

**Trabajo Fin de Máster:**

**Evaluación de contaminantes orgánicos en alimentos  
mediante procedimientos analíticos sostenibles**

**Evaluation of organic pollutants in food using sustainable  
analytical procedures**



**David Baute Pérez**

**Tutor/a: Bárbara Socas Rodríguez y Antonio Vicente Herrera**

**Herrera**

**Área de conocimiento: Química Analítica**

**Departamento: Departamento de Química. Sección de Química.**

**DRA. BÁRBARA SOCAS RODRÍGUEZ, PROFESORA AYUDANTE DOCTORA DE LA UNIDAD DEPARTAMENTAL DE QUÍMICA ANALÍTICA DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA, Y DR. ANTONIO VICENTE HERRERA HERRERA, PROFESOR CONTRATADO LABORAL DE INTERINIDAD DE LA UNIDAD DEPARTAMENTAL DE QUÍMICA INORGÁNICA DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA**

**AUTORIZAN:**

La presentación y defensa del Trabajo de Fin de Máster titulado “Evaluación de contaminantes orgánicos en alimentos mediante procedimientos analíticos sostenibles”, realizado por el graduado David Baute Pérez bajo nuestra tutorización durante el curso académico 2021-2022.

Y para que así conste, firmamos la presente en San Cristóbal de La Laguna, en mayo de 2022.

Dra. Bárbara Socas Rodríguez

Dr. Antonio Vicente Herrera Herrera

Este documento incorpora firma electrónica, y es copia auténtica de un documento electrónico archivado por la ULL según la Ley 39/2015.  
La autenticidad de este documento puede ser comprobada en la dirección: <https://sede.ull.es/validacion/>

Identificador del documento: 4446757

Código de verificación: 1j3/nnQp

Firmado por: Bárbara Socas Rodríguez  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

Fecha: 25/05/2022 12:13:06

2

Antonio Vicente Herrera Herrera  
UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

25/05/2022 12:18:51

# Índice

RESUMEN.....	5
ABSTRACT .....	5
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>6</b>
<b>1.1. Alquilfenoles y etoxilatos de alquilfenol .....</b>	<b>6</b>
<b>1.2. Bisfenoles (BPs) .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3. Ésteres ácidos de ftalato.....</b>	<b>7</b>
<b>1.4. Actividad disruptora endocrina y efectos de las sustancias plastificantes. ....</b>	<b>8</b>
<b>1.5. Introducción a la legislación actual de algunos compuestos disruptores endocrinos.....</b>	<b>8</b>
<b>1.6. Disolventes eutécticos .....</b>	<b>9</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>12</b>
<b>3.1. Estándares empleados.....</b>	<b>12</b>
<b>3.2. Procedimiento experimental.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2.1. Síntesis y caracterización de los NaHDES.....</b>	<b>13</b>
<b>3.2.2. Procedimiento de extracción .....</b>	<b>13</b>

3.2.3. Determinación mediante UHPLC-MS .....	16
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>19</b>
4.1. Optimización de las condiciones de separación y análisis .....	19
4.2. Optimización del método de extracción .....	22
4.2.1. Ajuste del pH.....	22
4.2.2. Efecto de la fuerza iónica .....	23
4.2.3. Volumen de la muestra.....	25
4.3. Validación del método.....	26
4.3.1. Curvas de calibración.....	26
4.3.2. Estudio de recuperaciones .....	28
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>30</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>31</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>33</b>

## **RESUMEN**

En este trabajo se ha desarrollado un método analítico para la determinación de alquilfenoles y ftalatos en muestras de vino por medio de cromatografía líquida de ultra – alta resolución acoplada a un detector de espectrometría de masas (UHPLC – MS), empleando un procedimiento de extracción que usa disolventes medioambientalmente menos agresivos y acordes a los principios de la Química Verde como son los disolventes eutécticos profundos (‘Deep Eutectic Solvents’, DES).

## **ABSTRACT**

In this project, an analytical method has been developed for the determination of alkylphenols and phthalates in wine samples by using ultra – high performance liquid chromatography coupled to a mass spectrometry detector (UHPLC – MS) using an optimized extraction procedure that involves less harmful solvents aligned with the principles of Green Chemistry, such as deep eutectic solvents (DES).

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Alquilfenoles y etoxilatos de alquilfenol

Los alquilfenoles (APs) son un grupo de compuestos que proceden de la degradación de los denominados etoxilatos de alquilfenol (APEOs) (ver Figura 1), ampliamente utilizados en la industria textil, la producción de pesticidas, combustibles, plásticos... etc. La principal problemática que presentan es que, tras su uso, suelen ser liberados sobre las aguas superficiales o en los sistemas de alcantarillado, lo que supone la contaminación del medio acuático<sup>1</sup> formándose así APs y APEOs de cadena más corta, que resultan más persistentes, bioacumulativos, estables y tóxicos que sus precursores<sup>2:3</sup> (además de tratarse de disruptores endocrinos que alteran el equilibrio hormonal).<sup>4</sup>

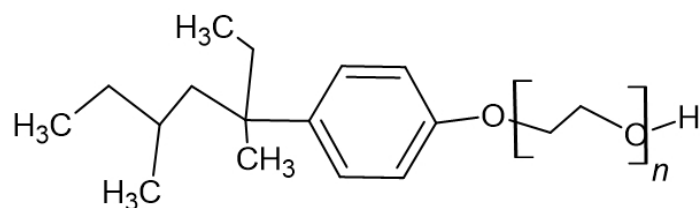


Figura 1. Estructura química general de los etoxilatos de nonilfenol (NPEs)<sup>4</sup>

### 1.2. Bisfenoles (BPs)

Los bisfenoles son compuestos químicos caracterizados por la presencia de dos anillos fenólicos conectados (ver Figura 2). El compuesto más representativo de ellos es el Bisfenol A (BPA), compuesto orgánico sintético que se emplea como precursor de plásticos, sobre todo de algunos policarbonatos y resinas epoxi que se utilizan en envases de plástico como biberones (práctica prohibida por la Unión Europea en 2018 para su uso en cualquier material en contacto con lactantes).<sup>5:6</sup> Solo en 2003, la producción a nivel mundial de BPA superó los 2 millones de toneladas.<sup>7</sup>

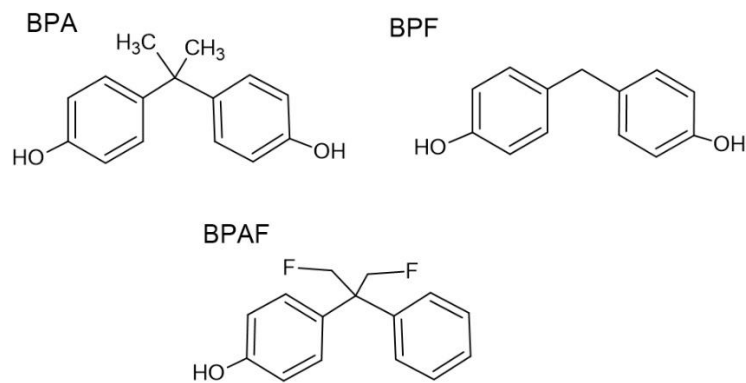


Figura 2. Estructura química de diferentes bisfenoles

### 1.3. Ésteres ácidos de ftalato

Los plastificantes se han convertido en un importante problema de salud debido a sus efectos tóxicos. En este sentido, los ésteres ácidos de ftalato (PAEs) (Figura 3) pueden producir alteraciones de diferentes tejidos (riñón, hígado, reproductivo) e incluso cáncer<sup>8</sup>. Su uso en la industria agroalimentaria (envasado de alimentos y material de contacto durante el procesado) es frecuente debido a las propiedades que confieren al material final: flexibilidad, durabilidad y longevidad.<sup>9</sup> Sin embargo, estos compuestos no se unen químicamente a la matriz polimérica, sino que penetran en ella aumentando la flexibilidad. En consecuencia, y considerando su estabilidad y persistencia, es probable que migren al producto final. De hecho, diferentes estudios de biomonitorización han detectado residuos de PAEs en tejidos humanos.<sup>10</sup>

