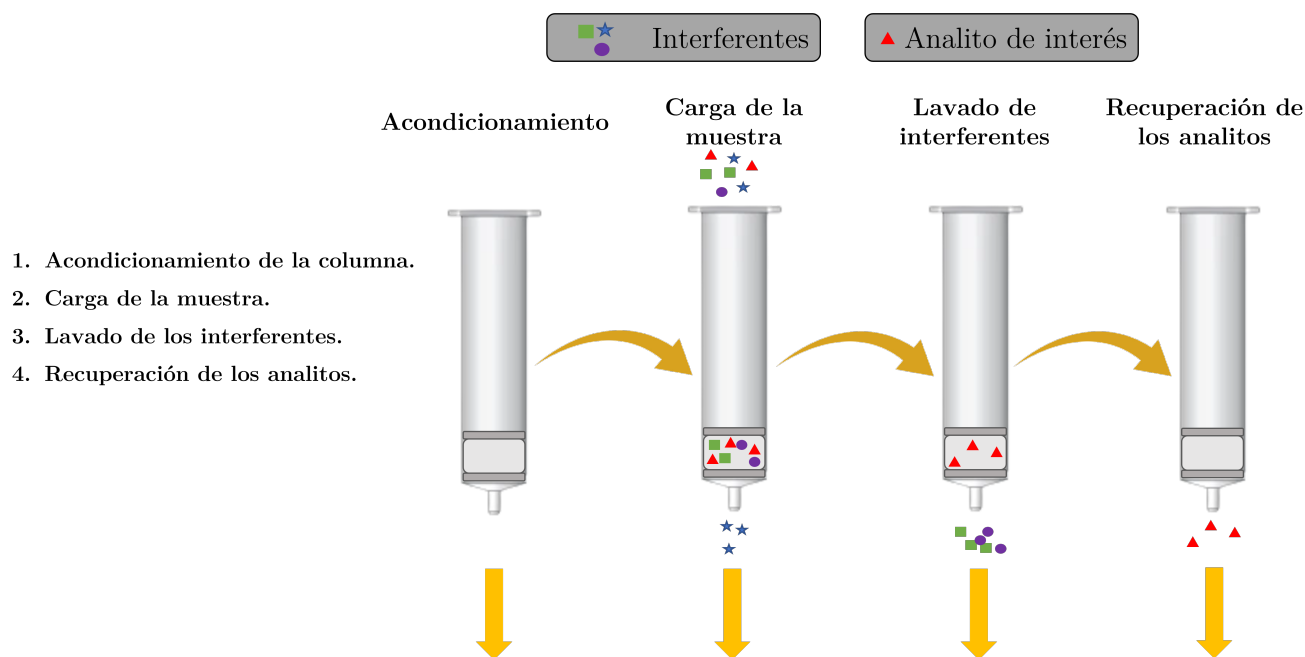


Figura 3.8: Etapas de la extracción en fase sólida.
Modificada a partir de [71].

Al recuperar únicamente los analitos se mejora la especificidad del método y dado que se recuperaron en un volumen menor al de la muestra se mejora la sensibilidad del mismo [72].

Desde la aparición de la EFS numerosos adsorbentes han aparecido, pudiendo hallarse adsorbentes clásicos para fase reversa como C18 y C8, los de fase normal (silica y alumina), intercambio iónico, adsorbentes poliméricos y nuevos materiales como polímeros impresos molecularmente o inmunoadsorbentes [66].

Sección 3.8.

PARÁMETROS PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

3.8.1 Linealidad.

Este parámetro hace referencia a la capacidad de un método analítico para obtener una señal o respuesta proporcional a la concentración o cantidad de un analito en un rango determinado [73].

La linealidad se evalúa mediante la calibración del método. Para ello, se prepara una serie de estándares que contienen el compuesto de interés en concentraciones conocidas. La calibración se consigue al graficar la respuesta instrumental (y) en función de la concentración del analito (x) [61].

La función matemática que representa esta relación es:

$$y = mx + b \quad (3.2)$$

Donde:

m = pendiente de la recta.

b = ordenada al origen.

Una vez obtenida la gráfica, se debe obtener la “mejor” recta que pase por los puntos experimentales [61, 74].

Esto se puede obtener mediante el método de mínimos cuadrados. Este método parte de dos suposiciones, la primera es que existe una relación lineal entre la señal analítica y la concentración. La segunda suposición consiste en que todos los errores se encuentran en el eje de respuesta, y y no existe error alguno en el eje de la concentración, x . El método minimiza la suma de los cuadrados de los residuos o desviaciones del eje y entre los puntos experimentales y los valores predichos por la recta [61, 74].

Los valores de la pendiente y la ordenada al origen pueden ser calculados mediante las ecuaciones 3.3 y 3.4, respectivamente [74].

$$m = \frac{\sum_i^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (3.3)$$

$$b = \bar{y} - m\bar{x} \quad (3.4)$$

Donde:

\bar{x} = Valor promedio de x .

\bar{y} = Valor promedio de y .

El intervalo de confianza de la pendiente se puede calcular mediante la ecuación 3.5.

$$m \pm t_{n-2} S_m \quad (3.5)$$

Donde S_m es el error estándar de la pendiente calculado con la ecuación 3.6 y t es el valor t de *student* al nivel de confianza que se desee obtener el intervalo.

$$S_m = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} = \frac{\sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y})^2}{n-2}}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (3.6)$$

Donde:

\hat{y} = Valor predicho de y .

De forma similar, se puede calcular el intervalo de confianza de la ordenada al origen mediante las ecuaciones 3.7 y 3.8.

$$b \pm t_{n-2} S_b \quad (3.7)$$

$$S_b = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i (x_i)^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (3.8)$$

Es también importante señalar el significado de la pendiente y la ordenada al origen. La pendiente indica la sensibilidad del método, es decir, cuanto varía la respuesta ante cambios en la concentración. La pendiente tiene unidades de respuesta sobre concentración [73].

Por otra parte, la ordenada al origen es un estimador que se relaciona con la presencia de interferencias o errores sistemáticos. La ordenada al origen tiene unidades de respuesta y su intervalo de confianza debe de incluir al cero para poder considerar una relación directamente proporcional [73].

3.8.2 Exactitud.

La organización internacional de estándares (ISO) define a la exactitud como:

“El grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y el valor de referencia aceptado del analito” [74].

Es decir, la exactitud describe la proximidad al valor verdadero de una medida individual o un valor promedio [74]. La forma más utilizada de hacer esto es con el porcentaje de recuperación o recobro. En los análisis químicos, es común tomar como medida de exactitud la cercanía del valor medido con algún estándar [75].

Aunque el valor verdadero de la concentración no se conozca, es posible estimarla al emplear una sustancia de referencia preparada con un procedimiento más exacto [75].

El recobro puede ser calculado empleando la ecuación 3.9 [75]:

$$\%R = \frac{x}{\hat{x}} 100 \quad (3.9)$$

Donde:

x = Valor medido.

\hat{x} = Valor verdadero o estándar.

3.8.3 Repetibilidad inter-día.

La repetibilidad es una medida que refleja la precisión del método, es decir, generar resultados similares bajo condiciones reproducibles en diferentes preparaciones de la misma muestra. En el caso de la repetibilidad inter-día, los diferentes análisis deben llevarse a cabo con los mismos equipos, reactivos y bajo las mismas condiciones en días diferentes [73, 76].

El parámetro estadístico preferiblemente empleado para este estudio es la desviación estándar relativa (%RSD). Este parámetro evalúa el error en la dispersión de los datos en comparación con la media. [73].

El porcentaje de desviación estándar relativa o coeficiente de variación se puede calcular con la ecuación 3.10.

$$\%RSD = \frac{S}{\bar{x}} 100 \quad (3.10)$$

Donde S es la desviación estándar que puede ser calculada mediante la ecuación 3.11 para una muestra de n datos.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_i^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (3.11)$$

3.8.4 Límites de detección y cuantificación.

El límite de detección es generalmente definido como la mínima concentración o cantidad del analito que genera una señal en el instrumento que es significativamente diferente de la señal producida por el blanco o el ruido instrumental [61, 74].

3.9. EVALUACIÓN DE LA REPETIBILIDAD EN UN ANÁLISIS MEDIANTE LA TEORÍA DE HORWITZ.

Una de las formas de calcular este parámetro, una usada de manera común en el análisis instrumental es mediante el valor de 3 veces la relación S/N [77].

Por otra parte, el límite de cuantificación se considera como la concentración mínima a la que un analito puede ser cuantificado de manera confiable, precisa y exacta [74]. Se calcula de manera similar al límite de detección pero considerando un valor de 10 S/N [77].

Sección 3.9.

EVALUACIÓN DE LA REPETIBILIDAD EN UN ANÁLISIS MEDIANTE LA TEORÍA DE HORWITZ.

En 1980 la AOAC publica un artículo titulado *Quality Assurance in the analysis of Foods for Trace Constituents* [78], en dicho artículo se estudian los resultados de más de 50 estudios colaborativos inter laboratorios en búsqueda de elementos traza. Como resultado de dicho estudio se encontró la relación entre el coeficiente de variación (en potencias de 2) con la concentración de los analitos (en potencias de 10) con independencia del método analítico [79].

La ecuación 3.12 es conocida como ecuación de Horwitz y permite obtener el valor predicho del %RSD bajo condiciones reproducibles [79].

$$\%PRSD = 2^{1-0.5\log C} \quad (3.12)$$

Donde:

C = concentración.

Al obtener los valores de %RSD para diferentes valores de concentración se obtiene la distribución de la desviación estándar relativa [79]. Tal como se ejemplifica en la Figura 3.9, el %RSD aceptable no se mantiene igual para concentraciones en diferentes ordenes de magnitud, en su lugar, la distribución se asemeja más a una trompeta [79, 80].

El valor del %RSD calculado por la ecuación de Horwitz es una valor de referencia, en su lugar, es más conveniente el uso de un parámetro conocido como proporción de Horwitz o HorRat [80]

La proporción de Horwitz puede ser calculada mediante la ecuación 3.13 [80].

$$HorRat = \frac{\%RSD_R}{\%PRSD_R} \quad (3.13)$$

Donde:

%RSD = Desviación estándar relativa experimental.

%PRSD = Desviación estándar relativa predicha por la ecuación de Horwitz.

3.9. EVALUACIÓN DE LA REPETIBILIDAD EN UN ANÁLISIS MEDIANTE LA TEORÍA DE HORWITZ.

El rango del valor de HorRat para ser considerado aceptable debe estar entre 0.5 y 2 [80]. En validaciones intra-laboratorio es necesario adaptar el rango por lo que debe de estar entre 0.3 y 1.3 para ser considerado aceptable [80].

De cualquier manera, la interpretación de los valores por debajo o por arriba del rango descrito anteriormente se puede entender de la siguiente forma: valores de HorRat < 0.3 puede deberse a un conocimiento previo del contenido de la muestra o a una alta precisión en los diferentes ensayos. Por otra parte, los valores de HorRat > 1.3 pueden deberse a deficiencias en el método o errores experimentales o del instrumento [80].

Debido a esto, en los casos donde la proporción de Horwitz no se encuentre en el rango descrito es preferible un valor por debajo del intervalo mencionado que por encima del mismo.

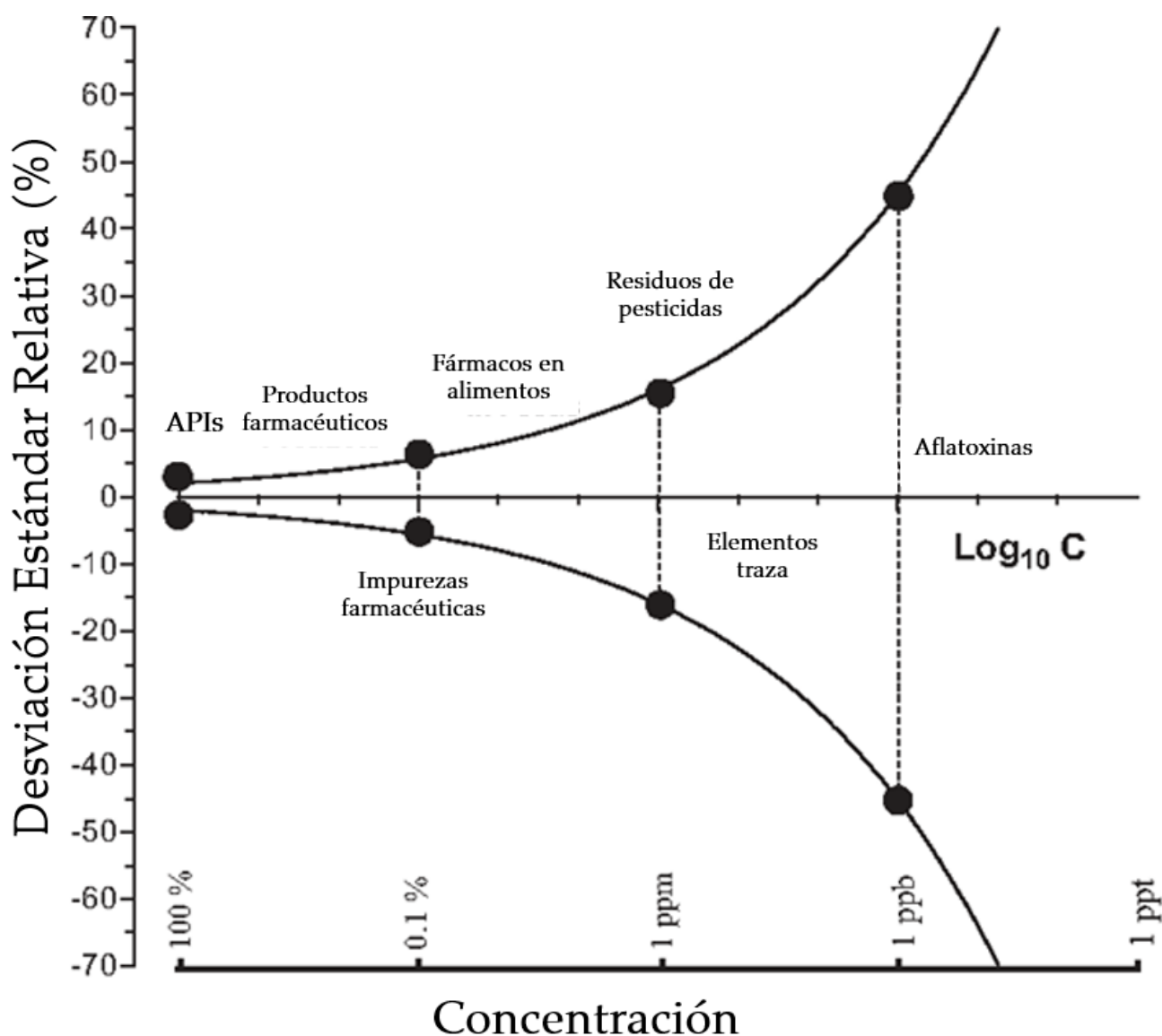


Figura 3.9: Trompeta de Horwitz.
Imagen modificada a partir de [81].

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS

Sección 4.1.

OBJETIVO GENERAL.

- Desarrollar, optimizar y validar un método analítico para la determinación del contenido de bisfenoles en muestras de agua mediante la extracción en fase sólida seguida del análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución.

Sección 4.2.

OBJETIVOS PARTICULARES.

- Establecer las condiciones cromatográficas óptimas (composición de la fase estacionaria y fase móvil, flujo de la fase móvil, temperatura y longitud de onda) para la separación de los analitos.
- Realizar una curva de calibración para cada uno de los bisfenoles bajo las condiciones óptimas.
- Establecer las condiciones óptimas (tipo de fase estacionaria, disolventes y volumen de elución) para la extracción en fase sólida de muestras acuosas fortificadas.
- Evaluar el desempeño del sistema cromatográfico a través de la linealidad, precisión y límites de detección y cuantificación.
- Validar el método desarrollado para el análisis de los bisfenoles en muestras acuosas mediante los parámetros de linealidad, exactitud, repetibilidad, límite de detección y límite de cuantificación.
- Aplicar el método validado en diversas muestras acuosas para la identificación de los bisfenoles.

METODOLOGÍA

Sección 5.1.

MATERIALES.

La realización del presente trabajo requirió de los materiales descritos en la Tabla 5.1

Sección 5.2.

EQUIPO E INSTRUMENTACIÓN.

El equipo de laboratorio empleado durante la realización de este trabajo consistió en lo siguiente:

- Balanza analítica RadWag modelo AS 220.R2
- Termoagitador magnético
- Baño de ultrasonido

Para el análisis cromatográfico se emplearon dos equipos. El primero es un sistema cromatográfico de líquidos de la marca Agilent Technologies serie 1100 conformado por los siguientes módulos:

- Bomba cuaternaria modelo G1311A
- Auto muestreador G1329A
- Compartimento de la columna G1316A
- Detector UV de longitud variable modelo G1314A

El segundo sistema igualmente es de la compañía Agilent Technologies serie y se encuentra conformado por los módulos:

- Bomba cuaternaria G1311A
- Compartimento de la columna G1316A
- Detector de arreglo de diodos G1315B
- Además, cuenta con una válvula para inyección manual con *loop* marca Rheodyne de 20 μL .

Tabla 5.1: Lista de material empleado para el desarrollo del método de análisis.

Categoría	Material
Reactivos	<ul style="list-style-type: none"> • BPA, Sigma Aldrich, Pureza: 97% • BPS, Sigma Aldrich, Pureza: 98% • BPZ, Sigma Aldrich, Pureza: 98% • BPF, Sigma Aldrich, Pureza: 98% • BPAF, Sigma Aldrich, Pureza: 100% • BADGE, Sigma Aldrich, Pureza: 100%
Disolventes	<ul style="list-style-type: none"> • MeOH Grado HPLC, Tecsiquim • ACN grado HPLC, Tecsiquim • Agua desionizada (18 MΩ cm)
Adsorbentes	<ul style="list-style-type: none"> • Fase Bondelut-C18 40 μm, Agilent Technologies • Fase ELUT-PPL 125 μm, Agilent Technologies
Material de vidrio	<ul style="list-style-type: none"> • Vasos de precipitados de 5, 10, 50, 100 y 250 mL. • Agitador de vidrio • Pipeta graduada de 5 mL • Matraz Kitasato de 250 mL • Frascos ámbar de 7 y 25 mL • Reservorios para fase móvil de 250 y 500 mL
Material volumétrico	<ul style="list-style-type: none"> • Matraces volumétricos de 1, 5 y 25 mL • Pipetas volumétricas de 3 y 5 mL.
Otros	<ul style="list-style-type: none"> • Cartuchos de polipropileno de 6 mL para extracción en fase sólida • Frits de polipropileno. Diámetro: 1/2 pulgada; 20 μm. • Micro espátula • Gotero • Tapones de goma • Manguera • Manifold para EFS con 12 posiciones para cartuchos, SUPELCO

Sección 5.3.*PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES ESTÁNDAR.*

Se prepararon 25 mL de una solución estándar para cada uno de los seis bisfenoles a una concentración de $1200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Los bisfenoles se disolvieron y aforaron empleando ACN.

