



## **Trabajo de Fin de Máster**

---

# **Determinación de contaminantes orgánicos en muestras agroalimentarias mediante técnicas miniaturizadas de extracción combinadas con técnicas de separación acopladas a espectrometría de masas**

*Sheila Mejías Ortega*

**Tutores:**

**Dr. Miguel Ángel Rodríguez Delgado**

**Dra. Bárbara Socas Rodríguez**



**D. MIGUEL ÁNGEL RODRÍGUEZ DELGADO, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA, Y DÑA. BÁRBARA SOCAS RODRÍGUEZ, INVESTIGADORA POSTDOCTORAL “JUAN DE LA CIERVA” DEL CSIC,**

**AUTORIZAN:**

La presentación y defensa del Trabajo de Fin de Máster titulado: “*Determinación de contaminantes orgánicos en muestras agroalimentarias mediante técnicas miniaturizadas de extracción combinadas con técnicas de separación acopladas a espectrometría de masas*” realizado por la Graduada en Química Dña. Sheila Mejías Ortega, durante el curso académico 2019-2020 en los laboratorios del Área de Química Analítica del Departamento de Química.

Y para que así conste, firmamos la presente en San Cristóbal de La Laguna, a 2 de julio de 2020.

Fdo: Dr. Miguel Ángel Rodríguez Delgado

Fdo: Dra. Bárbara Socas Rodríguez



## **Agradecimientos**

*A mis tutores, Bárbara y Miguel Ángel, por acogerme desde el primer momento, por integrarme en el equipo con cariño e ilusión, y animarme siempre a seguir adelante, a pesar de las dificultades que pudieran surgir.*

*A mis compañeras del grado en Química, porque aunque nos separáramos en el máster siempre han estado ahí. Gracias por hacer más amena la época universitaria.*

*A David, por el camino que hemos recorrido juntos y el que nos queda por recorrer.*

*Y, por supuesto, a mi madre, Yurena, mi mayor pilar en la vida. Has estado en cada caída y deseo que estés en cada victoria, te quiero.*

***Sheila Mejías Ortega.***



## **Resumen**

En este trabajo se propone una metodología analítica basada en el método QuEChERS y la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas para la determinación de un grupo de disruptores endocrinos, incluyendo bisfenoles y alquilfenoles, en muestras de zumos.

## **Abstract**

In this work, an analytical methodology based on QuEChERS method and gas chromatography tandem mass spectrometry is proposed for the determination of endocrine disruptors, including bisphenols and alkylphenols, in juice samples.



## Contenido

1.	Introducción .....	1
1.1	Disruptor endocrino: definición y efectos sobre la salud humana.....	1
1.2	Alquilfenoles y bisfenoles .....	1
1.3	Alquilfenoles y bisfenoles en alimentos.....	2
1.4	Marco legislativo .....	2
2.	Parte experimental.....	3
2.1	Patrones, disolventes, reactivos y disoluciones .....	3
2.2	Material.....	3
2.3	Equipos .....	4
2.3.1	Instrumentos .....	4
2.3.2	Aparatos .....	4
2.3.3	Programas informáticos.....	4
2.4	Procedimiento experimental .....	4
2.4.1	Limpieza del material.....	4
2.4.2	Preparación de disoluciones .....	5
2.4.3	Optimización de las condiciones del espectrómetro de masas.....	5
2.4.4	Optimización de las condiciones del cromatógrafo de gases.....	7
2.4.5	Validación instrumental .....	7
2.4.6	Pretratamiento de la muestra .....	7
2.4.7	Validación de la metodología desarrollada .....	8
3.	Resultados y discusión .....	9
3.1	Propiedades de los compuestos estudiados .....	9
3.2	Optimización de las condiciones del espectrómetro de masas .....	13
3.3	Optimización de las condiciones del cromatógrafo de gases .....	15
3.4	Validación instrumental.....	16
3.5	Pretratamiento de la muestra .....	16

3.6	Validación de la metodología desarrollada .....	19
4.	Conclusiones .....	20
5.	Bibliografía.....	21

## 1. Introducción

### 1.1 Disruptor endocrino: definición y efectos sobre la salud humana

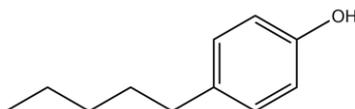
Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Programa Internacional sobre Seguridad Química (IPCS), un **disruptor endocrino** se define como una sustancia o mezcla de sustancias exógenas que altera la función del sistema endocrino y, consecuentemente, causa efectos adversos en la salud de un organismo intacto o su progenie o (sub)poblaciones.

Algunos compuestos orgánicos pueden afectar a la regulación del sistema hormonal al ser capaces de unirse a los receptores de estrógenos. Un ejemplo de ellos son los alquilfenoles. Estos han demostrado tener efectos tóxicos en peces, animales invertebrados y mamíferos. Además, también han sido asociados a un aumento de la incidencia de cáncer de mama y a una disminución del recuento de espermatozoides en humanos<sup>1</sup>. Las principales vías de exposición a estas sustancias son la inhalación, la ingestión de alimentos contaminados y la absorción dérmica<sup>2</sup>.