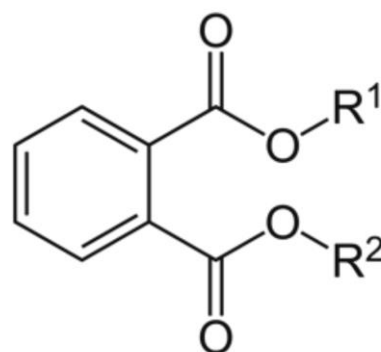


Figura 3. Estructura química general de los ésteres ácidos de ftalatos (PAEs)

#### **1.4. Actividad disruptora endocrina y efectos de las sustancias plastificantes.**

Un disruptor endocrino (ECDs) es una sustancia química, ajena al cuerpo humano o a la especie animal a la que afecta, capaz de alterar el equilibrio hormonal de los organismos<sup>11</sup>. En otras palabras, son “agentes externos que interfieren en la síntesis, secreción, transporte, metabolismo, capacidad de unión, o eliminación de hormonas presentes de forma natural en el individuo, responsables de la homeostasis, reproducción y procesos de desarrollo”.<sup>12</sup> Los compuestos químicos que actúan como EDCs son muy numerosos y presentan estructuras muy variadas<sup>13</sup> afectando a cualquier sistema endocrino expuesto dadas las propiedades compartidas y las similitudes con las hormonas. Esto desemboca en efectos metabólicos relacionados con xenoestrógenos, antiestrógenos, disrupción de la función tiroidea y corticoide.<sup>12; 14</sup> Además, enfermedades como el cáncer, la diabetes, la obesidad y la infertilidad, entre otras, han sido vinculadas a estas sustancias.<sup>4; 15</sup>

#### **1.5. Introducción a la legislación actual de algunos compuestos disruptores endocrinos.**

Diferentes alquilfenoles y ftalatos pertenecen a la categoría 1 de la ‘Lista de Disruptores Endocrinos Prioritarios’<sup>16</sup> para la vida animal y salud humana de la Comisión Europea.<sup>13</sup> Si bien para el agua se dispone de diversas directivas (fijándose niveles máximos aceptables para estos compuestos), no se han establecido estos valores en leyes o Directivas europeas o estadounidenses para dichos analitos en vinos.

Algunos de los PAEs objeto de estudio si se encuentran restringidos en los alimentos envasados en plástico acorde al Reglamento (UE) n° 10/2011 de la Comisión, de 14 de enero de 2011, sobre materiales plásticos. En este reglamento se prohíbe la presencia de algunos de estos compuestos (como el DEHP) y se fijan límites de migración específicos para otros como los mostrados en la Tabla 1.



Tabla 1. Valores del límite de migración específico (LME) para PAEs en el Reglamento (UE) nº 10/2011<sup>17</sup>

<b>Analito</b>	<b>Límite de migración específico (LME)</b>
Dibutilftalato	0,3 mg/kg
Di-(2-etilhexil) ftalato	1,5 mg/kg
Bis(2-etilhexil) adipato	18 mg/kg
Bencilbutilftalato	30 mg/kg
Valor por defecto	60 mg/kg

La falta de legislación sobre estos analitos y sus efectos en la salud ponen de manifiesto la necesidad de desarrollar métodos de análisis altamente sensibles como el que se presenta en este trabajo.

### **1.6. Disolventes eutécticos**

En los últimos años, ha aumentado la preocupación por el riesgo y los peligros que implican los residuos químicos tanto para el medioambiente como para la salud. Es por esto, que en un intento por lograr una química menos contaminante, surge la ‘Química Verde’. Dado que los disolventes representan la mayor proporción de sustancias químicas usadas en desarrollos experimentales, los disolventes eutécticos profundos (DES, del inglés ‘Deep Eutectic Solvents’) surgieron como alternativa a los disolventes tradicionales tóxicos. Estos presentan propiedades únicas que incluyen, entre otras, fácil síntesis, bajo costo, respeto al medioambiente, baja

volatilidad, alto poder de disolución y buena biodegradabilidad.<sup>18; 19</sup> Su característica definitoria es que la temperatura de fusión eutéctica es significativamente inferior a la esperada de las entalpías de fusión de los compuestos puros.

Los DES consisten en una mezcla de al menos dos componentes, un donante de enlaces de hidrógeno (HBD) y un aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA), que establecen fuertes interacciones entre sí.<sup>19</sup> Cuando un DES se obtiene de la combinación de metabolitos primarios o secundarios con otros componentes naturales y, además, ambos componentes son insolubles en agua, se denominan DES naturales hidrofóbicos (NaHDES).

## 2. OBJETIVOS.

El objetivo principal de este trabajo fue el desarrollo de un método analítico sostenible capaz de determinar APs (5), APEOs (3), BPs (3), PAEs (4) y un adipato (1) simultáneamente por primera vez en muestras de vino. Para ello se plantearon los siguientes objetivos secundarios:

- Revisión bibliográfica para adquirir conocimientos y conocer la situación actual respecto a los compuestos de interés.
- Obtención de espectros de masas de las diferentes sustancias.
- Optimización del método para la separación de los compuestos por medio del uso de la cromatografía líquida de ultra – alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (UHPLC – MS).
- Optimización de los parámetros del método que afectan a la eficacia de la extracción.
- Validación del método analítico en términos de calibrado en la matriz, sensibilidad y estudio de recuperaciones.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Estándares empleados

Tabla 2. Estándares de los analitos seleccionados por el estudio.

Analito	Abreviatura	Familia del compuesto	Número CAS	Pureza	Fabricante	Concentración disolución (ppm)
Bisfenol F	BPF	BPs	620-92-8	98,0	Sigma-Aldrich	660
Bisfenol A	BPA	BPs	80-05-7	99,8	Dr. Ehrenstorfer	520
Bisfenol AF	BPAF	BPs	1478-61-1	99,0	Sigma-Aldrich	680
Ftalato de dialilo	DAP	PAEs	131-17-9	99,2	Sigma-Aldrich	516
4-cumilfenol	CP	APs	599-64-4	99,0	Sigma-Aldrich	810
4-n-amilfenol (4-n-pentilfenol)	AP	APs	14938-35-3	98,7	Dr. Ehrenstorfer	1180
4-n-hexilfenol	HEXP	APs	2446-69-7	-	Sigma-Aldrich	690
4-iso-octilfenol dietoxilato	OP2EO	APEOs	2315-61-9	97,3	Dr. Ehrenstorfer	1000
4-tert-octilfenol monoetoxilato	TOP1EO	APEOs	2315-67-5	96,0	TRC	460
4-n-octilfenol	OP	APs	1806-26-4	99,5	Dr. Ehrenstorfer	620
4-n-nonilfenol	NP	APs	104-40-5	99,9	Dr. Ehrenstorfer	520
4-n-nonilfenol monoetoxilato	NP1EO	APEOs	104-35-8	99,0	Dr. Ehrenstorfer	570
Éster de bis-2-n-butoxietilo del ácido ftálico	DBEP	PAEs	117-83-9	99,0	Dr. Ehrenstorfer	537
Ftalato de bis-(2-etilhexilo)	DEHP	PAEs	117-81-7	99,7	Fluka Sigma-Aldrich	1007
Éster de bis-2-etilhexilo del ácido	DEHA	Adipato	103-23-1	99,7	Dr. Ehrenstorfer	547

adípico						
Ftalato de di-n-octilo	DNOP	PAEs	117-84-0	99,5	Fluka Sigma-Aldrich	448
Ftalato de dibutilo-3,4,5,6-d <sub>4</sub>	DBP-d <sub>4</sub>	PAEs (IS)	93952-11-5	98,5	Fluka Sigma-Aldrich	70
Ácido ftálico bis-hexil éster d <sub>4</sub>	DHP-d <sub>4</sub>	PAEs (IS)	1015854-55-3	97,0	Dr. Ehrenstorfer	970
4-tert-octilfenol monoetoxilado- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	TOP1EO- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	APEOs (IS)	1173019-48-1	100	TRC	100

IS: Estándar interno

## 3.2. Procedimiento experimental

### 3.2.1. Síntesis y caracterización de los NaHDES

El NaHDES utilizado está formado por el monoterpeno mentol y el ácido graso ácido octanóico, en relación molar 1:1. La preparación consistió en pesar ambos componentes en un vial de vidrio con tapón de rosca y calentar a 80°C durante 10 minutos bajo agitación magnética a 850 rpm hasta obtener una mezcla líquida incolora y homogénea.