A partir de estas soluciones estándar se realizaron las diluciones correspondientes para la obtención de disoluciones de los bisfenoles a las concentraciones 24 y $240 \mu\text{g mL}^{-1}$. Estas concentraciones se eligieron debido a que se sabe que los bisfenoles no se encuentran a concentraciones altas y se estimó que con estas concentraciones se podía construir una curva de calibración adecuada para el sistema y para el método. El aforo de estas soluciones se realizó con una solución de MeOH al 20% en donde el resto fue agua desionizada.

Todas las soluciones se almacenaron en viales ámbar de volumen adecuado y en refrigeración para evitar pérdidas por evaporación debidas a la naturaleza volátil del ACN y el MeOH.

Sección 5.4.*OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS DE AGUA.*

El método desarrollado fue probado en diferentes muestras acuosas, estas fueron las siguientes:

Tabla 5.2: Muestras analizadas mediante el método EFS-CLAR-DAD desarrollado.

Tipo de muestra	Muestras
Agua desionizada contenida en recipiente plástico	<ul style="list-style-type: none"> • 3 muestras contenidas en botellas. • 1 muestra contenida en biberón de plástico. • 1 muestra contenida en tupper plástico.
Agua purificada	<ul style="list-style-type: none"> • 2 muestras de agua de garrafón adquiridas en supermercado. • 1 muestra de agua de garrafón adquirida en purificadora local.
Agua superficial	<ul style="list-style-type: none"> • 5 muestras de agua de criadero de peces.

Las muestras contenidas en recipientes de plástico se analizaron por triplicado. Para la obtención de las muestras se depositaron 100 mL de agua desionizada y filtrada en los recipientes, posteriormente se dejó el recipiente cerrado durante 24 horas para permitir una posible migración de los bisfenoles al seno del líquido.

5.5. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN Y ANÁLISIS ÓPTIMAS.

Adicionalmente se mantuvo un volumen igual de agua en un vaso de precipitados de vidrio bajo las mismas condiciones con la finalidad de obtener un sistema blanco.

Las muestras de agua purificada se obtuvieron de diferentes locales, dos fueron compradas en tiendas de autoservicio mientras que la tercera muestra fue comprada en una purificadora local.

Las muestras de agua superficial se obtuvieron de un criadero de peces de ornato localizado en el municipio de Ayala perteneciente al Estado de Morelos en la ubicación con las coordenadas 18°45'05.0"N 98°55'50.0"W donde se mantienen los animales en tinas plásticas o en estanques recubiertos con lonas plásticas. Las muestras de agua de criadero se mantuvieron en congelación ($T=-4^{\circ}\text{C}$) hasta su análisis.

Tanto en las muestras de agua de garrafón como en las de agua superficial se empleó como blanco agua desionizada y filtrada.



Figura 5.1: Estanques del criadero de peces localizado en Morelos.
Imágenes propias.

Sección 5.5.

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN Y ANÁLISIS ÓPTIMAS.

5.5.1 Selección de la longitud de onda

La selección de la longitud de onda se realizó mediante la obtención de los espectros de absorción de los analitos. Para ello, se inyectaron estándares individuales de los analitos a una concentración de $12.48 \mu\text{g mL}^{-1}$ y se configuró el detector de arreglo de diodos para escanear y guardar el espectro de absorción en el ápice del pico cromatográfico.

5.5.2 Selección de las condiciones de separación.

La separación de los bisfenoles se llevó a cabo en una columna Zorbax Eclipse C18 de 4.6 mm × 150 mm y un tamaño de partícula de 3.5 μm. Se inyectaron estándares individuales, por triplicado, de los bisfenoles a una concentración de 24.960 μg mL⁻¹ bajo las condiciones mostradas en la Tabla 5.3 para determinar el tiempo de retención y el orden de elución de cada analito.

Posteriormente, se inyectó una mezcla de estándares a 24.960 μg mL⁻¹ para evaluar si la separación de los analitos se realizaba bajo las condiciones descritas.

Tabla 5.3: Condiciones del sistema cromatográfico.

Condición	Valor
Volumen de inyección	20 μL
Columna	Zorbax Eclipse XDB C18 4.6×150 mm; 3.5 μm.
Flujo	1 mL min ⁻¹
Fase móvil (Gradiente)	t = 0 min. MeOH:H ₂ O (50:50% ^{v/v})
	t = 10 min. MeOH (100% ^{v/v})
Temperatura de la columna	40 °C

Sección 5.6.

EVALUACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.

La evaluación del sistema cromatográfico se realizó mediante el cálculo de los siguientes parámetros: Linealidad, repetibilidad y los límites de detección y cuantificación.

5.6.1 Linealidad del sistema.

La linealidad del sistema se evaluó mediante la construcción de una curva de calibración externa. Esta se construyó con seis diferentes concentraciones para cada bisfenol, siendo estas 0.792, 1.560, 3.120, 6.240, 12.480 y 24.960 μg mL⁻¹. Se realizó una sola repetición por punto de la curva.

Los sistemas fueron preparados a partir de los estándares de 24 μg mL⁻¹ para los primeros tres sistemas, los tres sistemas restantes se realizaron a partir de la solución a 240 μg mL⁻¹.

Se evaluó la linealidad del sistema mediante regresión lineal (mínimos cuadrados) con ayuda de Microsoft Excel 365 para las gráficas $\text{Área} = f(\text{Concentración})$.

5.6.2 Repetibilidad inter-día.

La repetibilidad del sistema se evaluó mediante la variación en las áreas en dos días diferentes de un punto medio de la curva de calibración. Se calculó la desviación estándar, el %RSD y el uso de la teoría de Horwitz mediante Microsoft Excel 365.

5.6.3 Límites de detección y cuantificación.

Los valores de límite de detección y cuantificación del sistema se calcularon de forma gráfica a partir del cromatograma resultante del primer punto de la curva de calibración.

Se estableció como límite de detección la concentración correspondiente a una altura de 3 veces la relación S/N. Esto se realizó para cada uno de los bisfenoles de estudio. De igual manera, el límite de cuantificación se estableció como la concentración correspondiente a una altura de 10 veces la relación S/N para cada bisfenol.

Sección 5.7.

OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

La optimización de la extracción en fase sólida se realizó mediante el estudio de los parámetros mostrados en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4: Parámetros y condiciones por evaluar para la optimización de la EFS.

Parámetro	Condición
Fase adsorbente	<ul style="list-style-type: none">• Fase C18 40 μm.• Fase PPL 125 μm.
Volumen de elución	<ul style="list-style-type: none">• 1 mL.• 2 mL.
Polaridad de la matriz	<ul style="list-style-type: none">• 30 mL de agua.• 27 mL de agua + 3 mL de MeOH.

El procedimiento general para la extracción en fase sólida seguido durante la realización de este trabajo se muestra en la Figura 5.2.

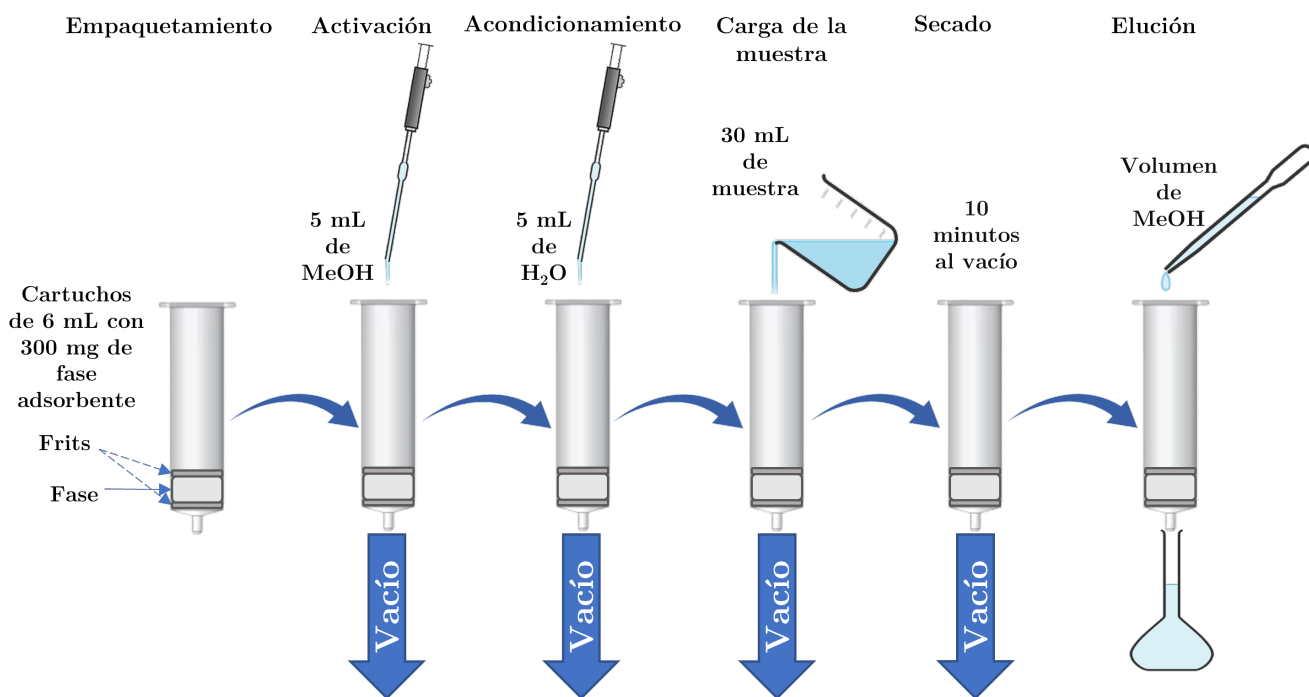


Figura 5.2: Procedimiento general para la EFS empleado.
Imagen propia.

5.7.1 Elección de fase adsorbente.

Para ello, se empacaron cuatro cartuchos de EFS con 300 mg de fase C18 y cuatro cartuchos con la misma cantidad de fase PPL.

Los cartuchos se colocaron en la caja de vacío según el montaje ejemplificado en la Figura 5.2. La activación de la fase sólida se llevó a cabo con 5 mL de MeOH y posteriormente se llevó a cabo el acondicionamiento con 5 mL de H₂O desionizada y filtrada.

Las muestras simuladas consistieron en volúmenes de agua desionizada fortificados con una cantidad conocida de bisfenoles. Para ello se prepararon cuatro sistemas con 30 mL de agua, tres de ellos se fortificaron con los bisfenoles, utilizando 26 μL de una solución a 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$, lo anterior da como resultado una concentración de bisfenoles en agua de 208 ng mL^{-1} . Un sistema adicional se mantuvo sin fortificar con la solución estándar para ser utilizado como blanco.

Posterior a la carga de las muestras simuladas, se realizó un secado al vacío de 10 minutos. La desorción de los analitos se realizó con 1 mL de MeOH, recuperándose en un matraz volumétrico.

5.7.2 Volumen de desorción.

La optimización del volumen de desorción se realizó mediante recuperaciones sucesivas del disolvente de desorción.

Para conseguir esto se empacaron cuatro cartuchos con 300 mg de fase C18 (3 extracciones con muestra fortificada más un sistema blanco) y se realizó la EFS. La muestra consistió en 30 mL de agua fortificada con 104 μL de la solución de bisfenoles a 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para tener una concentración de bisfenoles en agua de 832 ng mL^{-1} .

Al momento de la recuperación de los analitos se recuperó el primer mililitro en un matraz volumétrico y posteriormente en un segundo matraz volumétrico se recuperó el segundo mililitro en salir del cartucho asegurándose de no perder ninguna cantidad de disolvente al momento de cambiar el matraz.

5.7.3 Polaridad de la matriz.

La evaluación de la polaridad de la matriz se evaluó mediante la adición de MeOH a las muestras simuladas.

Para evaluar este parámetro se empacaron por duplicado cuatro cartuchos para EFS con 300 mg de fase C18.

El procedimiento de la EFS fue seguido como lo indica la Figura 5.2, la única diferencia radica en la composición de la muestra. El primer estudio se realizó con muestras de 30 mL de agua mientras que el segundo estudio se realizó con 27 mL de agua a la que se le añadió 3 mL de MeOH. En ambos casos se fortificaron las muestras con 104 μL de la solución de bisfenoles a 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$, lo que conlleva una concentración en el agua de 832 ng mL^{-1} .

La recuperación de los analitos se llevó a cabo con 1 mL de MeOH en ambos casos.

Sección 5.8.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE EFS-CLAR-DAD.

La validación del método desarrollado se efectuó a partir de los siguientes parámetros: Linealidad, exactitud, repetibilidad, límites de detección y cuantificación.

5.8.1 Linealidad.

La linealidad del sistema se evaluó mediante la construcción de una curva de calibración por medio de la inyección de los extractos obtenidos tras la EFS.

Para ello previamente se fortificaron sistemas de 30 mL con las soluciones estándar de bisfenoles a 24 y 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de manera que los sistemas tuvieran concentraciones de 26.40, 52.00, 104.00, 208.00, 416.00 y 832.00 ng mL^{-1} .

Cada punto de la curva de calibración se realizó por triplicado más un sistema blanco.

Los extractos fueron inyectados en el sistema cromatográfico, las áreas correspondientes para cada bisfenol fueron registradas y a partir de estos datos se construyeron las curvas de calibración **Área = $f(\text{Concentración})$** . Se analizó la linealidad por regresión lineal con ayuda de la herramienta análisis de datos de Microsoft Excel 365.

5.8.2 Exactitud.

La exactitud del método se evaluó mediante el cálculo del recobro obtenido para cada bisfenol (Véase apéndice D.2). Para ello, fue necesaria la inyección de un sistema control cuya concentración igualara a la concentración teórica de un recobro completo de los analitos considerando el factor de concentración tras la EFS para cada punto de la curva de calibración indicada en la sección anterior.

Se calculó la concentración recuperada y posteriormente se construyó la siguiente curva **Concentración recuperada = $f(\text{Concentración agregada})$** considerándose como porcentaje de recobro global para cada analito el valor de 100 veces la pendiente obtenida tras la regresión lineal obtenida mediante Microsoft Excel 365. De igual forma, el intervalo de confianza de la pendiente multiplicado por 100 nos indica el intervalo del recobro del método.

5.8.3 Repetibilidad inter-día.

La repetibilidad se obtuvo mediante el análisis por triplicado de un punto medio de la curva en dos días diferentes. Se calculó el porcentaje de recobro promedio para cada día y a partir de estos valores se calculó la desviación estándar, el %RSD y el coeficiente de Horwitz mediante Microsoft Excel 365.

5.8.4 Límites de detección y cuantificación.

La evaluación de estos parámetros se realizó de forma gráfica (Ver Apéndice D.1) tomando como referencia de concentración el punto más bajo de la curva de calibración construida como se indica en la sección 5.8.1.

El límite de detección se estableció como la concentración correspondiente a una altura de 3 veces la relación S/N para cada bisfenol mientras que el límite de cuantificación se calculó a partir de un valor de 10 veces la relación S/N.

Sección 5.9.

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE AGUA.

Los diferentes tipos de muestras, tal como se mostraron en la sección 5.4 fueron analizadas usando el método optimizado de EFS-CLAR-DAD. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado junto con un blanco adecuado para cada una.

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Sección 6.1.

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN Y ANÁLISIS ÓPTIMAS.

6.1.1 Selección de la longitud de onda.

Tras la inyección de los estándares y el posterior análisis de los espectros de absorción se determinó que era necesario el uso de dos longitudes de onda para el estudio de los bisfenoles.

En el caso del bisfenol S se encontró que la longitud de onda adecuada era 260 nm. Para el resto de bisfenoles en estudio se determinó que la longitud de onda adecuada era de 235 nm.

Los espectros de absorción de los bisfenoles pueden consultarse en el apéndice C en las Figuras C.1 - C.6.

6.1.2 Selección de las condiciones de separación.

La inyección de soluciones estándar individuales de cada bisfenol permitió obtener los tiempos de retención de los analitos, comprobándose que cada bisfenol presenta un tiempo de retención característico y diferente a los otros, con un %RSD < 3.78%. El orden de elución de los analitos así como los tiempos de retención promedio se reportan en la Tabla 6.1. Un ejemplo de los cromatogramas resultantes se muestra en la Figura 6.1.

Tras la inyección por triplicado de la mezcla de los bisfenoles a $24.960 \mu\text{g mL}^{-1}$ se comprobó que las condiciones probadas eran adecuadas para la separación de los bisfenoles presentándose una buena resolución (Tabla 6.1) entre los picos asociados a cada analito.

Tabla 6.1: Orden de elución y tiempos de retención promedio.

Orden de elución	Bisfenol	Tiempo de retención promedio (minutos)	%RSD (n = 3)	Resolución promedio
1	BPS	2.349	1.10	7.74
2	BPF	4.424	0.21	5.75
3	BPA	5.950	0.12	4.46
4	BPAF	7.251	3.38	3.07
5	BPZ	8.090	0.08	3.48
6	BADGE	8.880	0.05	-

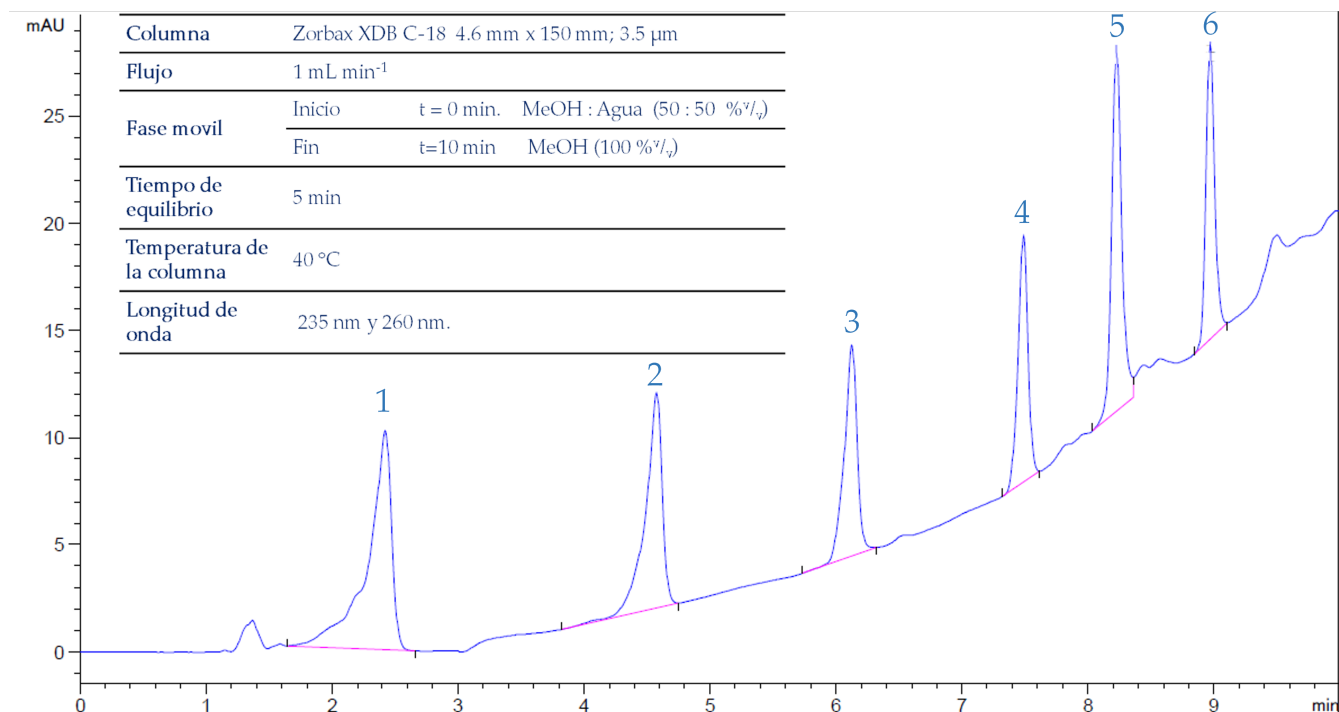


Figura 6.1: Picos correspondientes a cada analito y el orden de elución.
(1. BPS, 2. BPF, 3. BPA, 4. BPAF, 5. BPZ, 6. BADGE.)