Por otra parte, diversos estudios en humanos han demostrado que los bisfenoles, como el bisfenol A, son también disruptores endocrinos capaces de provocar trastornos de salud no deseados<sup>3</sup>, entre los que se encuentran problemas en el desarrollo y la reproducción<sup>4</sup>.

### 1.2 Alquilfenoles y bisfenoles

Los alquilfenoles son un grupo de sustancias orgánicas (*Ilustración 1*) consideradas contaminantes ambientales persistentes y clasificadas como disruptores endocrinos<sup>5</sup>.

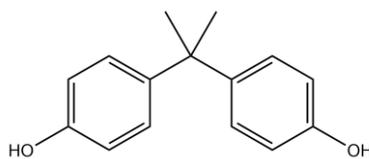


*Ilustración 1. Estructura química del 4-n-amilfenol.*

Derivan de la degradación de alquilfenoles etoxilados, surfactantes sintéticos no iónicos empleados habitualmente en una amplia variedad de detergentes, pinturas, lubricantes, resinas y plaguicidas<sup>1</sup>. También se usan en resinas epoxi en plásticos y cauchos como, por ejemplo, en tuberías, a partir de las cuales pueden ser liberados al agua y al medioambiente<sup>6</sup>. De ahí que algunos alimentos puedan contener estos compuestos debido a la contaminación de las materias primas, al proceso de producción o a la migración desde los envases que los contienen<sup>7</sup>.

Por su parte, los bisfenoles son un grupo de compuestos orgánicos que presentan dos grupos fenoles, entre los que destaca el bisfenol A (*Ilustración 2*), que se toma como referencia. El bisfenol A se usa en la producción de resinas fenólicas y epoxi y plásticos de policarbonato, entre otros. Estas resinas suelen usarse

como cubierta protectora en envases alimentarios como las latas, donde puede producirse la migración hacia los alimentos<sup>8</sup>.



*Ilustración 2. Estructura química del bisfenol A.*

### 1.3 Alquilfenoles y bisfenoles en alimentos

El análisis de estos compuestos en muestras alimentarias se ha llevado a cabo utilizando técnicas cromatográficas, tanto la cromatografía de líquidos (LC) como la cromatografía de gases (GC) acopladas a detectores de espectrometría de masas (MS)<sup>9</sup>.

Los alquilfenoles han sido mayormente estudiados en muestras medioambientales (aguas de río<sup>10</sup>, lodos de depuradoras<sup>11</sup>, etc.) y en muestras biológicas de origen humano (tejidos<sup>12</sup>, orina<sup>13</sup> o líquido seminal<sup>14</sup>, entre otros). Sin embargo, aunque en menor medida, también se han estudiado en alimentos como aguas minerales, pescados, mariscos y comidas para bebés. La presencia de estos compuestos en alimentos puede estar asociada a su migración desde áreas medioambientales contaminadas, tales como ríos, mares y océanos<sup>1</sup>.

Por otra parte, la presencia de los alquilfenoles en alimentos también puede deberse a su migración desde los materiales empleados en la industria alimentaria, siendo especialmente importante el estudio de esta migración en alimentos destinados a niños menores de un año, ya que los efectos perniciosos de estos compuestos son mucho mayores para la población infantil<sup>7</sup>.

En lo que respecta a los bisfenoles, estos han sido identificados en vegetales enlatados, bebidas en lata, fórmulas infantiles, carnes y pescados enlatados, café y salchichas, entre otros<sup>8</sup>. También han sido especialmente estudiados en alimentos infantiles como fórmulas infantiles a base de leche, soja e hipoalergénicas<sup>15</sup>.

### 1.4 Marco legislativo

Los disruptores endocrinos pueden actuar en concentraciones extremadamente bajas y, por lo tanto, incluso una dosis pequeña puede producir efectos perjudiciales<sup>16</sup>.

En el caso del bisfenol A se ha establecido un límite de migración específica de 0,05 mg/kg de alimento para envases alimentarios, y se ha prohibido su uso en tazas y biberones destinados a lactantes y niños de corta edad<sup>17</sup>.

## 2. Parte experimental

### 2.1 Patrones, disolventes, reactivos y disoluciones

- Patrones empleados para la preparación de las disoluciones madre (todos de la casa comercial Sigma Aldrich):
  1. 4-cumilfenol (4-CP, 99%).
  2. 4-n-nonilfenol (4-n-NP, 99,9%).
  3. 4-tert-octilfenol (4-t-OP, 98,6%).
  4. 4-cloro-3-metilfenol (4-Cl-3-MP, 99,7%).
  5. 4-tert-amilfenol (4-t-AP, 99,9%).
  6. 4-n-octilfenol (4-n-OP, 99,5%).
  7. Hidroxitolueno butilado (BHT, 99%).
  8. 2-fenilfenol (2-PP, 99%).
  9. 4-n-hexilfenol (4-n-hp, 98%).
  10. 4-sec-butilfenol (4-sec-BP, 98%).
  11. 4-n-amilfenol (4-n-AP, 98,7%).
  12. 4-n-heptilfenol (4-n-HP).
  13. 4-tert-butilfenol (4-t-BP, 99,9%).
  14. Bisfenol A (BPA, 99,8%).
  15. Bisfenol AF (BPAF, 99%).
  16. Bisfenol A-D<sub>16</sub> (BPA-d<sub>16</sub>, 98%).
  17. 5-bromo-2-cloro anisol (5-Br-2-Cla, 97%).
- Agua Milli-Q (conductividad de 18,2  $\mu\text{S}/\text{cm}$  a 25 °C).
- Acetonitrilo grado LC-MS (Merck).
- Metanol grado LC-MS (Merck).
- Ciclohexano grado GC-MS (Merck).