### 3.2.2. Procedimiento de extracción

La técnica de extracción aplicada fue una microextracción líquido-líquido asistida por vórtex (VA-LLME). Para ello, se adicionaron los estándares internos (ISs) TOP1EO-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, DBP – d<sub>4</sub>, DHP – d<sub>4</sub> (concentración inyectada 125 µg/L) en un tubo de vidrio de 15 mL, se secaron y se añadieron 10 mL de muestra (vino blanco seco ecológico ajustado previamente a pH 6,00). A continuación, se adicionaron 100 µL del DES mentol: ácido octanóico 1:1 (preparado previamente). Tras agitación vórtex durante 1 minuto para asegurar el contacto del DES con los analitos, la mezcla fue centrifugada durante 10 minutos a 3000 rpm y 15°C en una centrífuga modelo 5810R de Eppendorf. Posteriormente, con una micropipeta se tomaron 10

$\mu\text{L}$  de la gota del DES que contiene los analitos, formada en la parte superior, y se transfirieron a un vial de inserción con fondo cónico de  $300 \mu\text{L}$  para viales de  $2 \text{ mL}$ . Finalmente, se completó el volumen hasta  $200 \mu\text{L}$  con una mezcla de ambos componentes de la fase móvil elegida (disolución de agua y metanol ambas al  $0,0125\%$  de  $\text{NH}_3$  al 25:75), quedando así listo para proceder a la inyección. Este procedimiento se puede observar de forma esquemática a continuación:

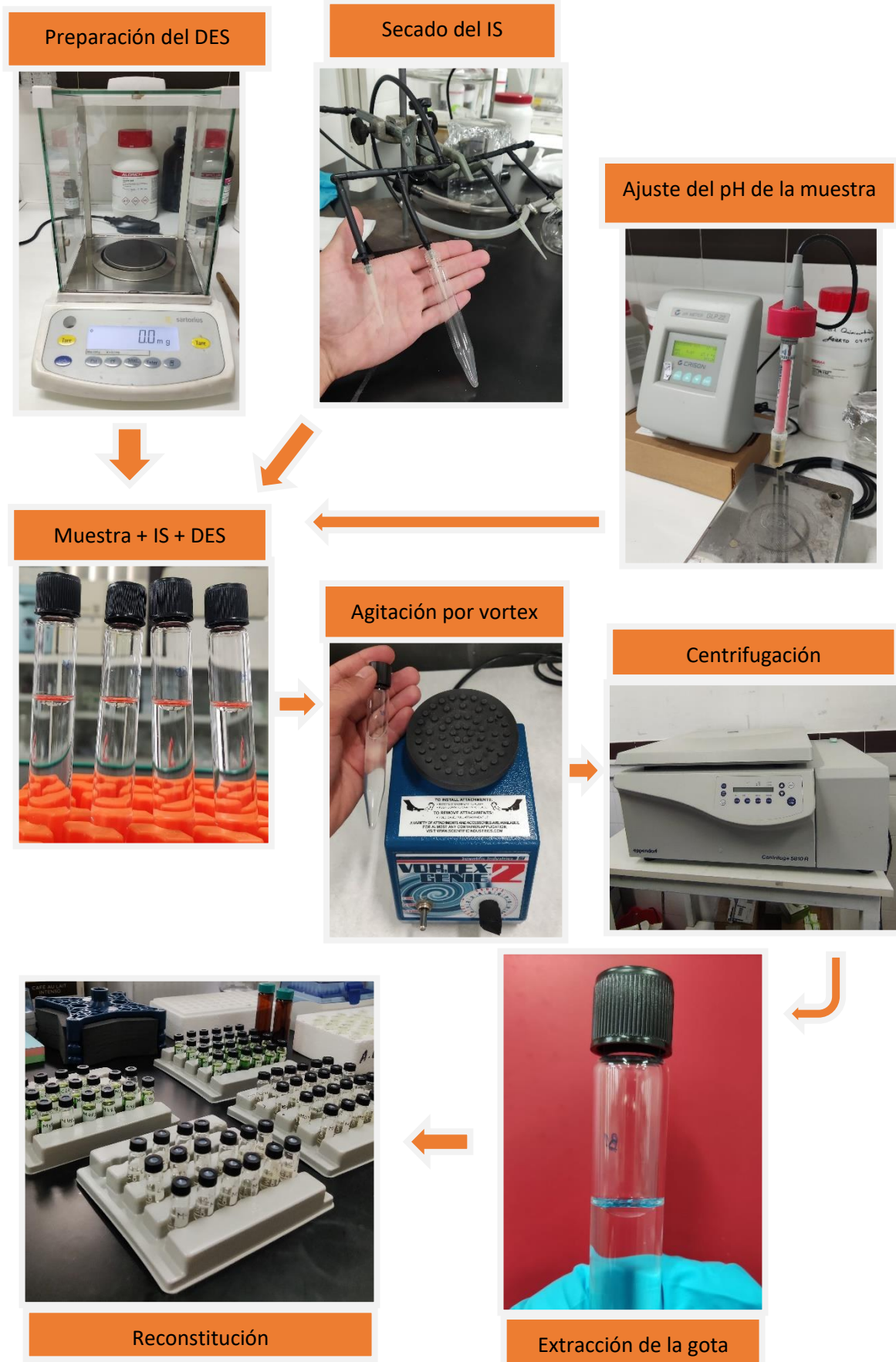


Figura 4. Esquema del procedimiento de extracción en muestras

### 3.2.3. Determinación mediante UHPLC-MS

La separación de los 16 analitos se realizó empleando una columna Acquity UPLC® BEH C18 de 2,1 x 50 mm y 1,7 µm de diámetro de partícula de Waters Chromatography conectada a una precolumna Acquity UPLC® BEH de Waters. La columna se mantuvo a una temperatura de 40 °C y el volumen de inyección fue 2,5 µL. El automuestreador se mantuvo a 10°C. Las fases móviles elegidas consistían en una disolución al 0,0125% de NH<sub>3</sub> en metanol (B) y una disolución al 0,0125% de NH<sub>3</sub> en agua (A). El tiempo total de análisis fue de una duración de 4,91 minutos. El gradiente empleado consistió en una proporción inicial de 50:50 de fase acuosa y orgánica para continuar con un aumento gradual al 100% de fase orgánica y regreso a las condiciones iniciales, siempre manteniendo el flujo en 0,300 mL/min. Estas condiciones se detallan a continuación:

*Tabla 3. Gradiente de separación empleado.*

<b>Tiempo</b>	<b>Fase acuosa (%)</b>	<b>Fase orgánica (%)</b>
0	50	50
1	50	50
2	20	80
3	0	100
4	0	100
5	50	50
7	50	50

El análisis por MS se basó en el modo de monitoreo de iones seleccionados (SIM) utilizando un sistema modelo Acquity QDa Q MS (Waters Chromatography) con ionización por electrospray (ESI) y un cuadrupolo simple como analizador. Las condiciones finales del método se pueden observar en la Tabla 4. El voltaje del cono y la temperatura de desolvatación se establecieron en 1.5 kV y 600 °C, respectivamente.