Debido a que el método no tiene una duración excesiva y las señales presentan una buena resolución entre sí, se decidió no probar más variaciones en el método de análisis. Por lo que las condiciones óptimas se muestran en la Figura 6.1.

El tiempo entre inyecciones se estableció en 5 minutos debido a que con este tiempo se alcanzaba nuevamente el equilibrio de la composición de la fase móvil y los tiempos de retención se mantenían.

Sección 6.2.

EVALUACIÓN DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO.

6.2.1 Linealidad del sistema.

Para cada uno de los bisfenoles fue construida una curva de calibración en el intervalo 0.792 - 24.960 μ g mL⁻¹.

En la Figura 6.2, se puede observar la gráfica $\text{Área} = f(\text{Concentración})$ correspondiente al BPA y BPZ. Las gráficas correspondientes para los bisfenoles restantes pueden consultarse en el apéndice B en las Figuras B.1 y B.2.

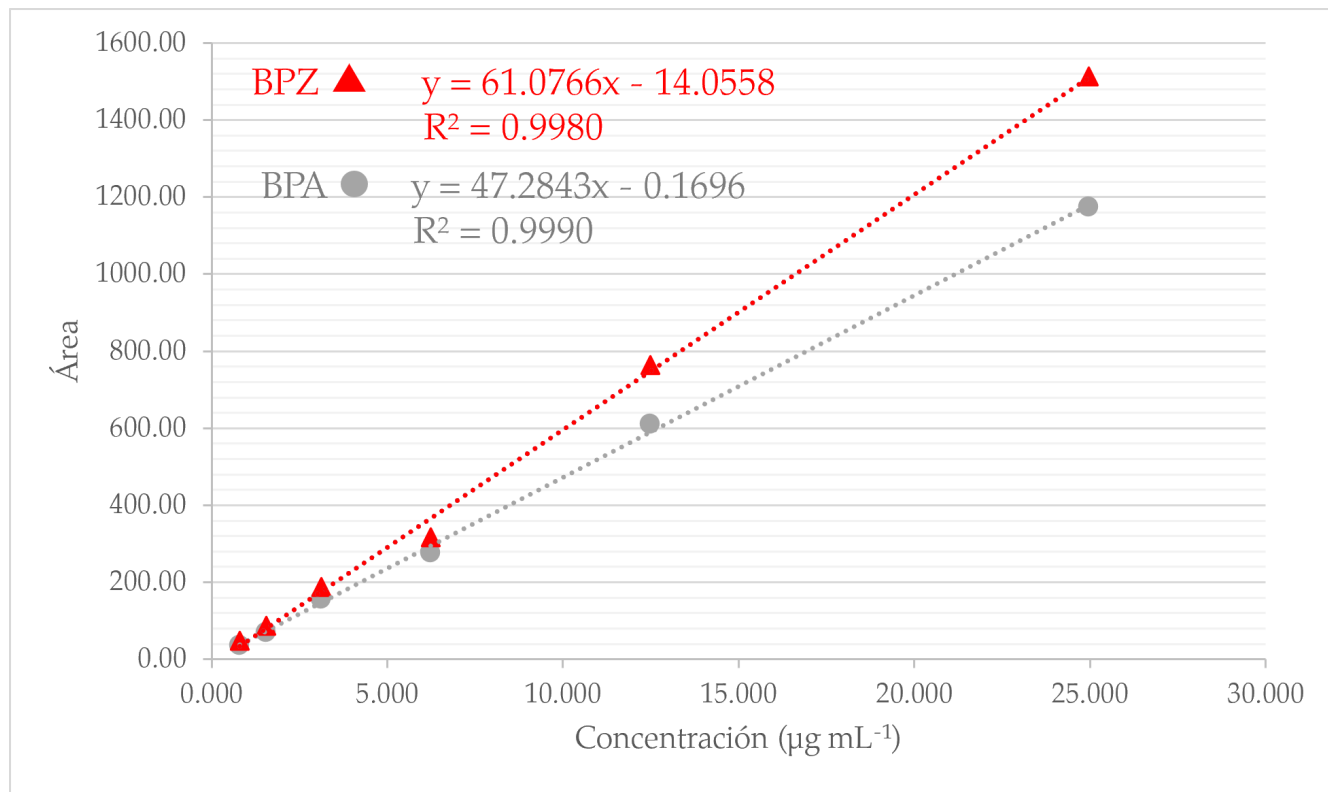


Figura 6.2: Curva de calibración del sistema cromatográfico (BPZ y BPA). Gráfica $\text{Área} = f(\text{Concentración})$ realizada para la evaluación de la linealidad del sistema cromatográfico para BPZ y BPA.

La regresión lineal permite obtener las ecuaciones que mejor se ajustan en cada caso. Los valores de estas ecuaciones, así como los intervalos de confianza al 95% ($\alpha = 0.05$) pueden encontrarse en la Tabla 6.2.

Tabla 6.2: Linealidad del sistema.

Bisfenol	Pendiente (mAU mL μg^{-1})	Ordenada al origen (mAU)	r^2
BPS	109.2613 ± 5.1018	-58.5018 ± 60.0222	0.9989
BPF	59.3837 ± 5.3301	11.2620 ± 62.7079	0.9958
BPA	47.2843 ± 2.0295	-0.1696 ± 23.8767	0.9990
BPAF	42.5835 ± 0.2560	-1.5273 ± 3.0120	1.0000
BPZ	61.0766 ± 3.7669	-14.0558 ± 44.3173	0.9980
BADGE	42.7970 ± 3.1077	-0.3093 ± 36.5617	0.9973

En todos los casos el intervalo de confianza para la ordenada al origen incluye al cero, lo que resulta correcto para una curva de calibración. De igual forma, los valores del coeficiente de determinación se consideran adecuados ($R^2 > 0.98$) en todos los casos indicando un correcto ajuste a la ecuación de la recta.

6.2.2 Repetibilidad inter-día.

La repetibilidad del sistema se evaluó mediante la comparación de las áreas asociadas a los analitos en dos días diferentes para el sistema de $3.120 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Se encontró que el %RSD entre los resultados de ambos días es menor a 9.38% como se muestra en la Tabla 6.3.

Tabla 6.3: Repetibilidad en el sistema cromatográfico.

Bisfenol	%RSD
BPS	9.38
BPF	5.69
BPA	5.28
BPAF	7.00
BPZ	3.91
BADGE	1.61

Tal como se explica en la sección 3.9, en el intervalo de concentraciones que se trabaja es más adecuado el uso de la distribución de Horwitz del %RSD [79].

A la concentración de $3.120 \mu\text{g mL}^{-1}$ el valor del coeficiente de Horwitz es de 13.48%. Al aplicar la ecuación correspondiente para obtener el valor de la proporción de Horwitz se obtienen los valores mostrados en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4: Proporción de Horwitz para el sistema cromatográfico.

Bisfenol	HorRat
BPS	0.7
BPF	0.4
BPA	0.4
BPAF	0.5
BPZ	0.3
BADGE	0.1

Para los primeros cinco bisfenoles el valor para la proporción de Horwitz se encuentra dentro del rango considerado como aceptable para validaciones intra-laboratorio (0.3 - 1.3) con excepción del BADGE, en este caso el valor de HorRat se encuentra por debajo del límite. Sin embargo, como se mencionó en el capítulo de antecedentes, para los valores que se encuentren en valores por debajo de 0.3, aún es posible considerarlos como adecuados, puesto que señalan una repetibilidad superior a la esperada según la teoría de Horwitz para el intervalo de concentraciones en las que se trabajó.

6.2.3 Límites de detección y cuantificación.

Tras la obtención del cromatograma resultante del primer punto de la curva de calibración del sistema, es decir, aquel cuya concentración es de $0.792 \mu\text{g mL}^{-1}$, se determinó que la relación S/N tiene una altura de 0.033 cm en la escala de trabajo. Este valor de relación S/N se calculó por medio de las desviaciones en la línea base.

Tal como se mencionó en la sección 5.6.3, el LOD y LOQ se consideró como 3 y 10 veces la relación S/N respectivamente. Como se explica en el apéndice D.1, es posible relacionar la altura de estos valores con una concentración para cada uno de los bisfenoles.

Se determinó que los LOD y LOQ para los bisfenoles en el sistema cromatográfico son los que se muestran en la Tabla 6.5.

Tabla 6.5: Límites de detección y cuantificación en el sistema cromatográfico.

Bisfenol	LOD ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
BPS	0.0496	0.1654
BPF	0.0481	0.1603
BPA	0.0493	0.1644
BPAF	0.0417	0.1390
BPZ	0.0307	0.1025
BADGE	0.0382	0.1275

Sección 6.3.

OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

6.3.1 Elección de fase adsorbente.

Los extractos obtenidos tras la EFS con ambas fases fueron inyectados bajo las condiciones óptimas en el sistema cromatográfico. Los valores promedio así como las barras de error para las áreas correspondientes a cada bisfenol con ambas fases se muestran en la Figura 6.3.

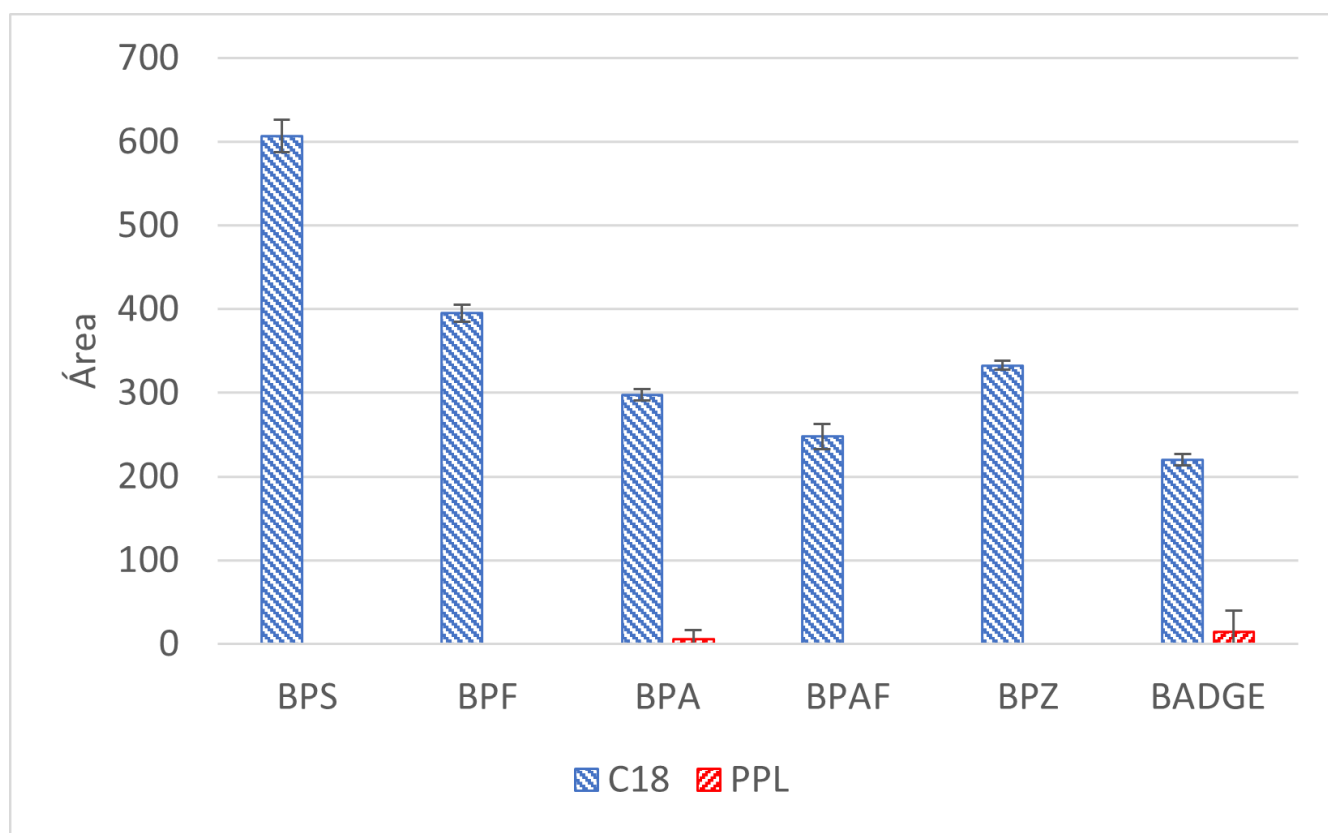


Figura 6.3: Área promedio de los bisfenoles en función de la fase adsorbente empleada.

El uso de fase C18 resultó adecuado para la extracción de los seis bisfenoles mostrando resultados reproducibles ($\%RSD < 6.2$; $n = 3$).

Por otra parte, el uso de la fase polimérica PPL no arrojó resultados satisfactorios puesto que en dos de los extractos no se detectó ninguno de los bisfenoles y en la tercer réplica aparecen dos picos que corresponden al BPA y al BADGE. Esto descarta el uso de la fase polimérica como adecuada para la extracción en fase sólida de los bisfenoles.

Debido a estos resultados, la fase seleccionada como óptima para la EFS fue la fase C18 de 40 μm .

6.3.2 Volumen de elución.

Posterior a la selección del adsorbente, se procedió con la optimización del volumen de elución.

Tanto las áreas promedio como las barras de error para los picos de los analitos se muestran en la Figura 6.4.

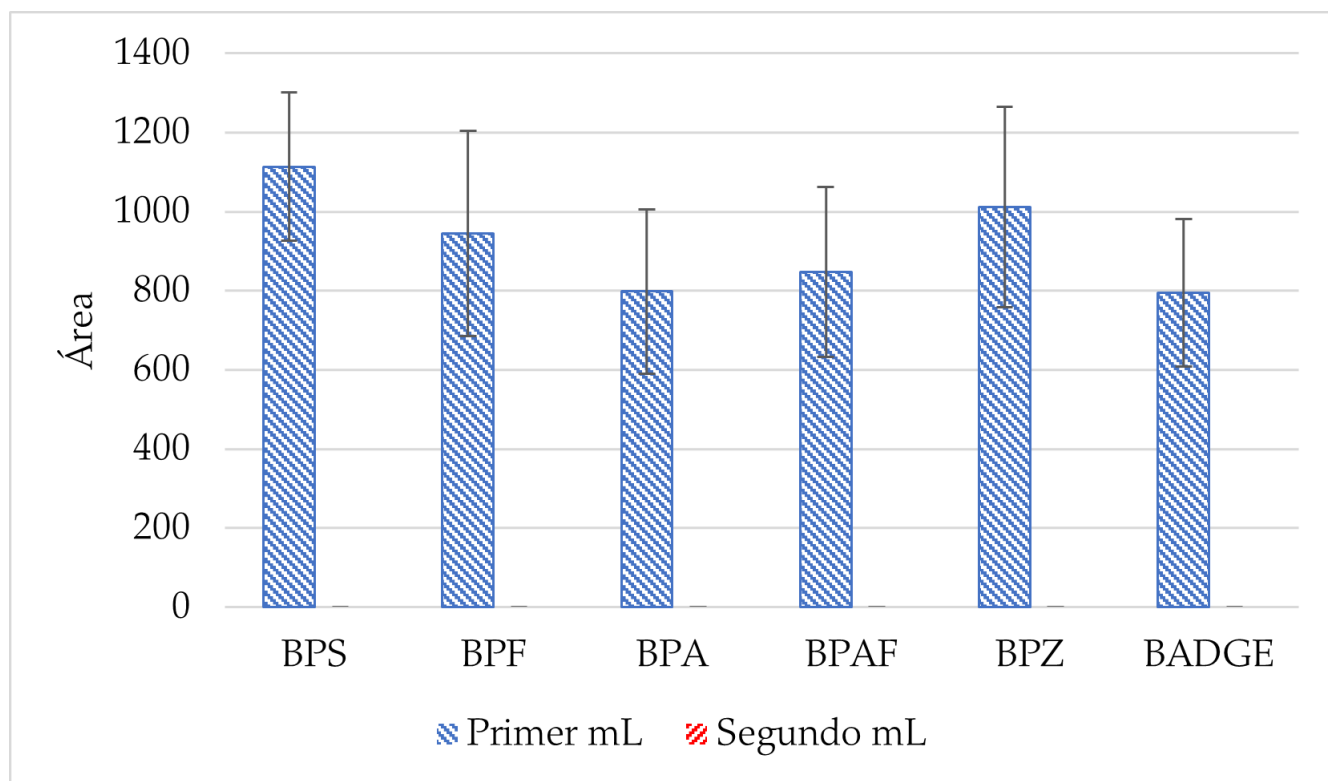


Figura 6.4: Área promedio para el primer y segundo mililitro recuperado tras la elución.

Los volúmenes sucesivos recuperados en cada extracción fueron analizados. En ninguna de las tres réplicas del segundo mililitro recuperado se detectaron los bisfenoles, mientras que las áreas resultantes de los picos en el primer mililitro son reproducibles en todos los casos.

Esto indica que todos los bisfenoles son desorbidos durante el paso por la columna del primer mililitro.

Por esta razón, se determinó que el volumen de elución óptimo para la recuperación de los analitos es de 1 mL de MeOH, ya que permite reducir el uso de disolventes al mismo tiempo que permite tener a los analitos más concentrados puesto, agregar el segundo mililitro reduciría en un factor de 2 la concentración de los analitos en los extractos, lo que, a su vez, disminuiría las señales producidas y con ello la sensibilidad del método.

6.3.3 Polaridad de la matriz.

El último factor por evaluar en la optimización de la extracción en fase sólida es la polaridad de la matriz. Para conseguir esto, como ya se mencionó, se añadió un volumen de MeOH a la muestra con el fin de reducir la polaridad de la matriz, esto debido al carácter hidrofóbico de la fase C18.

Tras agregar los 3 mL de MeOH a 27 mL de la muestra se obtiene una muestra con una composición H₂O:MeOH 9:1, esta muestra se sometió a EFS y se inyectó en el sistema cromatográfico. Se puede observar una mejora en la forma de las señales, los picos se afinan y ganan altura, en comparación con las señales obtenidas de las muestras compuestas únicamente de agua. También se aprecia un aumento en el recobro de los analitos entre 19.20% y 44.07% y una mejora en el porcentaje de desviación estándar relativa como se muestra en la Tabla 6.6.

Tabla 6.6: Evaluación de la polaridad de la matriz.

Bisfenol	30 mL H ₂ O		30 mL H ₂ O:MeOH (9:1)	
	recobro (%)	%RSD	recobro (%)	%RSD
BPS	53.81	28.28	88.05	2.34
BPF	59.56	27.52	103.62	3.32
BPA	59.58	25.40	95.84	2.89
BPAF	60.58	26.38	91.79	1.16
BPZ	63.94	24.60	83.14	3.15
BADGE	65.40	23.55	86.67	2.44

Esto se asocia a una mejora en la afinidad de la fase C18 con la matriz a la vez que se aumenta la solubilidad de los analitos.

Por ello, se decidió que la condición óptima para esta parte de la extracción es agregar MeOH a la muestra en proporción 1:9, es decir, para cada muestra de 30 mL fue necesario agregar 3 mL de MeOH.

En la Tabla 6.7 se muestra un resumen de las condiciones óptimas para el método de análisis. De igual forma, se muestra un diagrama de toda la metodología en la Figura 6.5.

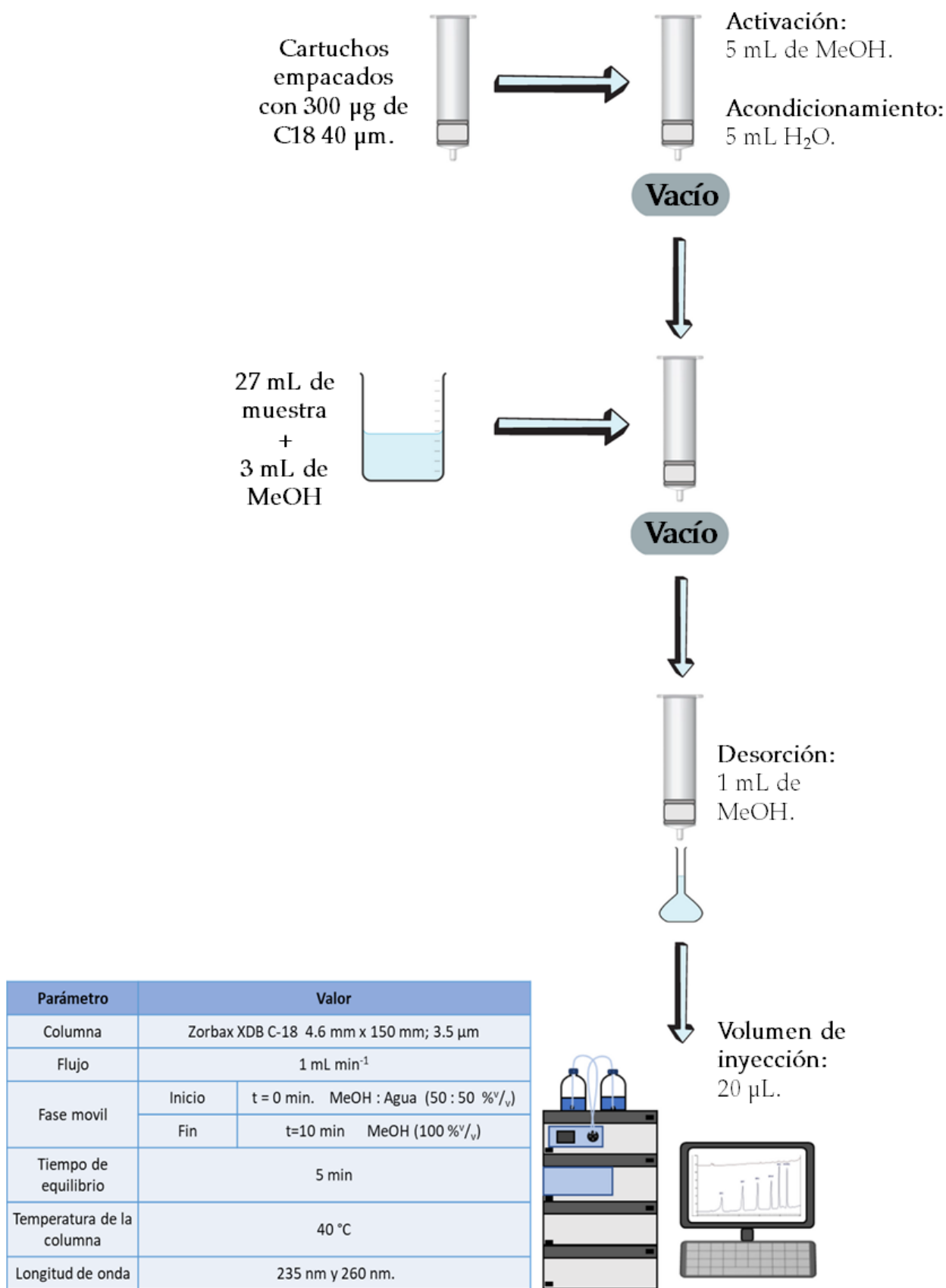


Figura 6.5: Metodología optimizada para la extracción y análisis de bisfenoles.

Tabla 6.7: Condiciones óptimas del método EFS-CLAR-DAD.

EFS	Fase sólida	C18 40 μm
	Cantidad de fase sólida	300 mg
	Activación	5 mL MeOH
	Acondicionamiento	5 mL H ₂ O
	Secado al vacío	10 minutos
	Desorción	1 mL de MeOH
Análisis cromatográfico	Volumen de inyección	20 μL
	Columna	Zorbax Eclipse XDB C18 4.6 mm x 150 mm; 3.5 μm .
	Flujo	1 mL min ⁻¹
	Fase móvil	t = 0 min. MeOH:H ₂ O (50:50% ^{v/v})
		t = 10 min. MeOH (100% ^{v/v})
	Tiempo de equilibrio	5 minutos
	Temperatura de la columna	40 °C
Longitud de onda	235 y 260 nm	

Sección 6.4.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE EFS-CLAR-DAD.

6.4.1 Linealidad.

La linealidad del método optimizado fue evaluada por medio de curvas de calibración. En la Figura 6.6 se muestra la curva para BPA y BPZ, las gráficas resultantes para los demás bisfenoles pueden encontrarse en el apéndice B en las Figuras B.3 y B.4

El ajuste lineal por medio del método de mínimos cuadrados (mediante Microsoft Excel) fue realizado para cada uno de los bisfenoles y se determinó la ecuación de mejor ajuste. Los valores de la ecuación, así como los intervalos de confianza al 95% ($\alpha = 0.05$) se muestran en la Tabla 6.8 para los seis bisfenoles estudiados.

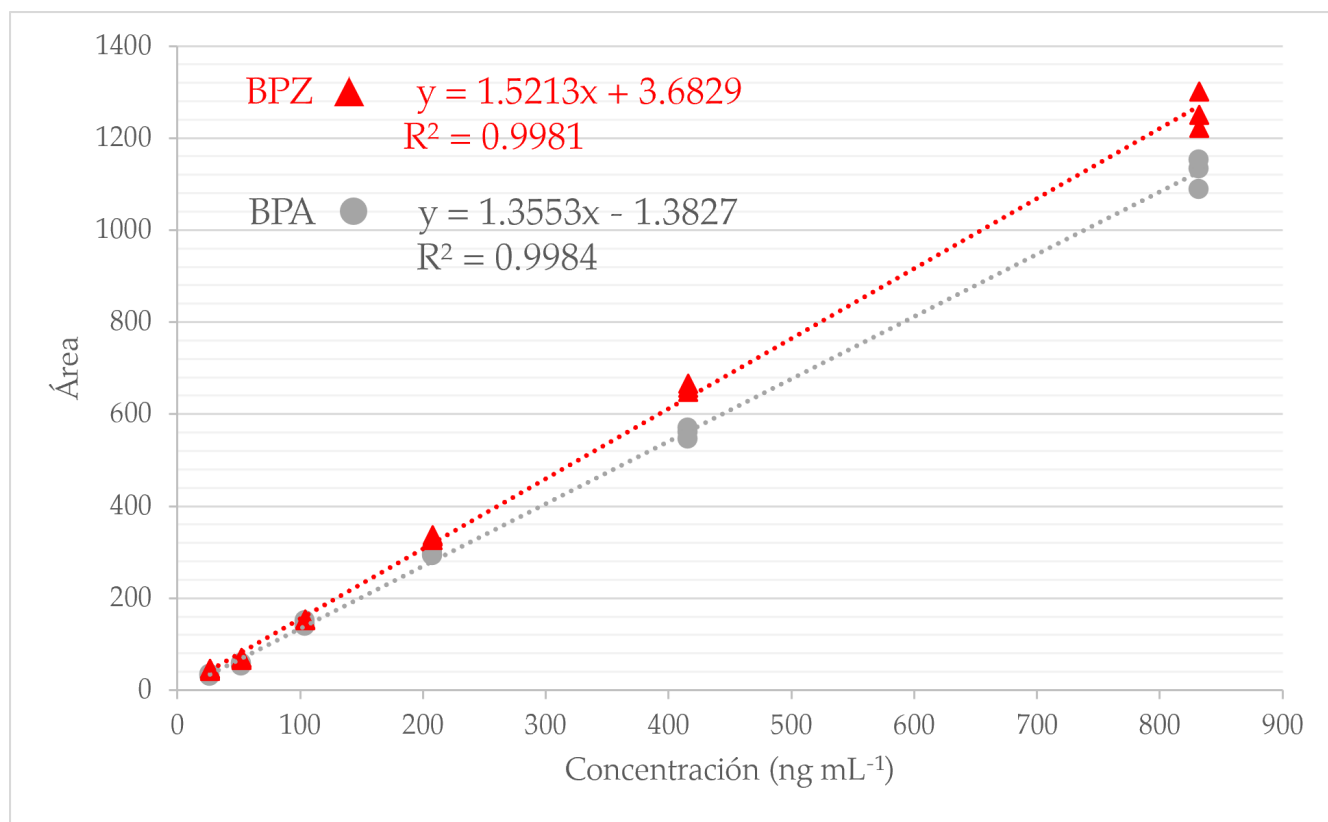


Figura 6.6: Curva de calibración del método EFS-CLAR-DAD (BPZ y BPA).
Gráfica $\text{Área} = f(\text{Concentración})$ realizada para la evaluación del método EFS-CLAR-DAD para BPZ y BPA.

Tabla 6.8: Linealidad del método EFS-CLAR-DAD.

Bisfenol	Pendiente (mAU mL ng ⁻¹)	Ordenada al origen (mAU)	r ²
BPS	2.8800 ± 0.0693	-21.0694 ± 27.1696	0.9979
BPF	1.8313 ± 0.0406	-0.5678 ± 15.9309	0.9983
BPA	1.3553 ± 0.0285	-1.3827 ± 11.1917	0.9984
BPAF	1.1807 ± 0.0207	-5.1842 ± 8.1168	0.9988
BPZ	1.5213 ± 0.0354	3.6829 ± 13.8869	0.9981
BADGE	1.0895 ± 0.0322	5.4031 ± 12.6121	0.9969

En todos los casos el valor del coeficiente de determinación es superior a 0.99, indicando un excelente ajuste a la ecuación de la línea recta.

De igual manera se puede observar que en todos los casos, el intervalo de confianza de la ordenada al origen incluye al cero, tal como se espera en este tipo de curvas de calibración.

6.4.2 Exactitud.

El factor de recobro puede ser calculado a partir de la relación entre las áreas del extracto y el sistema control. Una vez que se ha obtenido este valor basta con realizar el producto entre el factor de recobro y la concentración teórica agregada, de esta forma se obtiene la concentración recuperada en cada extracción. Véase apéndice D.2.

Al construir la gráfica **Concentración recuperada = f (Concentración agregada)** se puede calcular el recobro global del método mediante el valor de la pendiente obtenida por regresión lineal. Si se desea obtener el recobro en forma de porcentaje basta con multiplicar por 100 el valor de la pendiente. Las gráficas de recobro para BPA y BPZ pueden observarse en la Figura 6.7. Las gráficas para los bisfenoles restantes se encuentran en el anexo B en las Figuras B.5 - B.6.

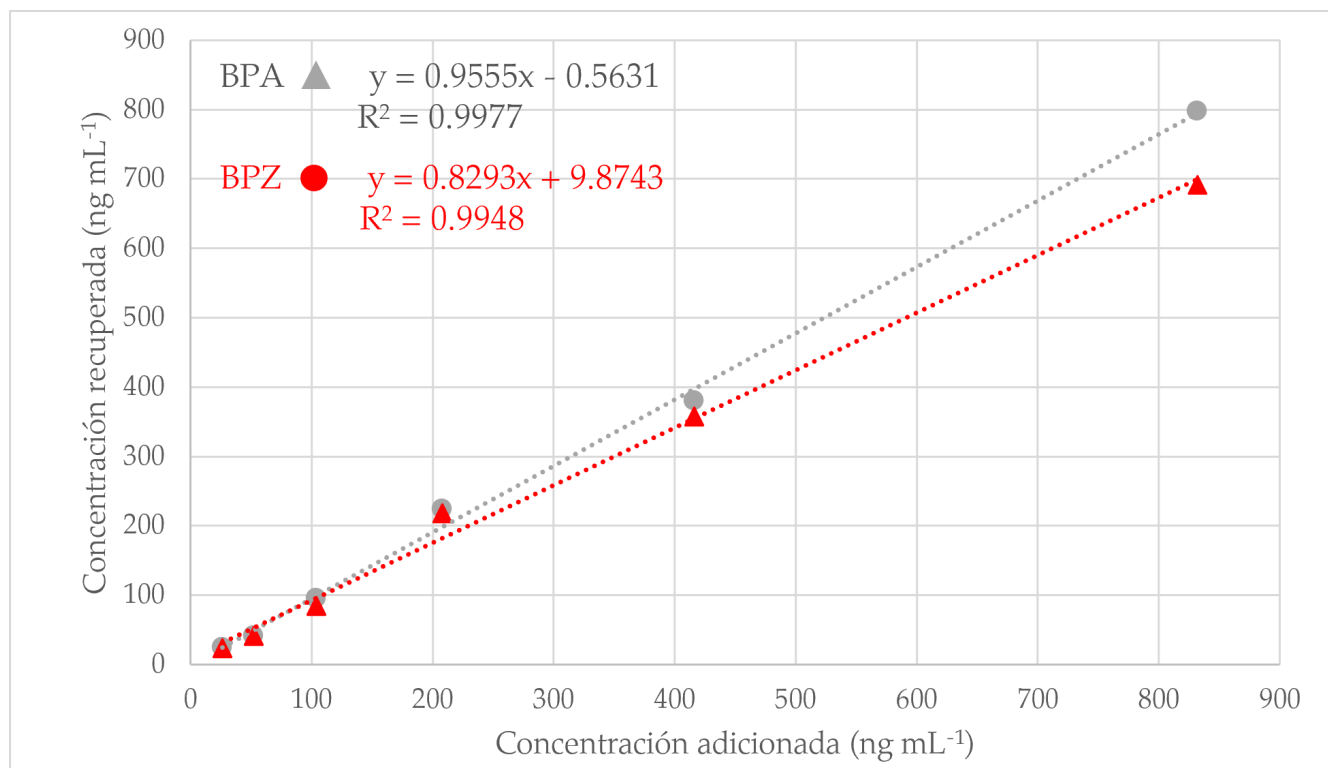


Figura 6.7: Curva de recobro global del método EFS-CLAR-DAD (BPZ y BPA). Gráfica **Concentración recuperada = f (Concentración agregada)** realizada para la evaluación del método EFS-CLAR-DAD para BPZ y BPA.

Los recobros globales y el intervalo de confianza al 95% ($\alpha = 0.05$) para cada bisfenol se pueden encontrar en la Tabla 6.9.

Tabla 6.9: Recobros globales del método EFS-CLAR-DAD.

Bisfenol	Recobro(%)	r^2
BPS	87.74 ± 7.19	0.9965
BPF	102.91 ± 8.52	0.9965
BPA	95.55 ± 6.42	0.9977
BPAF	92.43 ± 1.68	0.9998
BPZ	82.93 ± 8.29	0.9948
BADGE	84.94 ± 7.46	0.9960

En todos los casos el valor del coeficiente de determinación es superior a 0.99, lo que indica que el recobro se mantiene en todo el rango de concentraciones estudiado.

6.4.3 Repetibilidad.

La repetibilidad inter-día del método fue evaluada mediante el uso de un punto intermedio de la curva de calibración. En este caso, se seleccionó la concentración de 104 ng mL^{-1} .

Se obtuvo un $\%RSD < 11.18\%$. Nuevamente este valor de desviación estándar relativa pueda parecer alto, pero dado el orden de magnitud de las concentraciones de trabajo es un valor adecuado [79]. Empleando la ecuación de Horwitz (Ec. 3.12), se obtiene que el valor de $\%RSD$ predicho es de 22.49% a la concentración de 104 ng mL^{-1} .

Así, las proporciones de Horwitz para cada uno de los bisfenoles de estudio se muestran en la Tabla 6.10.

Tabla 6.10: Valores obtenidos de $\%RSD$ y proporción de Horwitz.

Bisfenol	$\%RSD$	HorRat
BPS	5.74	0.3
BPF	6.67	0.3
BPA	9.06	0.4
BPAF	11.18	0.5
BPZ	6.18	0.3
BADGE	10.09	0.4

En este caso para los seis bisfenoles se obtiene un valor del HorRat que se encuentra dentro del rango aceptable para validaciones intra-laboratorio (0.3 - 1.3). El incremento en el valor para BADGE en la validación del método puede atribuirse a que se emplean concentraciones inferiores a las empleadas durante la validación del sistema, es esperable que el coeficiente de variación incremente y por tanto, el valor para la proporción de Horwitz también lo haga.

6.4.4 Límites de detección y cuantificación.

Los límites de detección y cuantificación para el método fueron calculados de la misma manera que se mostró para la evaluación del sistema.

Los límites hallados para los seis bisfenoles se muestran en la Tabla 6.11.

Tabla 6.11: Límites de detección y cuantificación del método EFS-CLAR-DAD.