Tabla 4. Condiciones de detección por MS de los analitos de interés.

<b>Analito</b>	<b>Masa molecular (g/mol)</b>	<b>ESI (polaridad)</b>	<b>Ion individual (m/z)</b>	<b>Voltaje de cono (V)</b>
BPF	200,24	-	198,95	15
BPA	228,29	+	226,94	20
BPAF	336,23	-	334,94	15
DAP	246,26	+	247,1	14
CP	212,90	-	211,04	5
AP (4-n-AP)	164,25	-	162,84	5
HEXP	178,28	-	176,93	5
DBEP	367,50	+	367,20	18
OP <sub>2</sub> EO	294,44	+	312,28	20
TOP <sub>1</sub> EO	250,38	+	268,22	20
OP (4-n-OP)	206,33	+	205,04	10
NP (4-n-NP)	220,36	-	219,07	15
NP <sub>1</sub> EO	264,41	+	282,25	10
DEHP	350,56	+	166,90	22
DEHA	370,60	+	110,9	24
DNOP	290,28	+	148,9	22

DBP-d <sub>4</sub>	282,37	+	152,96	20
DHP-d <sub>4</sub>	338,47	+	152,91	22
TOP <sub>1</sub> EO- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	336,23	-	274,04	15

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. Optimización de las condiciones de separación y análisis**

El análisis por MS se basó en el modo de monitoreo de iones seleccionados (SIM), creándose dentro del método un escaneo SIM para cada analito. Para ello, se procedió a la inyección de cada analito utilizando el sistema ESI tanto positivo como negativo y se realizaron inyecciones de los mismos con el método cromatográfico en modo de escaneo completo o full scan (FS) y SIM a diferentes valores de voltaje de cono para determinar el voltaje asociado a cada analito. Posteriormente, se pudo establecer los escaneos SIM para detectar cada compuesto en mezclas de todos los estándares y ISs, conformando así el método final (Tabla 4). Para aquellos compuestos que presentaban tiempos de retención muy similares se hicieron inyecciones por separado para comprobar que no hubiese aportes de señal entre ellos, influyendo en la correcta determinación de los mismos.

De manera ilustrativa, se muestran en las Figuras 5 y 6 los cromatogramas de iones extraídos para cada analito con sus respectivos tiempos de retención.

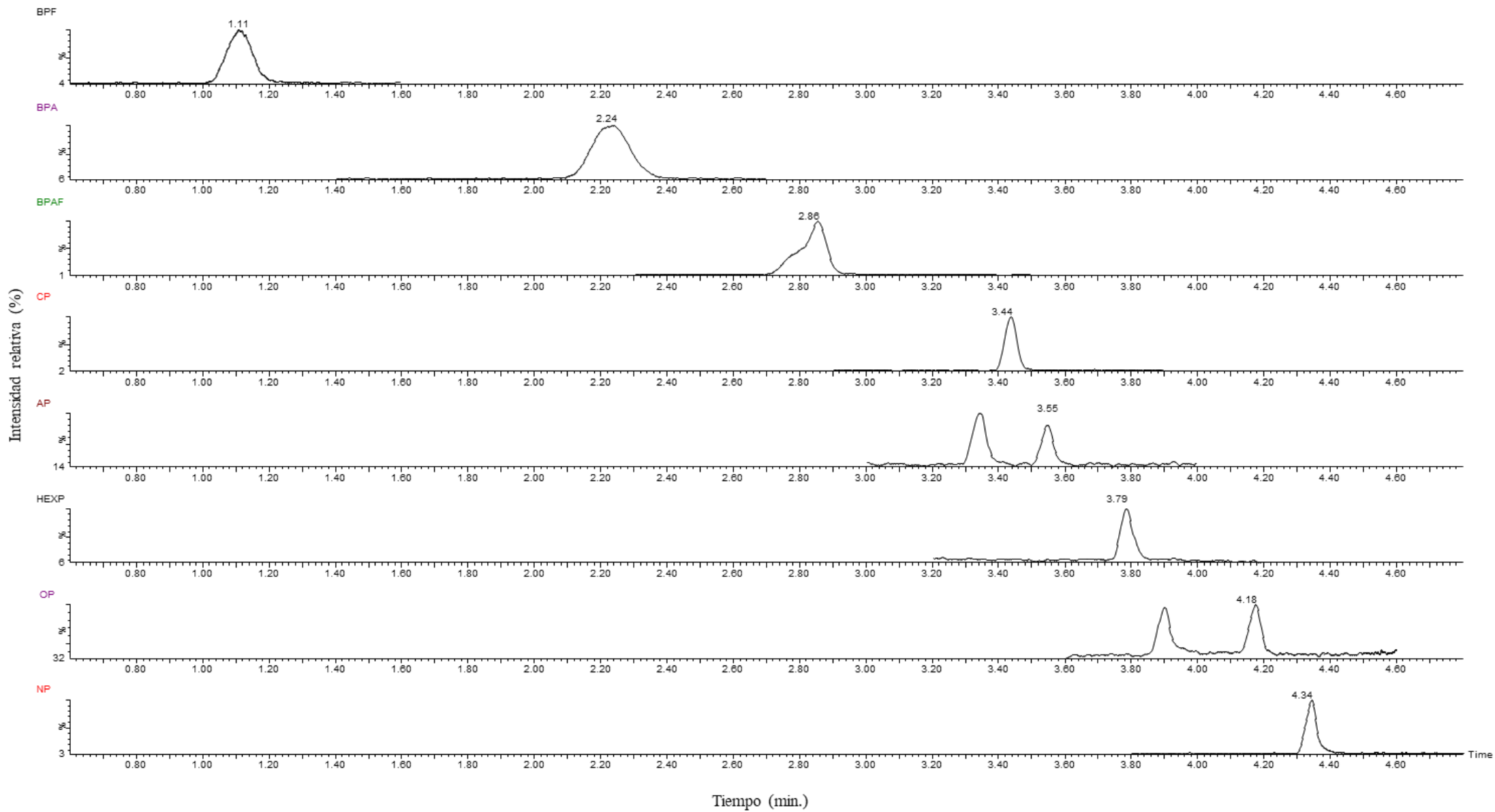


Figura 5. Cromatogramas de los analitos BPF, BPA, BPAF, PP, CP, AP, HEXP, OP y NP inyectados en las condiciones finales (sección 3.2.3.) a 125 µg/L.