Bisfenol	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)
BPS	2	7
BPF	2	8
BPA	3	9
BPAF	3	10
BPZ	2	7
BADGE	3	10

Tal como se puede observar, con el método optimizado se consigue detectar a los bisfenoles en el orden de ng mL⁻¹ o lo que es lo mismo, partes por billón (ppb) y se puede lograr su cuantificación en el mismo orden para todos los bisfenoles exceptuando al BPAF y BADGE, donde su límite de cuantificación asciende a las decenas de partes por billón.

Tomando en cuenta los niveles ambientales y en otro tipo de muestras acuosas reportados en otros estudios [43,46,82–84] para algunos bisfenoles podemos argumentar que el método optimizado se encuentra en el rango adecuado para la detección y cuantificación en algunas de estas muestras.

Sección 6.5.

ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE AGUA.

El método desarrollado fue probado en una variedad de muestras cuya origen se documenta en la sección 5.4.

En las Figuras 6.8 - 6.10 se muestran las muestras reales analizadas.



Figura 6.8: Recipientes de plástico de donde se tomó la muestra.
De izquierda a derecha, muestra B1, B2, B3, B4 y R1.



Figura 6.9: Muestras de agua contenida en garrafón. De izquierda a derecha, muestra G3 (Supermercado), G1 (Purificadora) y G3 (Supermercado).



Figura 6.10: Muestras de agua superficial de criadero de peces. Arriba: Lugar de obtención de la muestra 1. Abajo (Izquierda a derecha): Lugar de obtención y muestra 4, 5, 6 y 8.

Las muestras fueron analizadas por triplicado aplicando el método optimizado (Figura 6.5). En ninguna de las muestras analizadas se detectó la presencia de bisfenoles a los niveles en los que el método puede analizar. Un ejemplo de los cromatogramas resultantes para cada tipo de muestra puede hallarse en las Figuras 6.11 - 6.13.

Como se puede observar en la Figura 6.13, en la línea roja correspondiente a una muestra real de agua de criadero (Muestra 6) existe una señal de tamaño considerable. Aunque se encuentra dentro del intervalo de tiempo en que puede encontrarse el BPA ($t_r \pm 5\%$) se ha descartado que se trate del bisfenol en cuestión debido a una comparación entre el espectro de absorción del BPA y el compuesto detectado en la muestra. Como se puede observar en la Figura C.7 del apéndice C, los espectros de absorción del bisfenol A y del compuesto no son similares.

Se inyectó una solución estándar de DEET (N,N-Dietil-*m*-toluamida) coincidiendo tanto en el tiempo de retención como en el espectro de absorción como se muestra en la Figura C.7, por lo que una opción razonable es que se trate de este compuesto. La razón principal por la que se sospechó de este compuesto es por qué se conocía previamente el espectro de absorción de este compuesto además que es factible la presencia de este compuesto dada la naturaleza de la muestra, pues el DEET es uno de los compuestos principales en los repelentes de insectos.

Debido a que en las muestras analizadas en este trabajo no se detectó la presencia de bisfenoles se sugiere continuar con el estudio de más muestras así como incluir otro tipo de muestras. Por ejemplo, se sugiere el análisis de muestras de agua o bebidas que por su preparación o distribución se encuentran contenidas en recipientes plásticos, muestras de afluentes o efluentes de ríos, aguas residuales, etc.

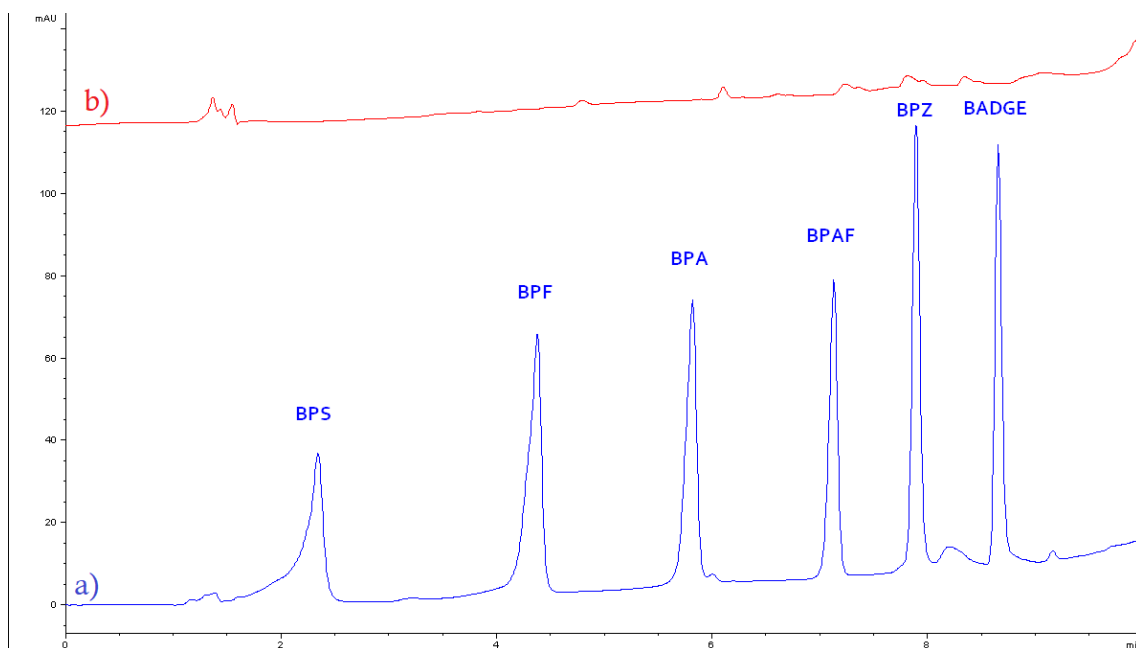


Figura 6.11: Cromatograma de un estándar y una muestra de recipiente.
a) Cromatograma de un estándar de la mezcla de bisfenoles a $12.48 \mu\text{g mL}^{-1}$.
b) Cromatograma de una muestra de agua contenida en recipiente de plástico.

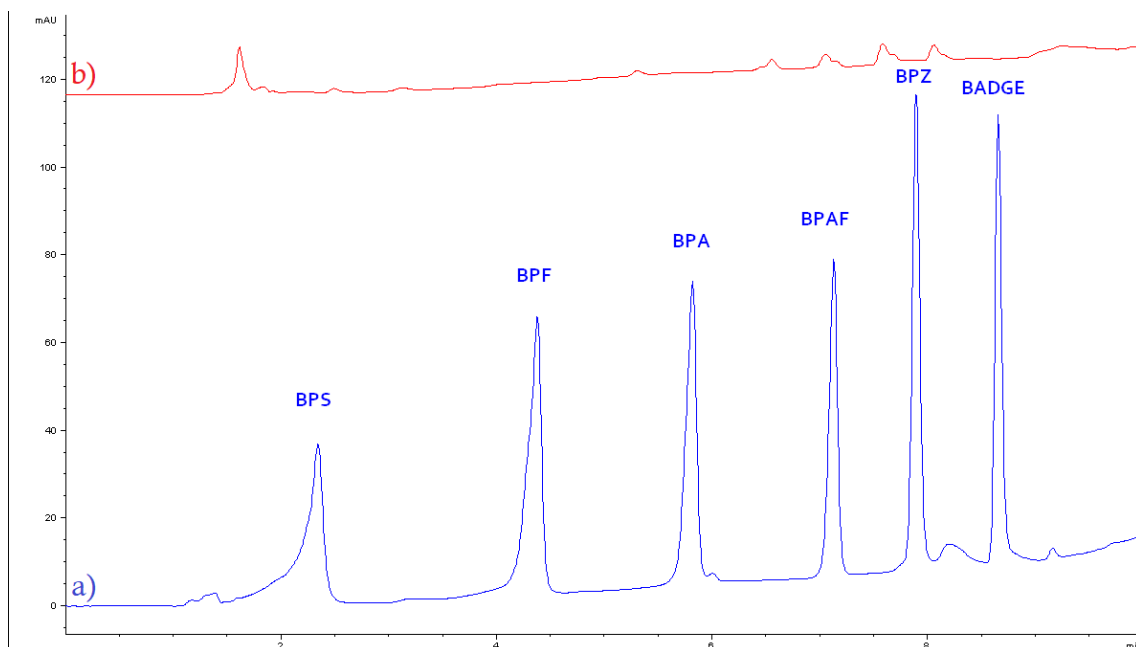


Figura 6.12: Cromatograma de un estándar y una muestra de agua de garrafón.
a) Cromatograma de un estándar de la mezcla de bisfenoles a $12.48 \mu\text{g mL}^{-1}$.
b) Cromatograma de una muestra de garrafón.

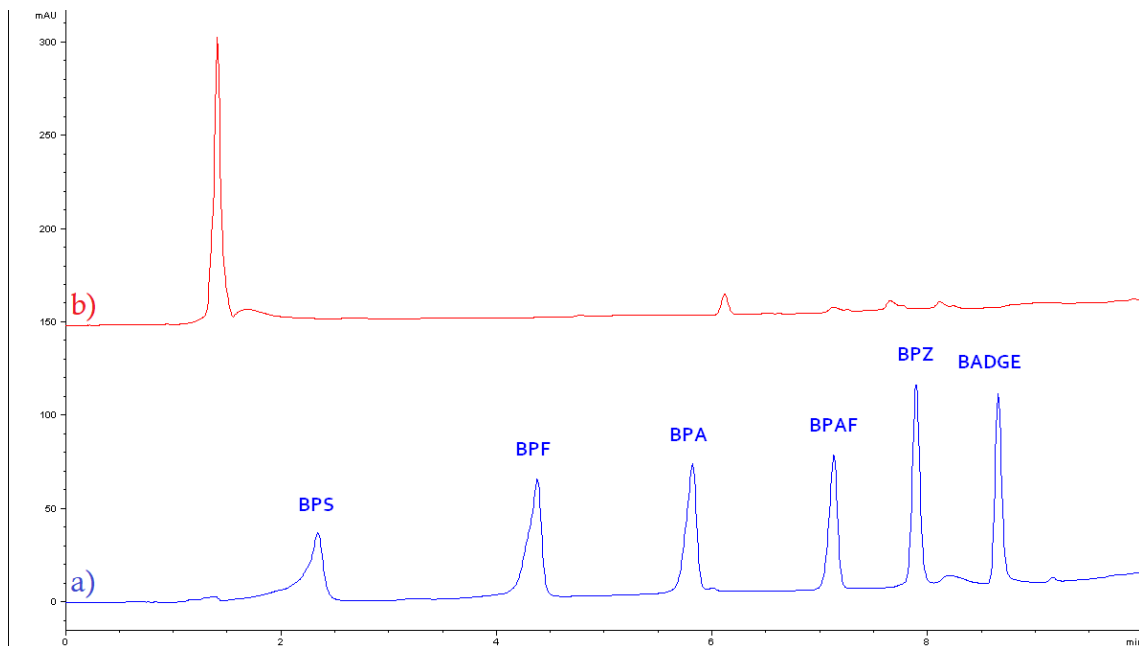


Figura 6.13: Cromatograma de un estándar y una muestra de agua de criadero.
a) Cromatograma de un estándar de la mezcla de bisfenoles a $12.48 \mu\text{g mL}^{-1}$.
b) Cromatograma de una muestra de agua de criadero.

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método analítico consistente en extracción en fase sólida seguido de análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución para la determinación de seis bisfenoles en muestras acuosas.

Las condiciones empleadas en la separación y análisis cromatográfico son adecuadas y permite tener una buena resolución entre las señales de los diferentes analitos con valores de R_s en el rango de 3.07 - 7.74.

La validación del método se realizó con base en diferentes parámetros encontrándose lo siguiente:

- La EFS presenta buenos recobros, entre el 82.93 - 102.91% en el intervalo de concentraciones de trabajo bajo las condiciones establecidas.
- El método presenta una buena linealidad en el rango de concentraciones de trabajo tomando como criterio el coeficiente de determinación. $r^2 > 0.99$ para todos los bisfenoles.
- Se encontró una buena repetibilidad ($\%RSD < 11.18$) considerando el orden de magnitud en que se encontraban los analitos, se encontró un HorRat de 0.3 - 0.5.
- Se determinaron los límites de detección entre 2 - 3 ng mL^{-1} y los límites de cuantificación entre 7 - 10 ng mL^{-1} según el bisfenol.

El método demostró ser válido y aplicable a muestras acuosas en búsqueda de bisfenoles.

El método se probó en cinco muestras de agua contenida en recipientes plásticos con un periodo de exposición de 24 h, tres muestras de agua de garrafón y cinco muestras de agua superficial de criadero de peces. En ninguna de las muestras se detectó la presencia de bisfenoles.

PERSPECTIVAS

Las perspectivas a futuro del presente trabajo son estudiar nuevos factores que permitan mejorar la sensibilidad del método, como utilizar otras técnicas de preparación de muestras (DLLE-DESs) y otras formas de detección (detector de fluorescencia, sistema acoplado de espectrometría de masas). Con esto se espera reducir los límites de detección y cuantificación a niveles por debajo de ng mL^{-1} .

Se plantea el análisis de otro tipo de muestras en las que se ha detectado la presencia de bisfenoles para confirmar la presencia o ausencia de estos contaminantes. Por ejemplo, bebidas cuya preparación o propiedades puedan facilitar la migración de estos compuestos, aguas residuales, aguas subterráneas, afluentes y efluentes de ríos. De igual forma se plantea el uso de tratamientos térmicos para analizar si los bisfenoles son capaces de migrar del contenedor al líquido.

REFERENCIAS

- [1] Vogel, S. A. (2009). The Politics of Plastics: The Making and Unmaking of Bisphenol A “Safety”. *American Journal of Public Health*, 99(Suppl 3):S559–566.
- [2] Czarny-Krzywińska, K., Krawczyk, B., y Szczukocki, D. (2023). Bisphenol A and its substitutes in the aquatic environment: Occurrence and toxicity assessment. *Chemosphere*, 315:137763.
- [3] Patisaul, H. B. (2020). Achieving CLARITY on bisphenol A, brain and behaviour. *Journal of Neuroendocrinology*, 32(1):e12730.
- [4] Eladak, S., Grisin, T., Moison, D., Guerquin, M. J., N’Tumba-Byn, T., Pozzi-Gaudin, S., Benachi, A., Livera, G., Rouiller-Fabre, V., y Habert, R. (2015). A new chapter in the bisphenol a story: Bisphenol S and bisphenol F are not safe alternatives to this compound. *Fertility and Sterility*, 103(1):11–21.
- [5] Dodds, E. C., Goldberg, L., Lawson, W., y Robinson, B. (1938). OEstrogenic Activity of Certain Synthetic Compounds. *Nature*, 141(3562):247–248.
- [6] Huang, Y. Q., Wong, C. K., Zheng, J. S., Bouwman, H., Barra, R., Wahlström, B., Neretin, L., y Wong, M. H. (2012). Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environment International*, 42(1):91–99.
- [7] Flint, S., Markle, T., Thompson, S., y Wallace, E. (2012). Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. *Journal of Environmental Management*, 104:19–34.
- [8] Vilarinho, F., Sendón, R., van der Kellen, A., Vaz, M. F., y Silva, A. S. (2019). Bisphenol A in food as a result of its migration from food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 91:33–65.
- [9] Mordor Intelligence (2023). Bisphenol-A (BPA) Market Size & Share Analysis. Consultado por última vez el 6 de mayo de 2023 de <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/bisphenol-a-bpa-market>.
- [10] ChemAnalyst (2023). Bisphenol A (BPA) Market Size, Growth & Forecast. Consultado por última vez el 6 de mayo de 2023 de <https://www.chemanalyst.com/industry-report/bisphenol-a-market-57>.
- [11] Fiege, H., Voges, H.-W., Hamamoto, T., Umemura, S., Iwata, T., Miki, H., Fujita, Y., Buysch, H.-J., Garbe, D., y Paulus, W. (2000). Phenol Derivatives. *Ullmann’s Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Wiley-VCH.
- [12] Noszczyńska, M. y Piotrowska-Seget, Z. (2018). Bisphenols: Application, occurrence, safety, and biodegradation mediated by bacterial communities in wastewater treatment plants and rivers. *Chemosphere*, 201:214–223.
- [13] Corrales, J., Kristofco, L. A., Steele, W. B., Yates, B. S., Breed, C. S., Williams, E. S., y Brooks, B. W. (2015). Global assessment of bisphenol a in the environment: Review and analysis of its occurrence and bioaccumulation. *Dose-Response*, 13(3):1559325815598308.
- [14] Hu, Y., Zhu, Q., Yan, X., Liao, C., y Jiang, G. (2019). Occurrence, fate and risk assessment of BPA and its substituents in wastewater treatment plant: A review. *Environmental Research*, 178:108732.
- [15] Vasiljevic, T. y Harner, T. (2021). Bisphenol A and its analogues in outdoor and indoor air: Properties, sources and global levels. *Science of the Total Environment*, 789:148013.
- [16] Mandaric, L., Celic, M., Marcé, R., y Petrovic, M. (2015). Introduction on emerging contaminants in rivers and their environmental risk. En Petrovic, M., Sabater, S., Elosegi, A., y Barceló, D., editores, *Emerging Contaminants in River Ecosystems*. pp. 3–25. Springer Verlag.
- [17] Gil, M. J., Soto, A. M., Usma, J. I., y Gutiérrez, O. D. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia*, 7(2):52–73.

-
- [18] Stuart, M., Lapworth, D., Crane, E., y Hart, A. (2012). Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of the Total Environment*, 416:1–21.
- [19] Barceló, L. D. y López de Alda, M. J. (2007). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Panel Científico-Técnico de Seguimiento a la Política de Aguas. Zaragoza: Fundación Nueva Cultura del Agua.
- [20] Arguello-Pérez, M. Á., Mendoza-Pérez, J. A., Tintos-Gómez, A., Ramírez-Ayala, E., Godínez-Domínguez, E., y de Asís Silva-Bátiz, F. (2019). Ecotoxicological analysis of emerging contaminants from wastewater discharges in the Coastal Zone of Cihuatlán (Jalisco, México). *Water (Switzerland)*, 11(7):1386.
- [21] Galvin, R. M. (2017). Contaminación Emergente: Sustancias prioritarias y preferentes, productos farmacéuticos, drogas de abuso, disruptores endocrinos, microplásticos y patógenos emergentes. *TECNOAQUA*, 24:66–77.
- [22] Focazio, M. J., Kolpin, D. W., Barnes, K. K., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Zaugg, S. D., Barber, L. B., y Thurman, M. E. (2008). A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water sources. *Science of the Total Environment*, 402(2-3):201–216.
- [23] Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., y Guwy, A. J. (2008). The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research*, 42(13):3498–3518.
- [24] Crain, D. A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G. A., y Guillette, L. J. (2007). An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology*, 24(2):225–239.
- [25] Xing, J., Zhang, S., Zhang, M., y Hou, J. (2022). A critical review of presence, removal and potential impacts of endocrine disruptors bisphenol A. *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology*, 254:109275.
- [26] Cousins, I. T., Staples, C. A., Klečka, G. M., y Mackay, D. (2002). A multimedia assessment of the environmental fate of bisphenol A. *Human and Ecological Risk Assessment*, 8(5):1107–1135.
- [27] Idowu, G. A., David, T. L., e Idowu, A. M. (2022). Polycarbonate plastic monomer (bisphenol-A) as emerging contaminant in Nigeria: Levels in selected rivers, sediments, well waters and dumpsites. *Marine Pollution Bulletin*, 176:113444.
- [28] Yamamoto, T., Yasuhara, A., Shiraishi, H., y Nakasugi, O. (2001). Bisphenol A in hazardous waste landfill leachates. *Chemosphere*, 42(4):415–418.
- [29] U.S. Environmental Protection Agency (2010). Bisphenol A Action Plan. Consultado por última vez el 25 de junio de 2023 de <https://www.regulations.gov/document/EPA-HQ-OPPT-2010-0348-0002>.
- [30] Rochester, J. R. y Bolden, A. L. (2015). Bisphenol S and F: A systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol a substitutes. *Environmental Health Perspectives*, 123(7):643–650.
- [31] Usman, A. y Ahmad, M. (2016). From BPA to its analogues: Is it a safe journey? *Chemosphere*, 158:131–142.
- [32] Abraham, A. y Chakraborty, P. (2020). A review on sources and health impacts of bisphenol A. *Reviews on Environmental Health*, 35(2):201–210.
- [33] MacKay, H. y Abizaid, A. (2018). A plurality of molecular targets: The receptor ecosystem for bisphenol-A (BPA). *Hormones and Behavior*, 101:59–67.
- [34] Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., y Khan, M. J. (2019). Bisphenol A analogues bisphenol B, bisphenol F, and bisphenol S induce oxidative stress, disrupt daily sperm production, and damage DNA in rat spermatozoa: a comparative in vitro and in vivo study. *Toxicology and Industrial Health*, 35(4):294–303.
-

-
- [35] Alonso-Magdalena, P., Ropero, A. B., Soriano, S., Quesada, I., y Nadal, A. (2010). Bisphenol-A: a new diabetogenic factor? *Hormones (Athens, Greece)*, 9(2):118–126.
- [36] Naomi, R., Yazid, M. D., Bahari, H., Keong, Y. Y., Rajandram, R., Embong, H., Teoh, S. H., Halim, S., y Othman, F. (2022). Bisphenol A (BPA) Leading to Obesity and Cardiovascular Complications: A Compilation of Current In Vivo Study. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(6):2969.
- [37] Kim, K. Y., Lee, E., y Kim, Y. (2019). The association between bisphenol A exposure and obesity in children—a systematic review with meta-analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(14):2521.
- [38] Rochester, J. R. (2013). Bisphenol A and human health: A review of the literature. *Reproductive Toxicology*, 42:132–155.
- [39] Rezg, R., El-Fazaa, S., Gharbi, N., y Mornagui, B. (2014). Bisphenol A and human chronic diseases: Current evidences, possible mechanisms, and future perspectives. *Environment International*, 64:83–90.
- [40] Wang, H., hua Liu, Z., Tang, Z., Zhang, J., Yin, H., Dang, Z., xiao Wu, P., y Liu, Y. (2020). Bisphenol analogues in Chinese bottled water: Quantification and potential risk analysis. *Science of the Total Environment*, 713:136583.
- [41] Ji, K., Hong, S., Kho, Y., y Choi, K. (2013). Effects of bisphenol S exposure on endocrine functions and reproduction of zebrafish. *Environmental Science and Technology*, 47(15):8793–8800.
- [42] Mandel, N. D., Gamboa-Loira, B., Cebrián, M. E., Ángel Mérida-Ortega, y López-Carrillo, L. (2019). Challenges to regulate products containing bisphenol A: Implications for policy. *Salud Publica de Mexico*, 61(5):692–697.
- [43] Colin, A., Bach, C., Rosin, C., Munoz, J. F., y Dauchy, X. (2014). Is drinking water a major route of human exposure to alkylphenol and bisphenol contaminants in France? *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 66(1):86–99.
- [44] Wang, Q., Zhang, Y., Feng, Q., Hu, G., Gao, Z., Meng, Q., y Zhu, X. (2022). Occurrence, distribution, and risk assessment of bisphenol analogues in Luoma Lake and its inflow rivers in Jiangsu Province, China. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(1):1430–1445.
- [45] López-Velázquez, K., Guzmán-Mar, J. L., Saldarriaga-Noreña, H. A., Murillo-Tovar, M. A., Hinojosa-Reyes, L., y Villanueva-Rodríguez, M. (2021). Occurrence and seasonal distribution of five selected endocrine-disrupting compounds in wastewater treatment plants of the Metropolitan Area of Monterrey, Mexico: The role of water quality parameters. *Environmental Pollution*, 269:116223.
- [46] Villarreal-Morales, R., Hinojosa-Reyes, L., Hernández-Ramírez, A., Ruíz-Ruíz, E., de Lourdes Maya Treviño, M., y Guzmán-Mar, J. L. (2020). Automated SPE-HPLC-UV methodology for the on-line determination of plasticisers in wastewater samples. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 102(7):1683–1696.
- [47] Chen, X., Wei, L., Liu, Q., y Zhao, J. (2021). Solid-liquid-solid conversion microextraction combined with high-performance liquid chromatography for determination of bisphenols. *Microchemical Journal*, 169:106538.
- [48] Xu, L., Huang, Y., Zhao, B., Ren, L., y Long, T. (2021). Determination of 2, 4-Dichlorophenol, 2, 4-Dinitrophenol, and Bisphenol a in River Water by Magnetic Solid-Phase Extraction (MSPE) Using β -Cyclodextrin Modified Magnetic Ferrite Microspheres and High-Performance Liquid Chromatography–Diode Array Detection (HPLC-DAD). *Analytical Letters*, 55(3):367–377.
- [49] Caban, M. y Stepnowski, P. (2020). The quantification of bisphenols and their analogues in wastewaters and surface water by an improved solid-phase extraction gas chromatography/mass spectrometry method. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(23):28829–28839.
- [50] Liu, Y., Wang, D., Du, F., Zheng, W., Liu, Z., Xu, Z., Hu, X., y Liu, H. (2019). Dummy-template molecularly imprinted micro-solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography for bisphenol A determination in environmental water samples. *Microchemical Journal*, 145:337–344.
-

-
- [51] Zhao, Y., Bai, X. L., Song, T., Zhang, G. L., Yuan, Y. C., Liu, Y. M., y Liao, X. (2019). Determination of environmental estrogens and bisphenol A in water samples by ultra-high performance liquid chromatography coupled to Q-Exactive high resolution mass spectrometry after magnetic solid-phase extraction. *Microchemical Journal*, 151:104212.
- [52] Kaykhani, M., Yavari, E., Sargazi, G., y Ebrahimi, A. K. (2020). Highly Sensitive Determination of Bisphenol A in Bottled Water Samples by HPLC after Its Extraction by a Novel Th-MOF Pipette-Tip Micro-SPE. *Journal of Chromatographic Science*, 58(4):373–382.
- [53] Bodur, S., Erarpat, S., Bozyiğit, G. D., Chormey, D. S., Öz, E., Özdoğan, N., y Bakırdere, S. (2020). A sensitive determination method for trace bisphenol A in bottled water and wastewater samples: Binary solvent liquid phase microextraction-quadrupole isotope dilution-gas chromatography-mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 159:105532.
- [54] Akash, M. S. H. y Rehman, K. (2019). Capítulo 11. Introduction to Chromatographic Techniques. En *Essentials of pharmaceutical analysis*. Springer.
- [55] Žuvela, P., Skoczylas, M., Liu, J. J., Baczek, T., Kaliszan, R., Wong, M. W., y Buszewski, B. (2019). Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chemical Reviews*, 119(6):3674–3729.
- [56] Zotou, A. (2012). An overview of recent advances in HPLC instrumentation. *Central European Journal of Chemistry*, 10(3):554–569.
- [57] Bonnin, R. R., Reverter, F. C., Poblador, S. E., Tomás, F. J. G., de la Presa, B. G., y Martínez, R. M. L. (2018). Desarrollo de procedimientos de medida basados en la cromatografía líquida de alta resolución. *Revista del Laboratorio Clínico*, 11(3):137–146.
- [58] Moldoveanu, S. C. y David, V. (2013a). Capítulo 1. Basic information about hplc. En Moldoveanu, S. C. y David, V., editores, *Essentials in Modern HPLC Separations*. pp. 1–51. Elsevier.
- [59] Nagy, K. y Vékey, K. (2008). Capítulo 5. Separation methods. En Vékey, K., Telekes, A., y Vertes, A., editores, *Medical Applications of Mass Spectrometry*. pp. 61–92. Elsevier.
- [60] Moldoveanu, S. C. y David, V. (2013b). Capítulo 5. Retention mechanisms in different hplc types. En Moldoveanu, S. C. y David, V., editores, *Essentials in Modern HPLC Separations*. pp. 145–190. Elsevier.
- [61] Skoog, D. A., Holler, F., y Crouch, S. R. (2008). *Principios de análisis instrumental*. Cengage Learning, 6 edición.
- [62] Knauer (s.f.). HPLC Principles and parameters. Consultado por última vez el 8 de junio de 2023 de <https://www.knauer.net/en/Systems-Solutions/Analytical-HPLC-UHPLC/HPLC-Basics—principles-and-parameters>.
- [63] Dong, M. (2019). Ultraviolet Detectors: Perspectives, Principles, and Practices. *LCGC North America*, 37(10):750–759.
- [64] Barth, H. G. (2019). Chromatography Fundamentals, Part VIII: The Meaning and Significance of Chromatographic Resolution. *LCGC North America*, 37(11):824–828.
- [65] Ravisankara, P., Anusha, S., Supriya, K., y Ajith K, U. (2019). Fundamental Chromatographic Parameters. *Article in International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 55(2):46–50.
- [66] Buszewski, B. y Szultka, M. (2012). Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42(3):198–213.
- [67] Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancellieri, V., y Cerdà, V. (2016). Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 80:641–654.
- [68] Poole, C. F. (2003). New trends in solid-phase extraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 22(6):362–373.
-

-
- [69] Zhang, C., Xing, H., Yang, L., Fei, P., y Liu, H. (2022). Development trend and prospect of solid phase extraction technology. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 42(2):245–255.
- [70] Płotka-Wasyłka, J., Szczepańska, N., de la Guardia, M., y Namieśnik, J. (2016). Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 77:23–43.
- [71] Al-Karawi, D. (2016). The Investigation of The Electrical Control of Hemimicelles and Admicelles on Gold for Analyte Preconcentration. *Masters Theses & Specialist Projects*, (Paper 1732).
- [72] Ferrance, J. P. (2022). Solid phase extraction on reverse phase chromatographic media subjected to stresses expected for extraterrestrial implementation. *Analyst*, 147(15):3514–3524.
- [73] Aguilar, B. C. y Hernández, R. G. (1996). Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. *Revista Cubana de Farmacia*, 30(1).
- [74] Miller, J. N. y Miller, J. C. (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica*. Prentice Hall, 4 edición.
- [75] FAO (s.f.). Calidad de métodos analíticos. Consultado por última vez el 8 de junio de 2023 de <https://www.fao.org/3/ah833s/Ah833s15.htm>.
- [76] Lister, A. S. (2005). Capítulo 7. Validation of HPLC Methods in Pharmaceutical Analysis. En Ahuja, S. y Dong, M. W., editores, *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. pp. 191–217. Academic Press.
- [77] Indrayanto, G. (2018). Capítulo 5. Validation of Chromatographic Methods of Analysis: Application for Drugs That Derived From Herbs. En Brittain, H. G., editor, *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology Volumen 43*.
- [78] Horwitz, W., Kamps, L. R., y Boyer, K. W. (1980). Quality Assurance in the Analysis of Foods for Trace Constituents. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 63(6):1344–1354.
- [79] Rivera, C., Rodríguez, R., y Pimentel, S. C. (2011). Horwitz equation as quality benchmark in ISO / IEC 17025 testing laboratory. Consultado por última vez el 25 de junio de 2023 de <https://bii.mx/documentos/horwitzCf11.pdf>.
- [80] AOAC International (2016). Apéndice F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. En *Official Methods of Analysis*.
- [81] Ermer, J. y John, J. H. (2005). *Method Validation in Pharmaceutical Analysis: A Guide to Best Practice*. Wiley-VCH, 2 edición.
- [82] Sun, Q., Wang, Y., Li, Y., Ashfaq, M., Dai, L., Xie, X., y Yu, C.-P. (2017). Fate and mass balance of bisphenol analogues in wastewater treatment plants in Xiamen City, China. *Environmental Pollution*, 225:542–549.
- [83] Gorga, M., Petrovic, M., y Barceló, D. (2013). Multi-residue analytical method for the determination of endocrine disruptors and related compounds in river and waste water using dual column liquid chromatography switching system coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1295:57–66.
- [84] Petrie, B., Lopardo, L., Proctor, K., Youdan, J., Barden, R., y Kasprzyk-Hordern, B. (2019). Assessment of bisphenol-A in the urban water cycle. *Science of The Total Environment*, 650(Pt. 1):900–907.

APÉNDICE A

CROMATOGRAMAS

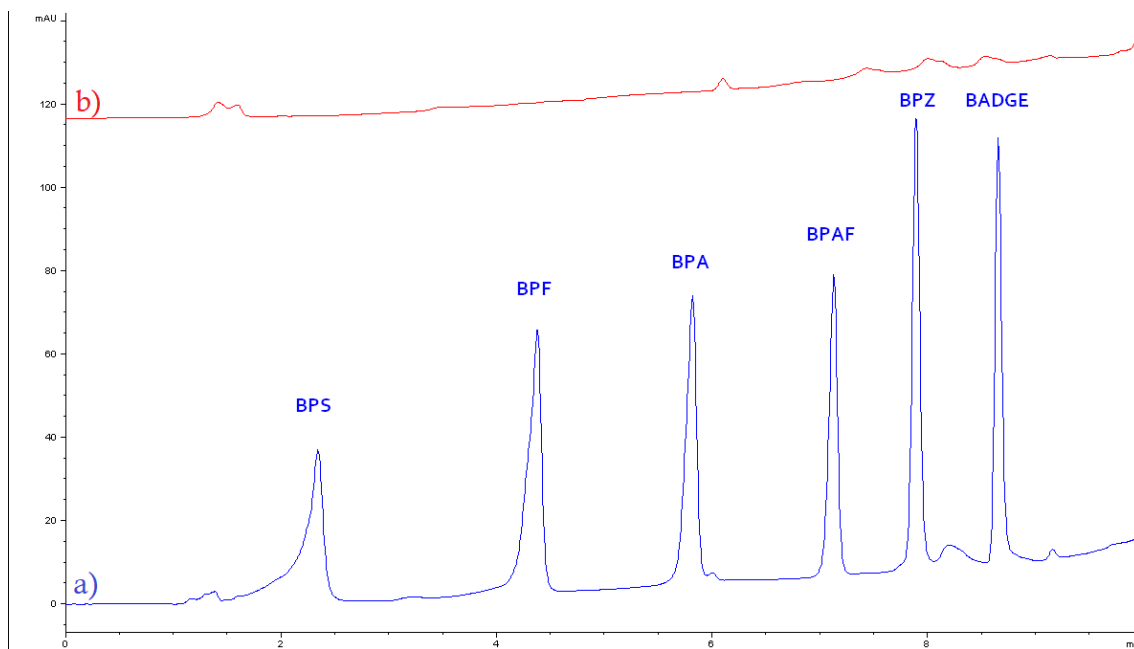


Figura A.1: Cromatograma de estándar y blanco de agua.
a) Cromatograma de un estándar de la mezcla de bisfenoles a $12.48 \mu\text{g mL}^{-1}$.
b) Cromatograma de un blanco de agua.

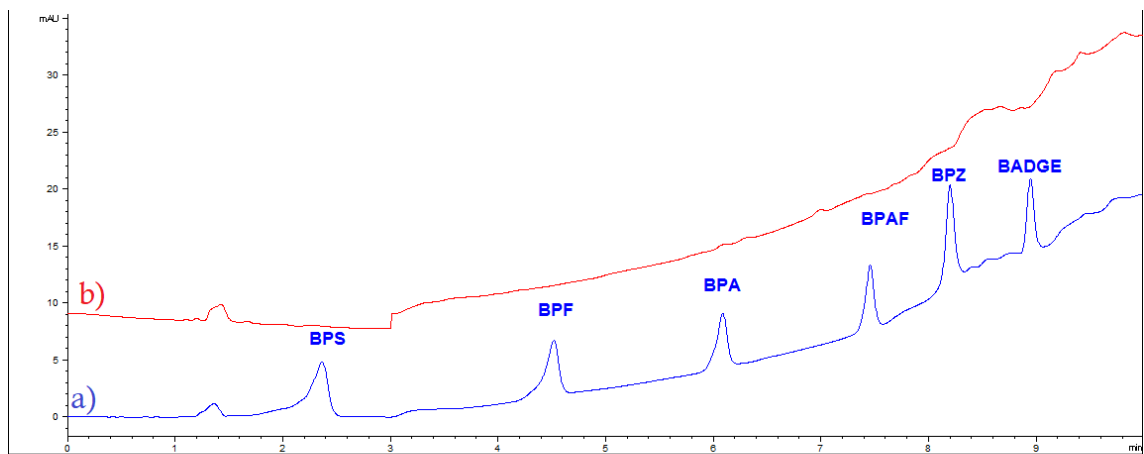


Figura A.2: Cromatograma de un estándar y un blanco resultante de EFS.
 a) Cromatograma de un estándar de la mezcla de bisfenoles a $0.792 \mu\text{g mL}^{-1}$.
 b) Cromatograma de un sistema blanco tras la EFS.

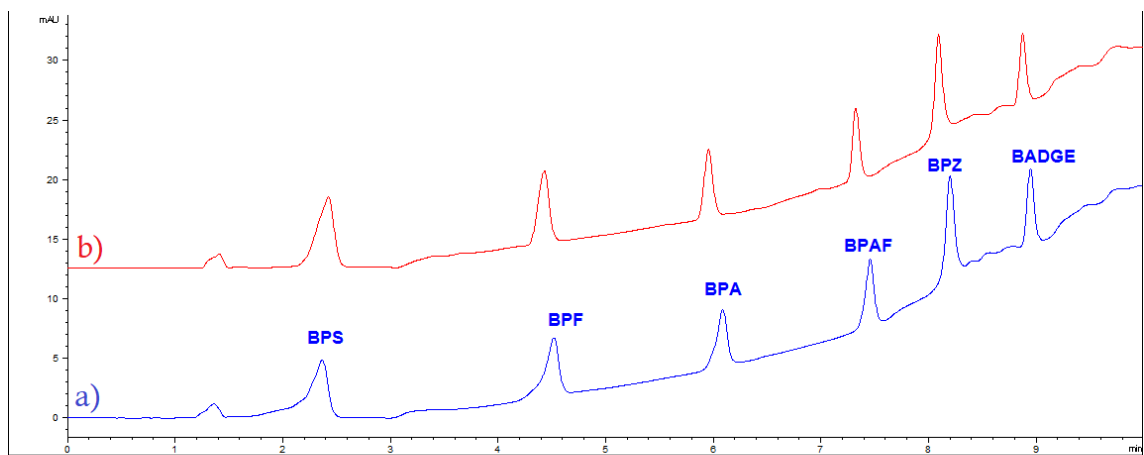


Figura A.3: Cromatograma de un estándar y un extracto de muestra fortificada.
 a) Cromatograma de un estándar de la mezcla de bisfenoles a $0.792 \mu\text{g mL}^{-1}$.
 b) Cromatograma de una muestra fortificada con bisfenoles a 26.4 ng mL^{-1} tras EFS.