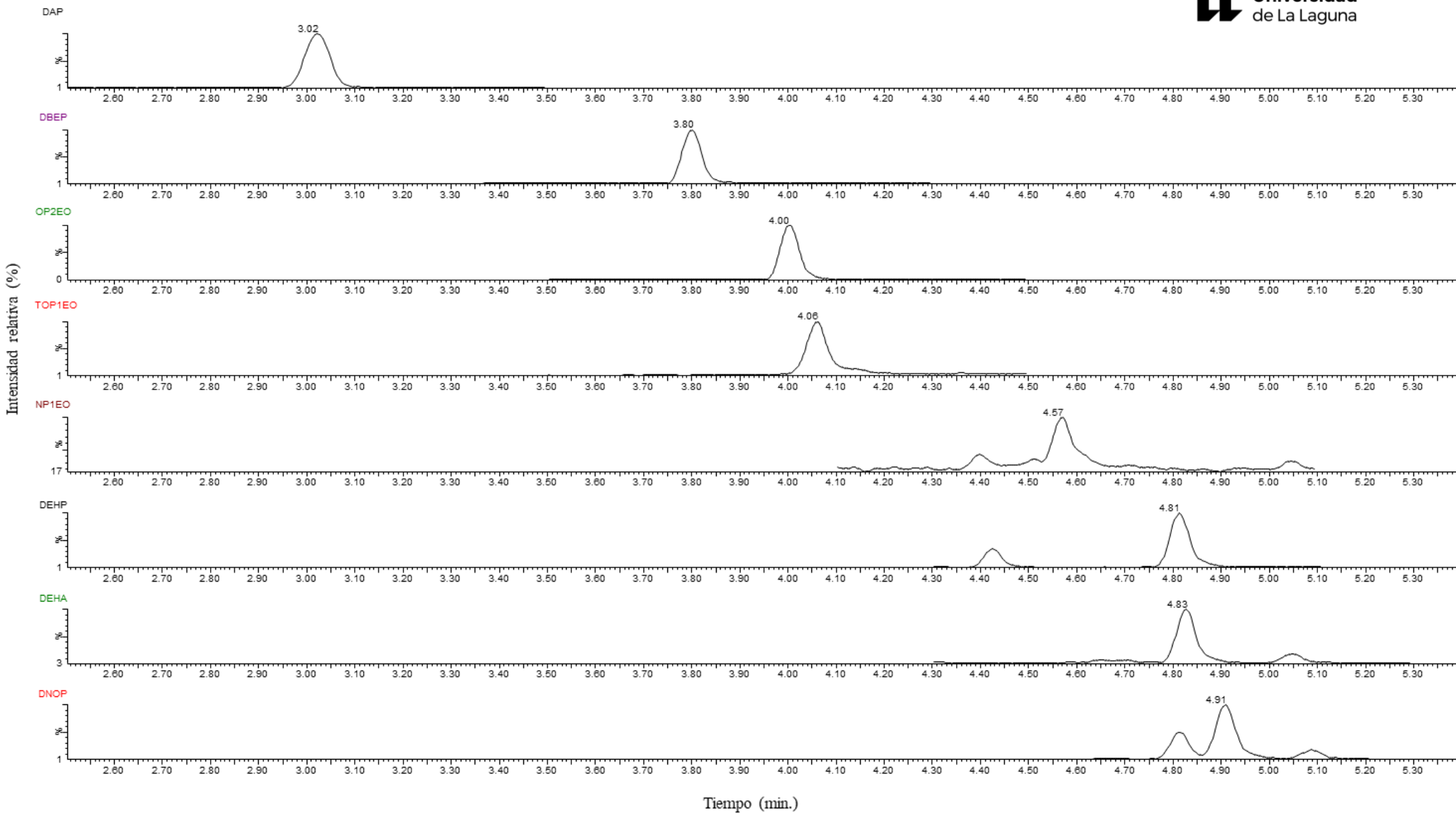


Figura 6. Cromatogramas de los analitos DAP, DBEP, OP2EO, TOP1EO, NP1EO, DEHP, DEHA, DNOP inyectados en las condiciones finales (sección 3.2.3.) a 125 µg/L.

## 4.2. Optimización del método de extracción

Para asegurar una extracción eficaz, se optimizaron los distintos parámetros que pueden afectar a la eficacia del procedimiento LLME. En este sentido, se evaluó el pH de la muestra, la fuerza iónica y el volumen de muestra utilizado. Estos estudios se llevaron a cabo utilizando un vino blanco seco ecológico y se tomó como criterio de selección aquel parámetro de optimización en el que se obtuviese el mayor número de analitos posible con recuperaciones absolutas comprendidas entre el 70 y el 120%.

### 4.2.1. Ajuste del pH

Puesto que el DES se forma, principalmente, a través de enlaces de hidrógeno, la acidez de la muestra puede tener un efecto importante en la estructura del propio disolvente de extracción. Así, en la Figura 7 se pueden observar las recuperaciones resultantes a pH 2, 6 y 12, manteniendo el resto de las condiciones constantes.

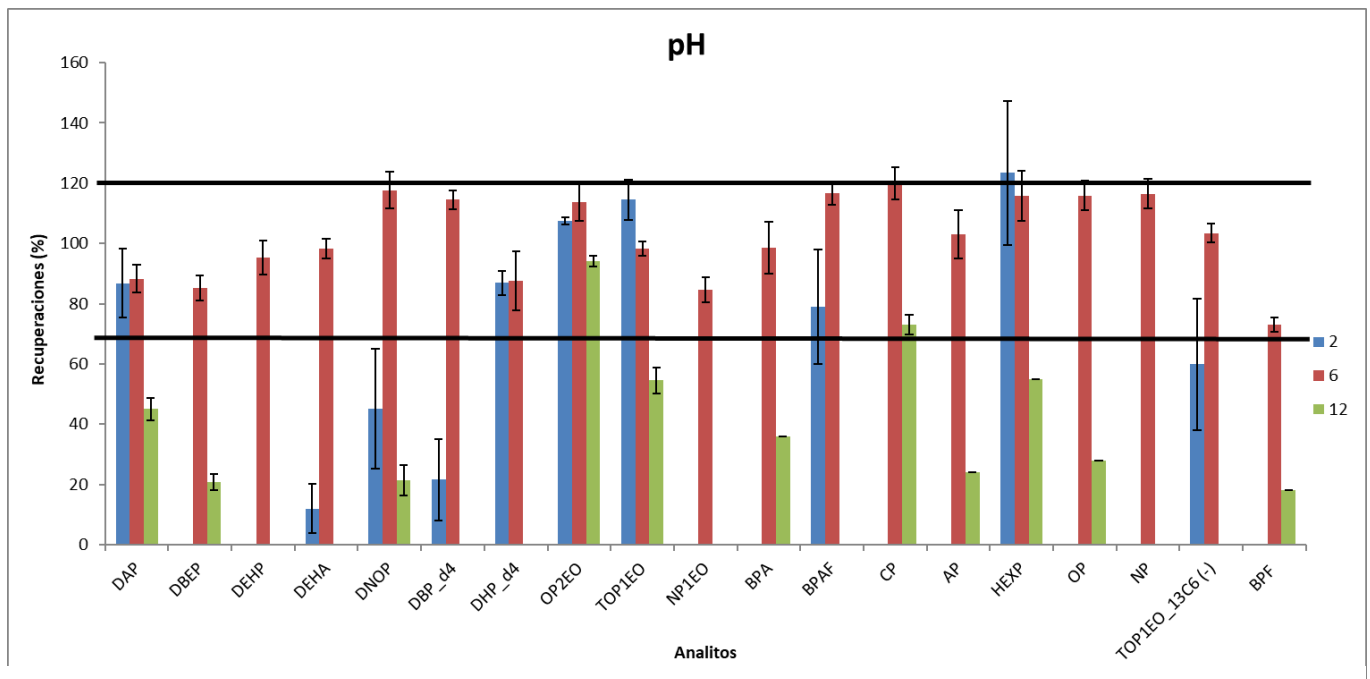


Figura 7. Recuperaciones a distintos valores de pH para los analitos objeto de estudio (n=3). Condiciones: 10 mL vino extraídos con 100  $\mu$ L de Men: Oct 1:1, concentración inyectada: 125  $\mu$ g/L.

Se observa en el gráfico el descenso de las recuperaciones a pH 12 y 2, dado que en el primero solo se recuperan 11 analitos, siendo sólo uno de ellos (OP2EO, 94,1%) superior al 70%; y en el segundo se recuperan 8 analitos (pero solo cuatro de ellos se encuentran en el rango 70 – 120%), solo dos de los tres ISs y el HEXP supera el 120% (123,4%).

Por tanto, la opción más favorable es pH 6: se recuperan los 16 analitos, todos ellos comprendidos entre el rango de recuperaciones óptimo y con desviaciones estándares relativas (RSD) (%) adecuadas (inferiores al 20%).

#### **4.2.2. Efecto de la fuerza iónica**

Se evaluó también la influencia de la salinidad (o fuerza iónica) en el procedimiento de extracción, para descartar o considerar la posible influencia del denominado efecto “salting-out”, que consiste en la transferencia de analitos al disolvente (en este caso el DES) a altas concentraciones salinas debido a la competencia por moléculas de solvatación entre los iones salinos agregados y los analitos disueltos en la muestra.