APÉNDICE B
GRÁFICAS

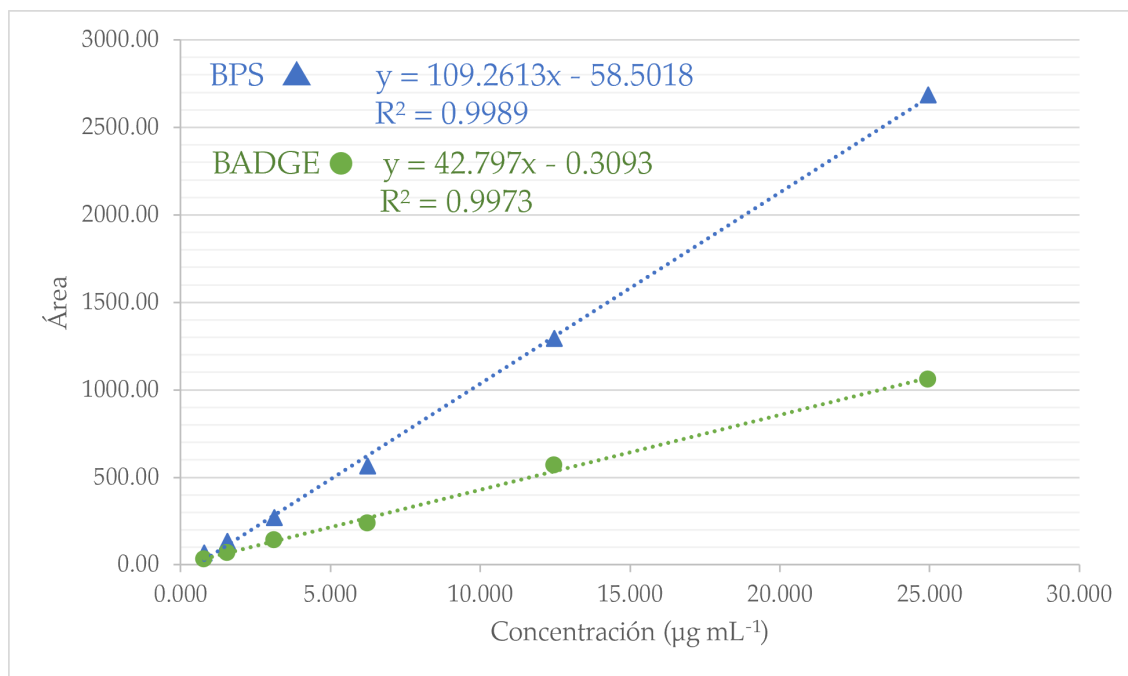


Figura B.1: Curva de calibración del sistema cromatográfico (BPS y BADGE).
Gráfica $\text{Área} = f(\text{Concentración})$ realizada para la evaluación de la linealidad del sistema cromatográfico para BPS y BADGE.

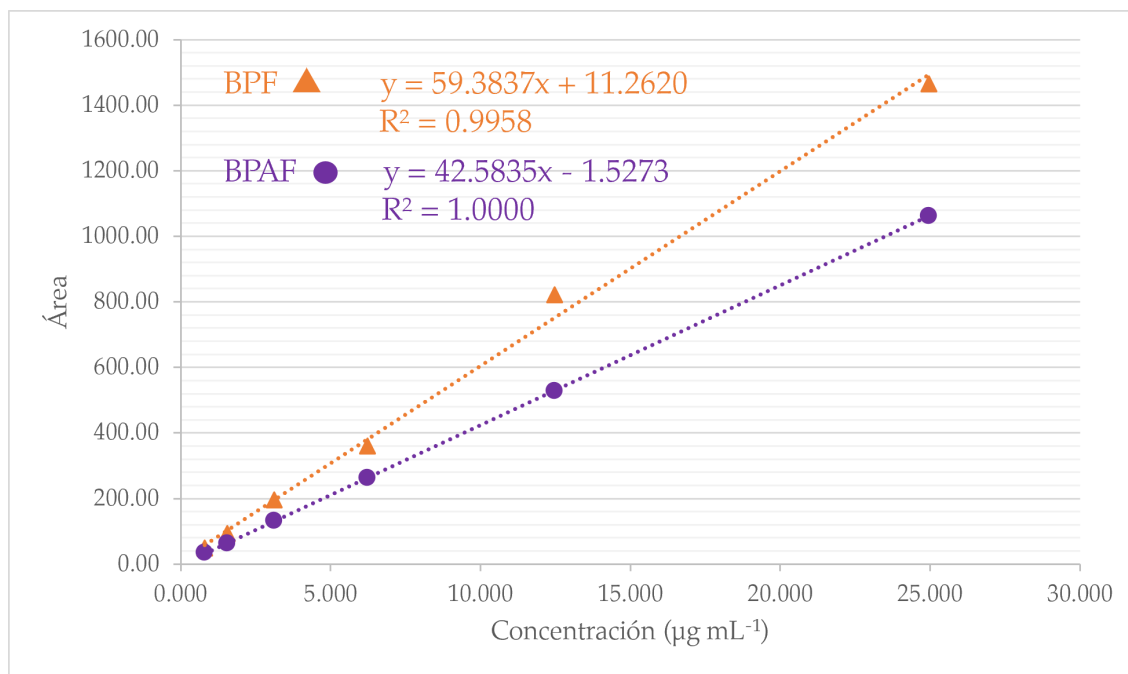


Figura B.2: Curva de calibración del sistema cromatográfico (BPF y BPAF). Gráfica $\text{Área} = f(\text{Concentración})$ realizada para la evaluación de la linealidad del sistema cromatográfico para BPF y BPAF.

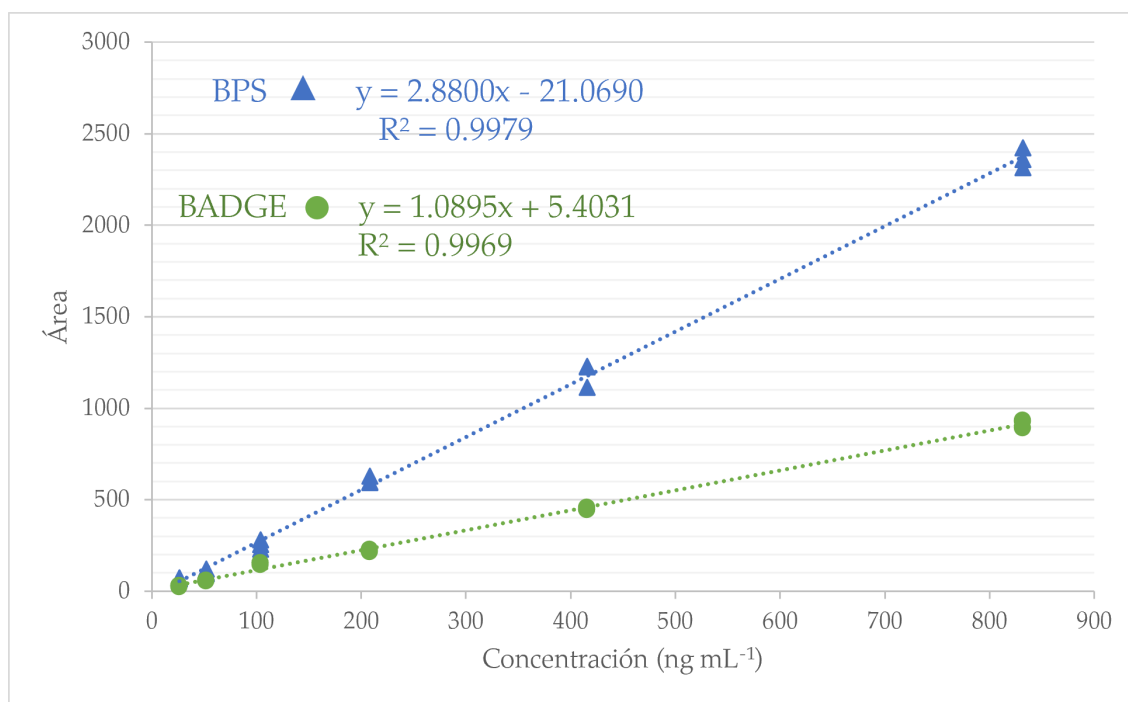


Figura B.3: Curva de calibración del método EFS-CLAR-DAD (BPS y BADGE). Gráfica $\text{Área} = f(\text{Concentración})$ realizada para la evaluación del método EFS-CLAR-DAD para BPS y BADGE.

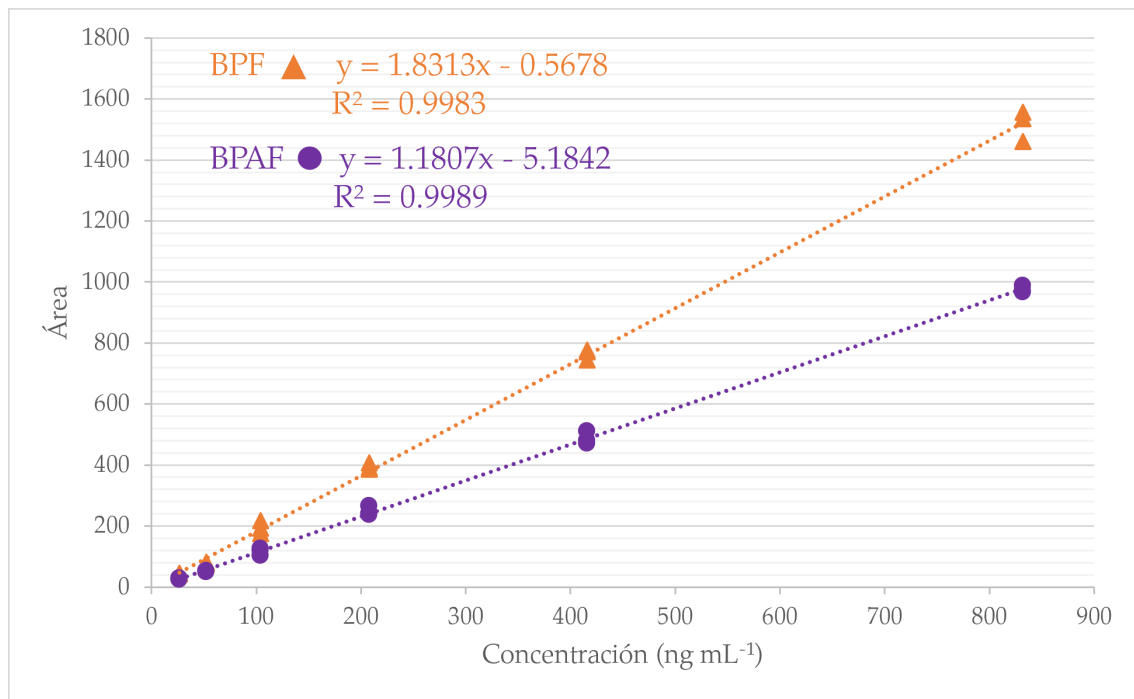


Figura B.4: Curva de calibración del método EFS-CLAR-DAD (BPS y BADGE). Gráfica **Área = f(Concentración)** realizada para la evaluación del método EFS-CLAR-DAD para BPS y BADGE.

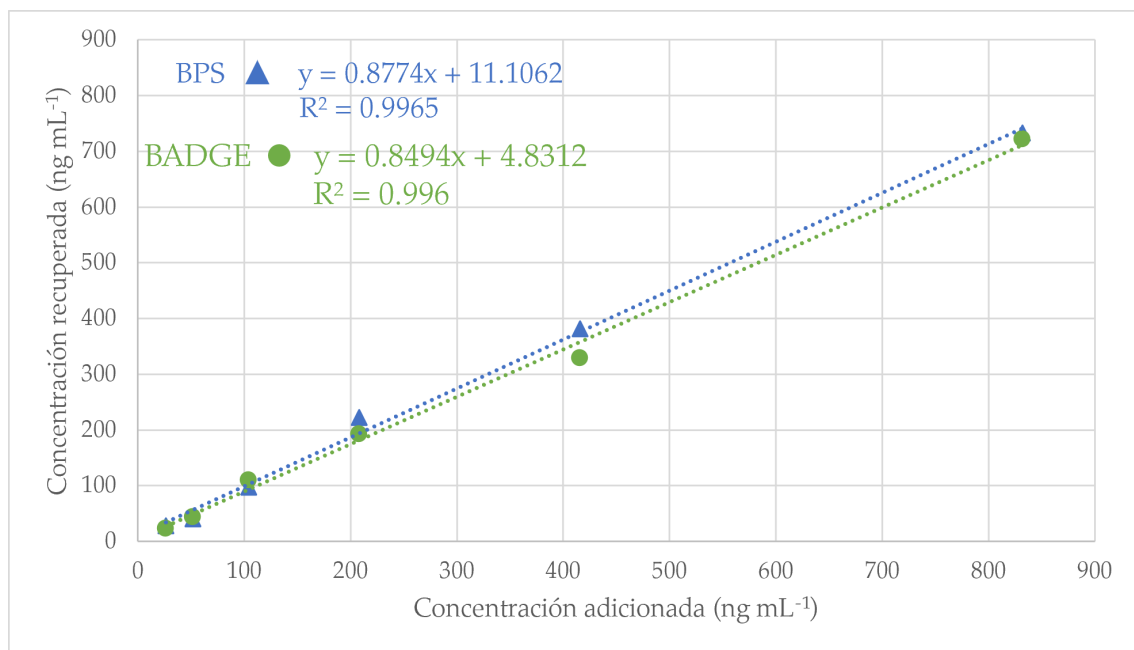


Figura B.5: Curva de recobro global del método EFS-CLAR-DAD (BPS y BADGE). Gráfica **Concentración recuperada = f(Concentración agregada)** realizada para la evaluación del método EFS-CLAR-DAD para BPS y BADGE.

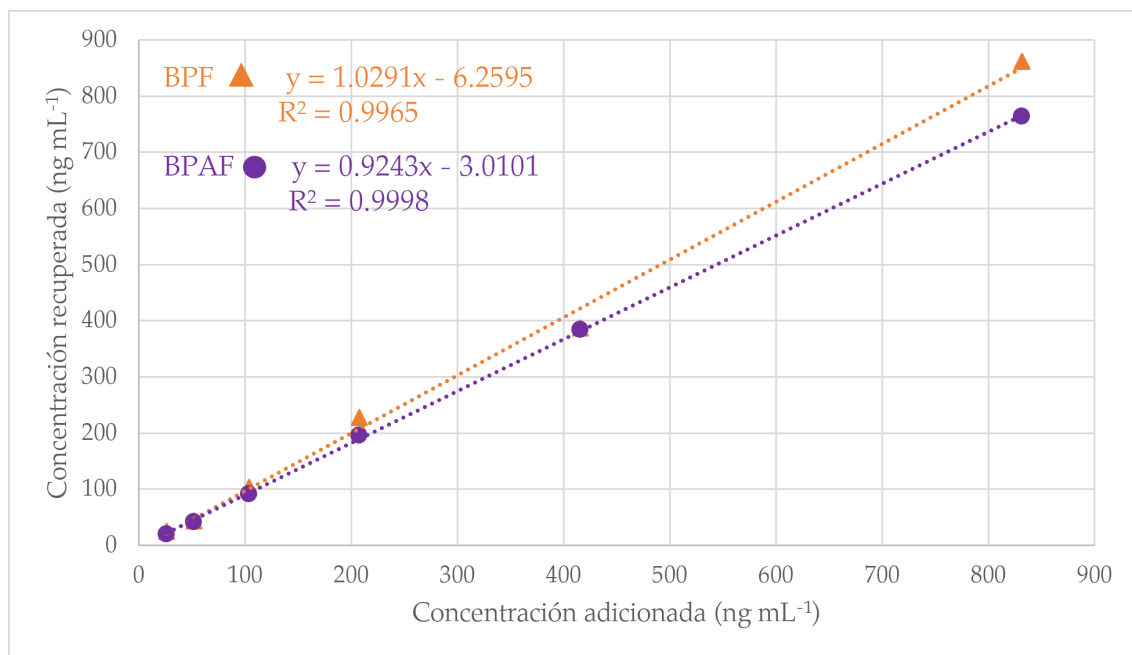


Figura B.6: Curva de recobro global del método EFS-CLAR-DAD (BPF y BPAF). Gráfica **Concentración recuperada = f (Concentración agregada)** realizada para la evaluación del método EFS-CLAR-DAD para BPF y BPAF.

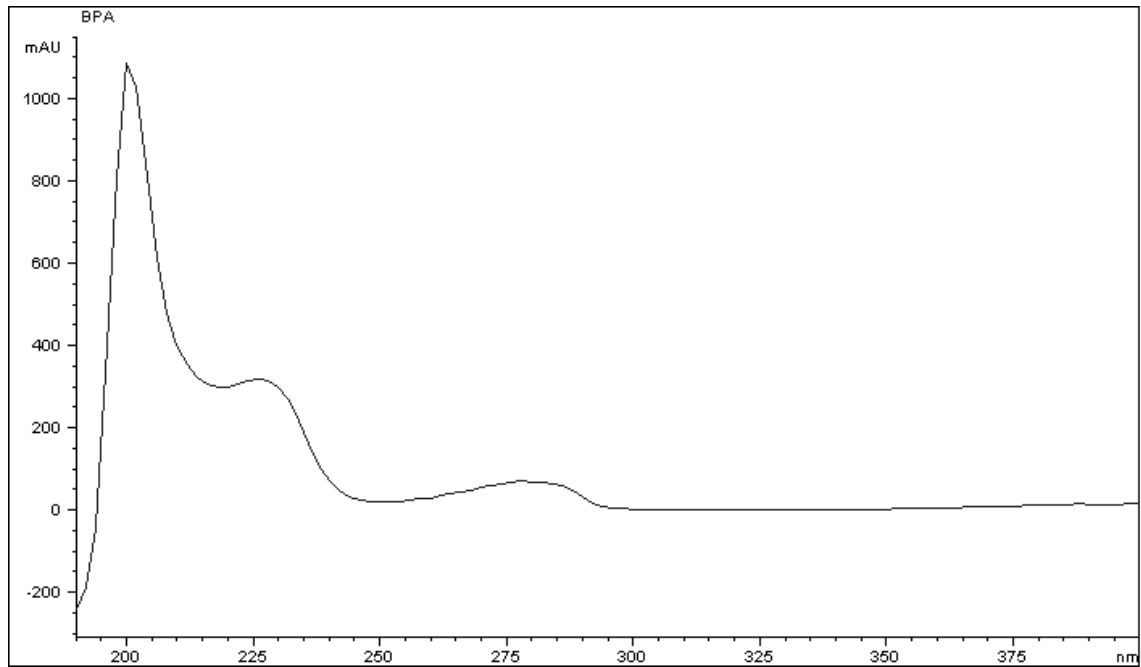
ESPECTROS DE ABSORCIÓN

Figura C.1: Espectro de absorción del BPA a $12.48 \mu\text{g mL}^{-1}$.