Los resultados obtenidos para cada analito para concentraciones de cloruro sódico de 0, 10, 20 y 30% p/v, se muestran en la Figura 8.

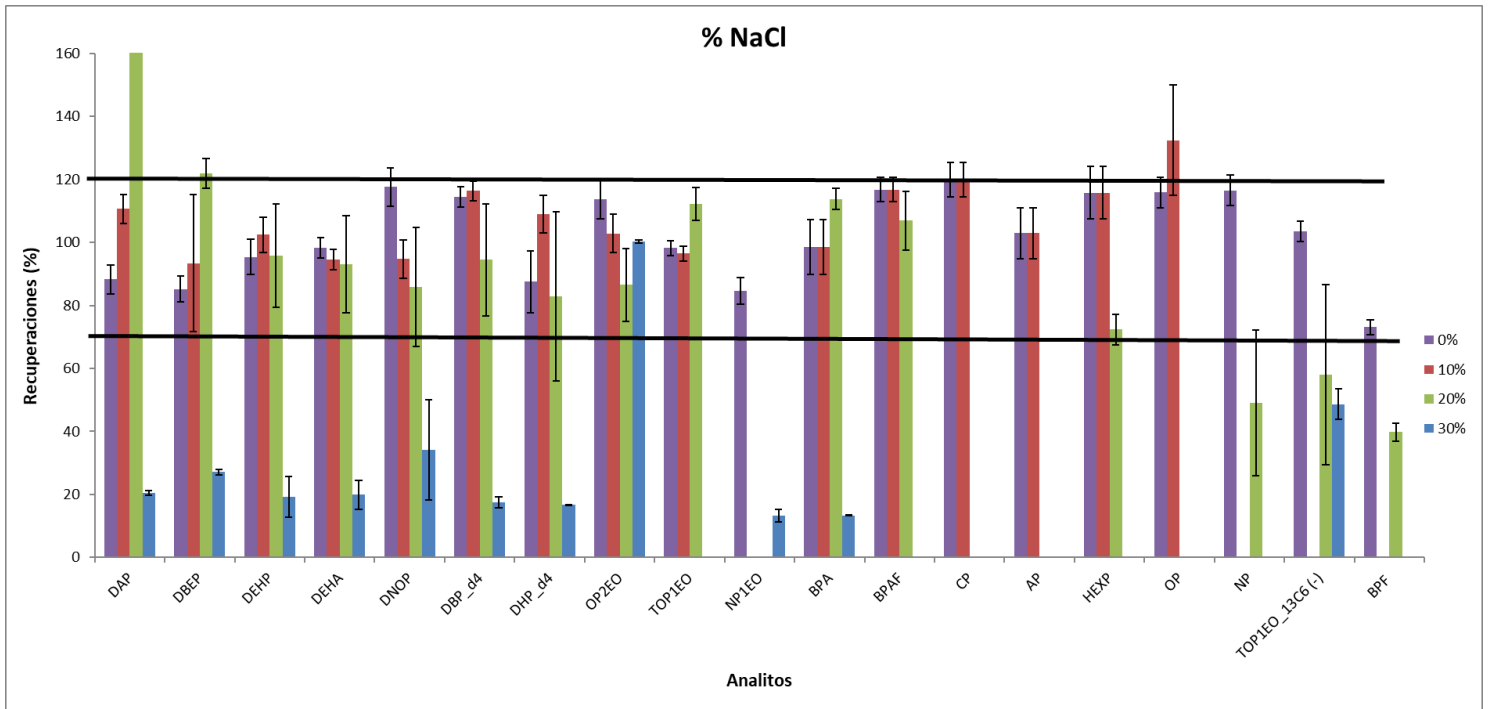


Figura 8. Recuperaciones obtenidas a distintas cantidades de cloruro sódico en vino. Condiciones: 10 mL de vino a pH = 6 extraídos con 100  $\mu$ L de DES Men: Oct 1:1; concentración inyectada: 125  $\mu$ g/L

La Figura 8 muestra que la variación ocasionada por el uso de una u otra concentración de cloruro sódico era prácticamente nula, a excepción de la concentración de 30% p/v donde los resultados sí que son mucho más dispares reduciéndose considerablemente los porcentajes de recuperación.

En base a estos resultados se decidió no adicionar cloruro sódico durante la extracción dado que, además de recuperarse los 16 analitos en el rango entre 73,1 – 120,7%, esto permitía simplificar el procedimiento. En este sentido, la ausencia de sales es un beneficio en el sistema de espectrometría de masas evitando ensuciar la fuente, lo que puede afectar a la sensibilidad.



### 4.2.3. Volumen de la muestra

El vino es una muestra que presenta dificultad a la hora de observar la formación de la gota del DES durante el procedimiento de extracción, por lo que se quiso evaluar si reduciendo el volumen de muestra y combinándolo con agua en proporción 1:1 v/v, el procedimiento de extracción era más práctico manteniendo las buenas recuperaciones obtenidas con 10 mL de muestra. Así, se obtuvieron los siguientes resultados:

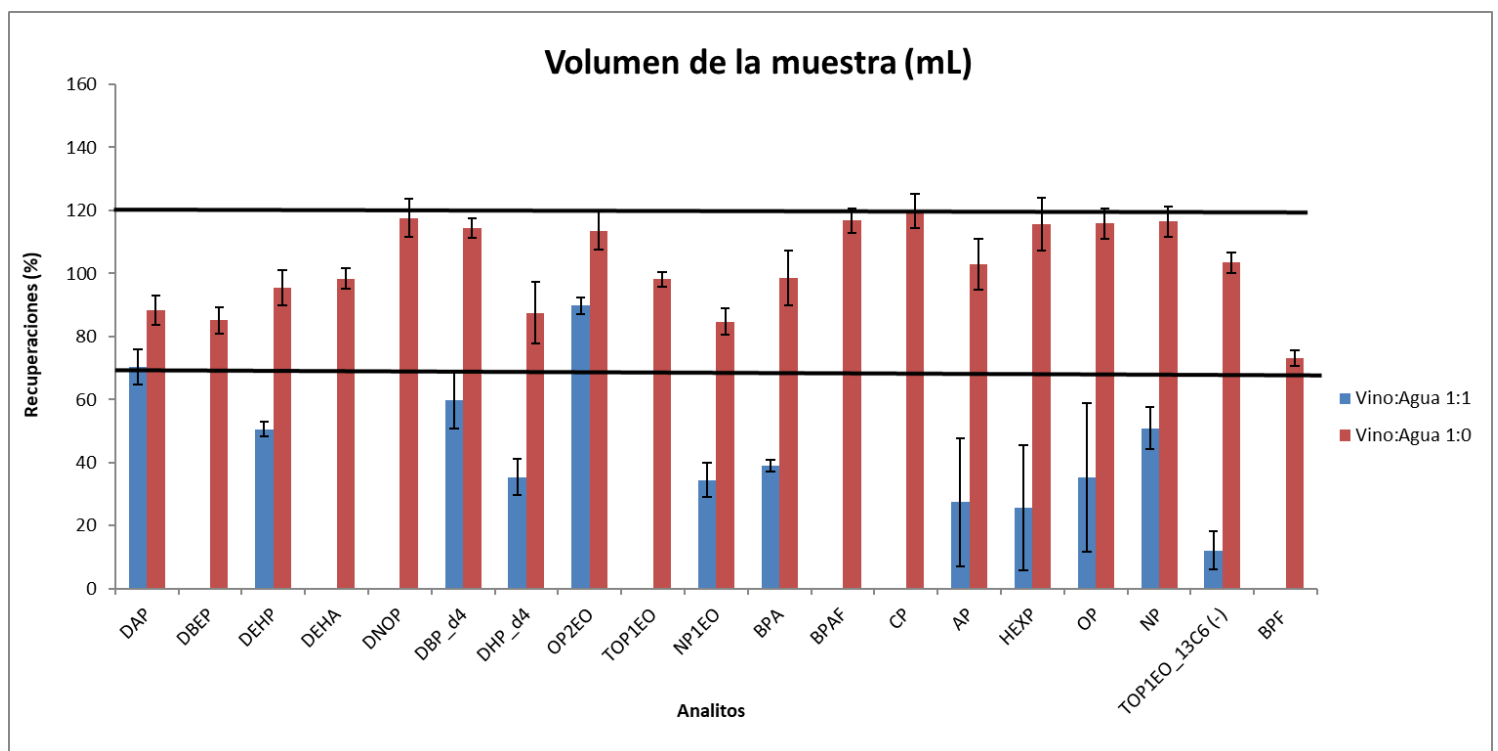


Figura 9. Recuperaciones para cada analito en función del volumen de muestra: agua. pH = 6 y sin adición de NaCl.

Con una proporción vino: agua 1:1 v/v las recuperaciones obtenidas resultan desfavorables (11 analitos) en comparación con el uso de un volumen total de vino de 10 mL. Por ello, el método quedó finalmente conformado con las siguientes condiciones: 100 µL DES mentol: ácido octanoico 1:1, 10 mL de muestra (vino), pH = 6 y sin adición de NaCl.

### 4.3. Validación del método

Se realizaron estudios de calibración en la matriz, de límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs), y de recuperaciones al nivel de concentración de 25 µg/L.

#### 4.3.1. Curvas de calibración

Se preparó un calibrado de los analitos a seis niveles de concentración realizando tres inyecciones por cada nivel en el sistema UHPLC-MS. Para ello, se extrajeron seis muestras de la matriz libre de los analitos y se enriquecieron, al final del proceso, con distintas concentraciones de una mezcla que contenía todos los analitos además de los ISs a una concentración fija (25 µg/L en la muestra o 125 µg/L inyectados). Las curvas de calibrado se obtuvieron de representar las relaciones de área ( $A_{\text{pico analito}} / A_{\text{IS}}$ ) frente a la concentración. Para los APs, APEOs y BPs se utilizó el TOP1EO –  $^{13}\text{C}_6$  como IS, mientras que el DHP –  $\text{d}_4$  se usó para el DEHA y el DBP –  $\text{d}_4$  para los PAEs.

En la Tabla 5 se presentan las ecuaciones de las curvas correspondientes con sus intervalos de confianza y también los valores del coeficiente de determinación ( $R^2$ ) que fueron superiores a 0,9910. Todos los analitos presentaron curvas de regresión lineal. Los LODs y LOQs se calcularon como las concentraciones que proporcionan una relación señal/ruido (S/N) igual a 3 y 10 respectivamente. Los LODs variaron entre 0,82 ng/L para el DEHP y 2,82 µg/L para el BPF, mientras que los LOQs variaron entre 2,73 ng/L y 9,40 µg/L para los mismos analitos. Por ello, se puede afirmar que el método desarrollado puede ser utilizado con confianza para la determinación de los compuestos de interés a concentraciones bastante bajas.

Tabla 5. Datos de calibrado en la matriz para cada analito (A/A<sub>IS</sub>) y los respectivos LODs y LOQs

Datos de calibración (n = 6)						
Analito	Tr (min)	Rango de concentración (µg/L)	Ecuación de la curva	R <sup>2</sup>	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
<b>BPF</b>	1,12	(10 - 40)	$y = (34,59 \pm 0,89) \cdot 10^{-5} x - (1,08 \pm 0,11) \cdot 10^{-2}$	0,9980	2,82	9,40
<b>BPA</b>	2,22	(10 - 50)	$y = (4,89 \pm 0,20) \cdot 10^{-4} x - (1,32 \pm 0,30) \cdot 10^{-2}$	0,9948	2,54	8,45
<b>BPAF</b>	2,82	(2 - 50)	$y = (5,26 \pm 0,19) \cdot 10^{-3} x - (1,01 \pm 0,24) \cdot 10^{-1}$	0,9936	0,17	0,57
<b>DAP</b>	3,03	(7 - 37,5)	$y = (8,48 \pm 0,34) \cdot 10^{-4} x - (26,80 \pm 4,12) \cdot 10^{-3}$	0,9951	0,80	2,67
<b>CP</b>	3,45	(2 - 20)	$y = (1,42 \pm 0,08) \cdot 10^{-3} x - (2,07 \pm 0,05) \cdot 10^{-2}$	0,9910	0,34	1,14
<b>AP</b>	3,56	(7 - 30)	$y = (2,06 \pm 0,10) \cdot 10^{-4} x - (1,97 \pm 0,09) \cdot 10^{-3}$	0,9927	1,58	5,26
<b>HEXP</b>	3,80	(5 - 50)	$y = (6,92 \pm 0,18) \cdot 10^{-4} x - (1,72 \pm 0,25) \cdot 10^{-2}$	0,9973	0,81	2,70
<b>DBEP</b>	3,81	(5 - 37,5)	$y = (6,04 \pm 0,19) \cdot 10^{-4} x - (1,20 \pm 0,19) \cdot 10^{-2}$	0,9968	1,02	3,40
<b>OP2EO</b>	4,02	(0,2 - 50)	$y = (7,95 \pm 0,20) \cdot 10^{-2} x - (5,56 \pm 2,23) \cdot 10^{-1}$	0,9955	0,02	0,03
<b>TOP1EO</b>	4,07	(1 - 50)	$y = (6,65 \pm 0,35) \cdot 10^{-4} x + (6,91 \pm 0,05) \cdot 10^{-1}$	0,9917	3,42*	0,04
<b>OP</b>	4,18	(5 - 50)	$y = (10,11 \pm 0,37) \cdot 10^{-4} x - (2,60 \pm 0,51) \cdot 10^{-2}$	0,9947	0,77	2,56
<b>NP</b>	4,34	(5 - 50)	$y = (11,04 \pm 0,52) \cdot 10^{-4} x - (2,79 \pm 0,71) \cdot 10^{-2}$	0,9913	1,45	4,83
<b>NP1EO</b>	4,57	(0,2 - 50)	$y = (1,93 \pm 0,07) \cdot 10^{-4} x + (18,3 \pm 0,09) \cdot 10^{-2}$	0,9942	0,02	0,08
<b>DEHP</b>	4,81	(0,2 - 40)	$y = (2,51 \pm 0,10) \cdot 10^{-3} x + (6,81 \pm 0,87) \cdot 10^{-2}$	0,9937	0,82*	2,73*
<b>DEHA</b>	4,83	(0,5 - 50)	$y = (2,35 \pm 0,07) \cdot 10^{-3} x - (1,62 \pm 0,92) \cdot 10^{-2}$	0,9966	0,01	0,02
<b>DNOP</b>	4,91	(1 - 37,5)	$y = (1,23 \pm 0,06) \cdot 10^{-2} x - (2,93 \pm 6,72) \cdot 10^{-2}$	0,9934	0,28	0,94

\*ng/L

#### 4.3.2. Estudio de recuperaciones

La eficacia de la extracción se evaluó mediante el cálculo del porcentaje de recuperación al nivel de concentración de 25 µg/L. Para ello, se extrajeron 3 muestras enriquecidas antes de la extracción (n = 3), una réplica de la matriz (enriquecida después del proceso de extracción) y un blanco (con el fin de realizar las correcciones pertinentes en caso de que contuviera los analitos estudiados). Cada uno de estos se inyectó tres veces en el sistema y se procedió a los cálculos de recuperaciones absolutas para cada analito como se muestra a continuación (Ecuación 1).

$$\text{Recuperación (\%)} = \frac{\text{Área del analito en la muestra enriquecida}}{\text{Área del analito en la matriz}} \cdot 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

Tal y como se puede observar en la Tabla 6, las recuperaciones estuvieron comprendidas, para todos los analitos, entre 73,1 – 119,9%.