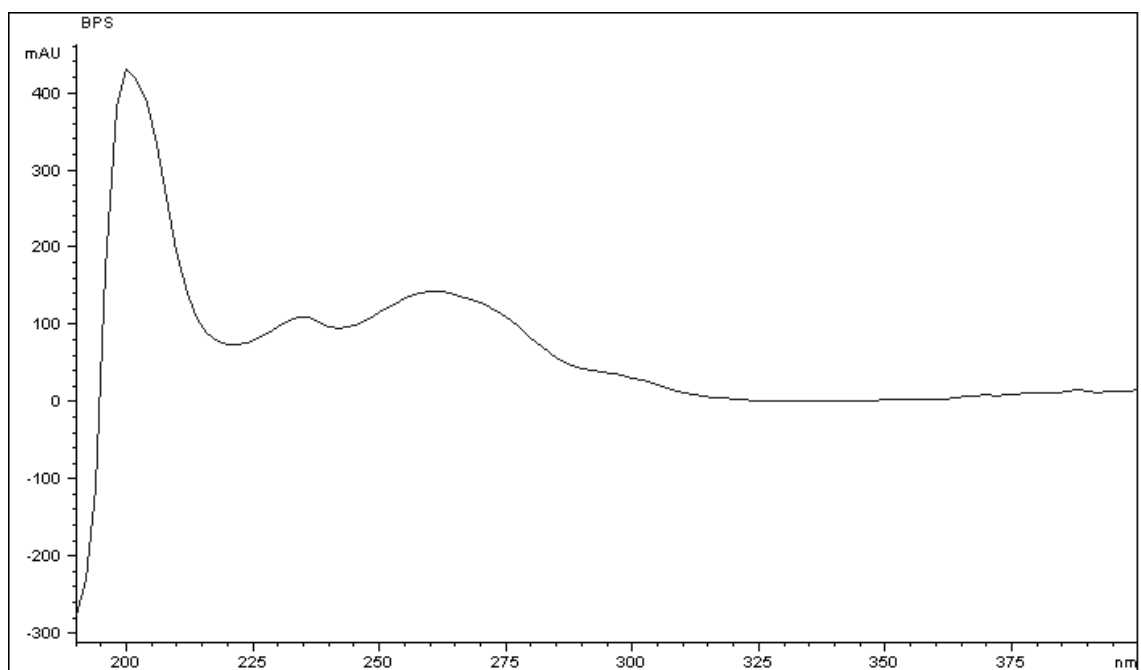


Figura C.2: Espectro de absorción del BPS a $12.48 \mu\text{g mL}^{-1}$.

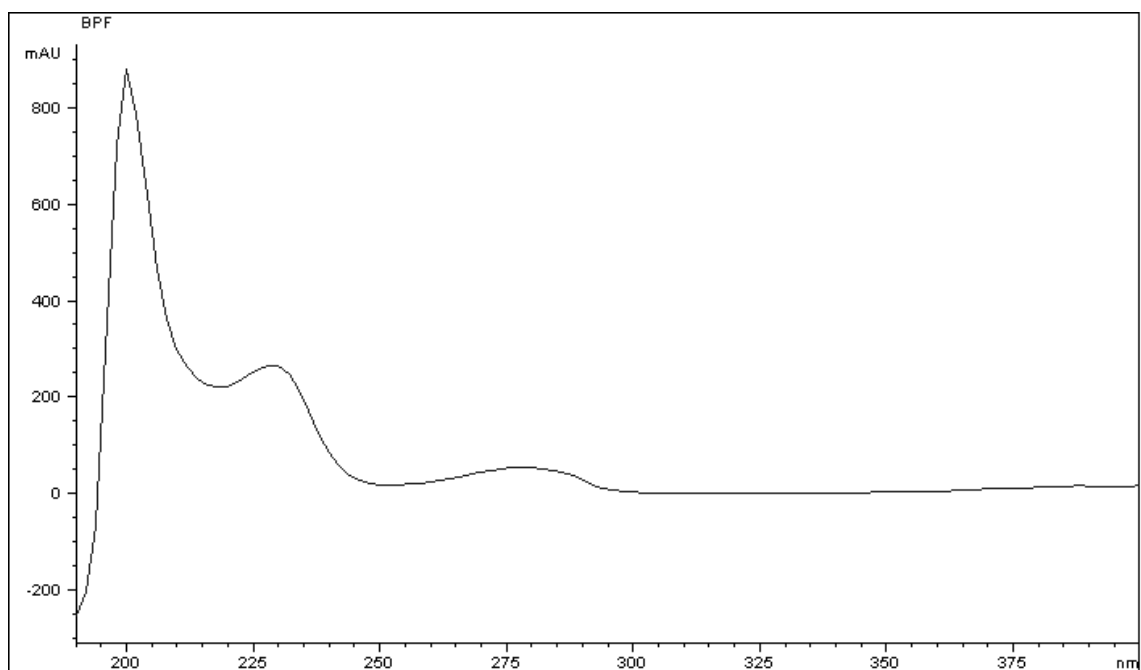


Figura C.3: Espectro de absorción del BPF a $12.48 \mu\text{g mL}^{-1}$.

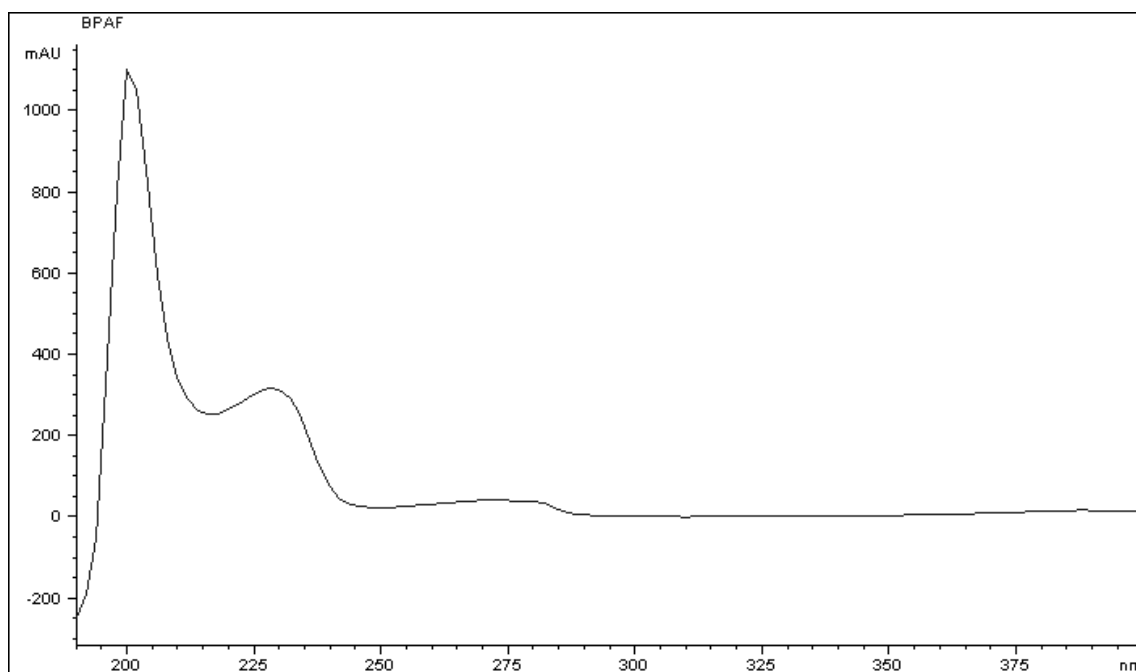


Figura C.4: Espectro de absorción del BPAF a $12.48 \mu\text{g mL}^{-1}$.

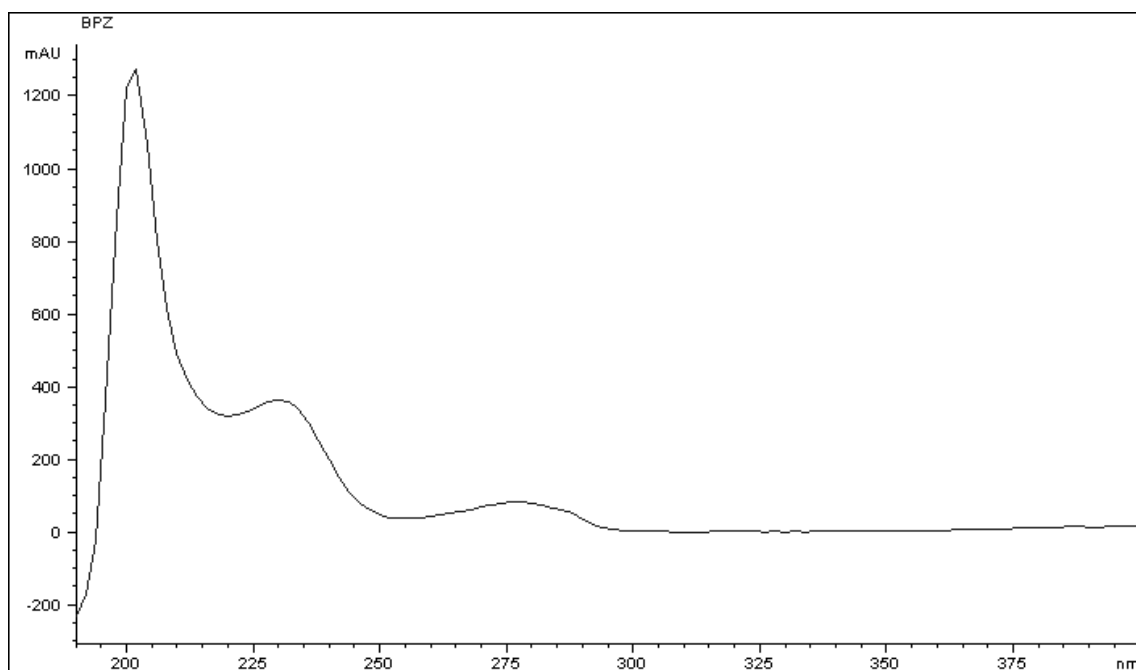


Figura C.5: Espectro de absorción del BPZ a $12.48 \mu\text{g mL}^{-1}$.

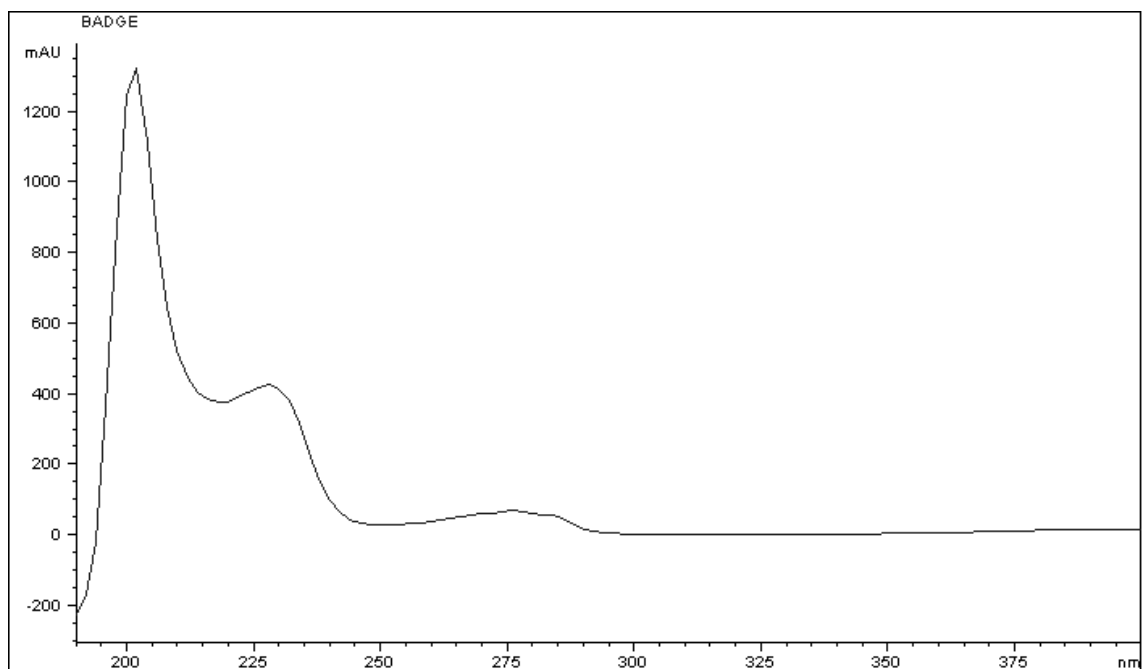


Figura C.6: Espectro de absorción del BADGE a 12.48 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

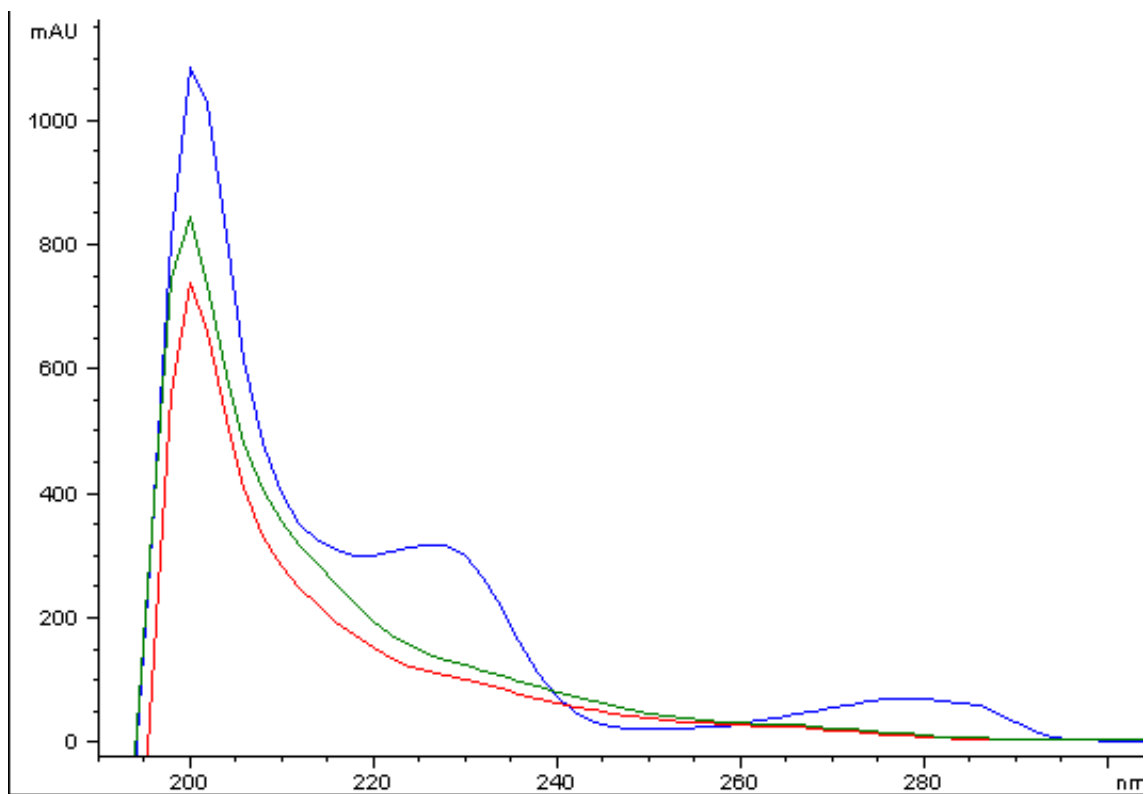


Figura C.7: Comparación de espectros de absorción experimentales. BPA a 12.48 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (azul), estándar de DEET a 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (rojo) y pico hallado en muestra de criadero (verde).

MEMORIA DE CÁLCULO

Sección D.1.

OBTENCIÓN DE LOD Y LOQ.

DSobre un cromatograma se traza un bloque que tenga una altura del tamaño de la relación S/N y se registra dicha altura.

El límite de detección se considera como 3 veces la relación S/N por lo que igualmente le corresponde un valor de 3 veces la altura. Lo mismo ocurre con el límite de cuantificación pero considerando un factor de 10 veces la relación S/N.

Sobre el mismo cromatograma se traza un bloque que tenga la misma altura que el analito cuyo límite de detección se desea calcular.

Dado que se puede relacionar la altura de un pico con la concentración entonces se cumple que:

$$\frac{LOD}{3 S/N} = \frac{C_{analito}}{h_{analito}} \quad (D.1)$$

Por lo que:

$$LOD = (3 S/N) \left(\frac{C_{analito}}{h_{analito}} \right) \quad (D.2)$$

De forma análoga se puede calcular el límite de cuantificación.

Este procedimiento debe de repetirse para cada uno de los analitos.

Sección D.2.

CÁLCULO DE RECOBRO.

Para el cálculo de los recobros de la EFS debe de ser inyectado en el sistema cromatográfico una muestra control fortificada con el mismo volumen con el que se fortificó el sistema a extraer, de esta forma, se puede considerar que se trata de una muestra donde se extrajeron por completo los analitos.

Una vez obtenidos e integrados los cromatogramas se debe obtener la proporción $\frac{A_{extracto}}{A_{control}}$. Dado que el área de un pico es directamente proporcional a la concentración del analito entonces se cumple que:

$$\frac{C_{extracto}}{C_{agregada}} = \frac{A_{extracto}}{A_{control}} \quad (D.3)$$

Nótese que la concentración agregada no es la de la muestra control si no la que tiene la muestra antes de la EFS, esto se puede hacer debido a las razones anteriormente explicadas.

Despejando de la ecuación anterior se obtiene que:

$$C_{extracto} = (C_{agregada}) \left(\frac{A_{extracto}}{A_{control}} \right) \quad (D.4)$$

Esta concentración del extracto es la concentración tras la EFS, es decir, la concentración recuperada.

Si esto se repite para cada uno de los puntos de la curva de calibración se puede construir la curva **Concentración recuperada = f (Concentración agregada)**, donde el valor de la pendiente obtenida mediante regresión lineal representa el valor del factor de recobro global para el analito en concreto.