Tabla 6. Recuperaciones obtenidas al nivel de concentración 25 µg/L para cada analito.

<b>Analito</b>	<b>Concentración (µg/L)</b>	<b>Recuperación (n=5) % (RSD, %)</b>
<b>BPF</b>	25	73,1 (2,4)
<b>BPA</b>	25	98,5 (8,6)
<b>BPAF</b>	25	116,8 (3,9)
<b>DAP</b>	25	88,3 (4,6)
<b>CP</b>	25	119,9 (5,4)
<b>AP</b>	25	102,9 (8,0)
<b>HEXP</b>	25	115,8 (8,4)
<b>DBEP</b>	25	85,2 (4,1)
<b>OP2EO</b>	25	113,6 (6,1)
<b>TOP1EO</b>	25	98,2 (2,4)
<b>OP</b>	25	115,9 (4,8)
<b>NP</b>	25	116,5 (4,9)
<b>NP1EO</b>	25	84,7 (4,2)
<b>DEHP</b>	25	95,4 (5,6)
<b>DEHA</b>	25	98,3 (3,2)
<b>DNOP</b>	25	117,6 (6,1)

## 5. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos, se puede concluir que se ha desarrollado un método analítico rápido, simple, barato, robusto y medioambientalmente compatible para determinar de manera eficaz varios grupos de compuestos: APs, APEOs, BPs, PAEs y un adipato en muestras de vino. Con este fin se utilizó un procedimiento LLME con un DES natural formado por mentol y ácido octanóico (en proporción molar 1:1) (alineado con los principios de la Química Verde).

Se optimizaron todas las condiciones de separación en el equipo UHPLC – MS y los parámetros que afectan a la eficacia de la extracción, tales como el pH de la muestra, salinidad y volumen de muestra.

Se validó con éxito el método VA-LLME-UHPLC-MS desarrollado en términos de calibración en la matriz, sensibilidad y recuperaciones.

El método presenta valores bajos de LODs y LOQs que oscilan entre 0,82 ng/L – 2,82 µg/L y 2,73 ng/L – 9,40 µg/L, respectivamente. Los valores de  $R^2$  fueron todos superiores a 0,9910 y el estudio de recuperaciones puso de manifiesto que todos los analitos se extraían de manera eficaz con recuperaciones dentro del intervalo: 73,1 – 119,9%. Por ello, el método resulta adecuado para el análisis de diferentes muestras de vino blanco.

La investigación y estudio experimental hechos en este trabajo ponen de manifiesto la relevancia social y científica alrededor de estos compuestos y su influencia y presencia en los alimentos, así como en la exposición humana y sus efectos nocivos para la salud. Por esto, siguen siendo necesarios más estudios además de nuevos métodos analíticos que consigan determinar estos compuestos en diferentes matrices.

## **ABREVIATURAS**

APEOs: Etoxilatos de alquilfenol

APs: Alquilfenoles

BPs: Bisfenoles

CE: Comisión Europea

DES: Disolventes eutécticos profundos

ECD: Disruptor endocrino

ESI: Ionización por electrospray

HBA: Aceptor de enlace de hidrógeno

HBD: Donante de enlace de hidrógeno

IS: Estándar interno

LLME: Microextracción líquido – líquido dispersivo

LME: Límite de migración específico

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

MS: Espectrometría de masas

NaHDES: DES hidrofóbicos naturales

PAEs: Ésteres ácidos de ftalato

UE: Unión Europea

UHPLC: Cromatografía líquida de ultra – alta resolución

VA-LLME: Microextracción líquido – líquido dispersiva asistida por vórtex.



## BIBLIOGRAFÍA

1. de Araujo F, Bauerfeldt G, Cid Y. 2017. Nonylphenol: Properties, legislation, toxicity and determination. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 90.
2. Ying G-G, Williams B, Kookana R. 2002. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates—a review. *Environment International*. 28(3):215-226.
3. Bina B, Mohammadi F, Amin MM, Pourzamani HR, Yavari Z. 2018. Determination of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol compounds in various types of wastewater and their removal rates in different treatment processes in nine wastewater treatment plants of iran. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 26(1):183-190.
4. De Coster S, van Larebeke N. 2012. Endocrine-disrupting chemicals: Associated disorders and mechanisms of action. *Journal of environmental and public health*. 2012:713696-713696.
5. Eu. 2008. European union updated risk assessment report. Bisphenol a, cas no: 80-05-7. Institute for health and consumer protection, european chemicals bureau, european commission joint research centre, 3rd priority list, luxembourg: Office for official publications of the european communities. .
6. Reglamento (ue) 2018/213 de la comisión de 12 de febrero de 2018, sobre el uso de bisfenol a en los barnices y revestimientos destinados a entrar en contacto con los alimentos y por el que se modifica el reglamento (ue) nº 10/2011 por lo que respecta al uso de dicha sustancia en materiales plásticos en contacto con los alimentos. *Diario oficial de la unión europea*. 14/02/2018.
7. Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB, Melzer D. 2008. Association of urinary bisphenol a concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA*. 300(11):1303-1310.
8. Wang Y, Zhu H, Kannan K. 2019. A review of biomonitoring of phthalate exposures. *Toxics*. 7(2).
9. Yang J, Li Y, Wang Y, Ruan J, Zhang J, Sun C. 2015. Recent advances in analysis of phthalate esters in foods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 72:10-26.
10. Herrera-Herrera AV, Rodríguez-Ramos R, Santana-Mayor Á, Socas-Rodríguez B, Rodríguez-Delgado MÁ. 2022. Application of a liquid-liquid microextraction method based on a natural hydrophobic deep eutectic solvent for the extraction of plastic migrants from kombuchas. *Molecules*. 27(1).

11. Alla LNR, Monshi M, Siddiqua Z, Shields J, Alame K, Wahls A, Akemann C, Meyer D, Crofts EJ, Saad F et al. 2021. Detection of endocrine disrupting chemicals in danio rerio and daphnia pulex: Step-one, behavioral screen. *Chemosphere*. 271:129442.
12. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, Zoeller RT, Gore AC. 2009. Endocrine-disrupting chemicals: An endocrine society scientific statement. *Endocrine reviews*. 30(4):293-342.
13. Čelić M, Škrbić BD, Insa S, Živančev J, Gros M, Petrović M. 2020. Occurrence and assessment of environmental risks of endocrine disrupting compounds in drinking, surface and wastewaters in serbia. *Environmental Pollution*. 262:114344.
14. Fernández MF, Olea N. 2014. Disruptores endocrinos, ¿suficiente evidencia para actuar? *Gaceta Sanitaria*. 28(2):93-95.
15. Marty MS, Carney EW, Rowlands JC. 2010. Endocrine disruption: Historical perspectives and its impact on the future of toxicology testing. *Toxicological Sciences*. 120(suppl\_1):S93-S108.
16. Endocrine disruptive chemicals list. 2013. ECHA's webpage; [accessed 2022, 12/05/2022].
17. Reglamento (ue) nº 10/2011 de la comisión de 14 de enero de 2011, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. *Diario oficial de la unión europea*. 15/01/2011.
18. Zhang K, Wang Y, Li S, Zhu G. 2021. Air-assisted liquid-liquid microextraction based on the solidification of floating deep eutectic solvents for the simultaneous determination of bisphenols and polycyclic aromatic hydrocarbons in tea infusions via hplc. *Food Chemistry*. 348:129106.
19. Hou YC, Yao CF, Wu WZ. 2018. Deep eutectic solvents: Green solvents for separation applications. *Wuli Huaxue Xuebao/ Acta Physico - Chimica Sinica*. 34:873-885.