### 2.2 Material

El material utilizado consta de:

- Guantes de nitrilo (VWR International).
- Vasos de precipitado de 50, 100 y 250 mL (Afora, Schott, Simax y Labbox).
- Matraces aforados de 5 y 10 mL clase A con tapa de vidrio (Afora).
- Pipetas Pasteur (VWR International).
- Puntas de plástico desechables para micropipetas de 2-20  $\mu\text{L}$ , 10-100  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$  y 100-1000  $\mu\text{L}$  (Diamond, Gilson, Brand).

- Columnas capilares HP-5MS (5% fenil - 95% metilsiloxano) de 15 metros de largo, 250  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y 0,25  $\mu\text{m}$  de espesor (Agilent Technologies).
- Microjeringa de 10  $\mu\text{L}$  de cromatografía (Hamilton).

## 2.3 Equipos

### 2.3.1 Instrumentos

- **Cromatógrafo de gases** de la marca comercial Agilent Technologies, modelo GC 7890B, acoplado a un espectrómetro de masas modelo 7000C con un sistema de ionización de impacto electrónico (EI), un analizador de triple cuadrupolo (QqQ) y un muestreador automático CombiPal.
- **Balanza analítica** de la marca comercial Sartorius, modelo AW-224, de 0,1 mg de precisión y 220 g de capacidad máxima.
- **Micropipetas** de la marca comercial Transferpette, de diferentes capacidades (2-20  $\mu\text{L}$ , 10-100  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$  y 100-1000  $\mu\text{L}$ ).
- **Micropipeta** de 0,2-2 mL con adaptador para pipeta Pasteur (Socorex).

### 2.3.2 Aparatos

- **Baño de ultrasonidos**, modelos 3510E-MT (Branson) y Ultrasons-512 (Selecta).
- **Sistema de purificación** de agua Milli-Q Gradient A10 (Millipore).

### 2.3.3 Programas informáticos

- **GCQQQ/Enhanced MassHunter** (Agilent Technologies). Empleado para el control del sistema de separación y detección, así como para el tratamiento de datos.
- **Microsoft Excel 2016**. Empleado para el tratamiento de datos.

## 2.4 Procedimiento experimental

### 2.4.1 Limpieza del material

El material de vidrio volumétrico se lavó inicialmente con agua del grifo y jabón, luego se sumergió en una disolución de NOCHROMIX<sup>®</sup> en ácido sulfúrico durante 24 horas y se enjuagó varias veces con agua Milli-Q y metanol grado LC-MS. Por último, se dejó secar a temperatura ambiente.

El material de vidrio no volumétrico se lavó con agua del grifo y jabón y luego se enjuagó con agua Milli-Q. Tras ello, se colocó en la estufa a 100 °C hasta que se secó completamente y se pasó a una mufla a 550 °C durante 5 horas.

### 2.4.2 Preparación de disoluciones

#### **Disoluciones madre**

Para la preparación de las disoluciones patrón se pesaron 5 mg del producto comercial en un matraz aforado de 10 mL, se diluyó en metanol y se sometió a ultrasonificación en un baño de ultrasonidos para garantizar la disolución del producto. Una vez homogeneizada, se trasvasó a un vial opaco que se guardó en el congelador.

#### **Disoluciones estándar**

A partir de las disoluciones madre se prepararon diluciones de trabajo para inyectar en el equipo GC-MS a una concentración de 1 mg/L. Para ello, se tomó el correspondiente volumen de la disolución madre, se trasvasó a un vial, se secó con una corriente de aire seco y se añadió 1 mL de ciclohexano calidad GC-MS para su reconstitución. A continuación, se prepararon disoluciones conteniendo todos los compuestos a una concentración de 2 mg/L en matraces aforados de 5 mL.

Por otra parte, también se prepararon disoluciones individuales de los estándares internos (ISs) a una concentración de 2 mg/L en matraces aforados de 5 mL.

#### **Disoluciones de la curva de calibrado**

Para la curva de calibrado se inyectaron disoluciones de los analitos a 10 niveles diferentes de concentración, desde 1 µg/L hasta 250 µg/L, utilizando ciclohexano como disolvente (*Tabla 1*).

*Tabla 1. Niveles de concentración preparados para la curva de calibrado.*

Nivel	Concentración (µg/L)
1	1,0
2	2,5
3	5,0
4	7,5
5	10
6	50
7	100
8	150
9	200
10	250

### 2.4.3 Optimización de las condiciones del espectrómetro de masas

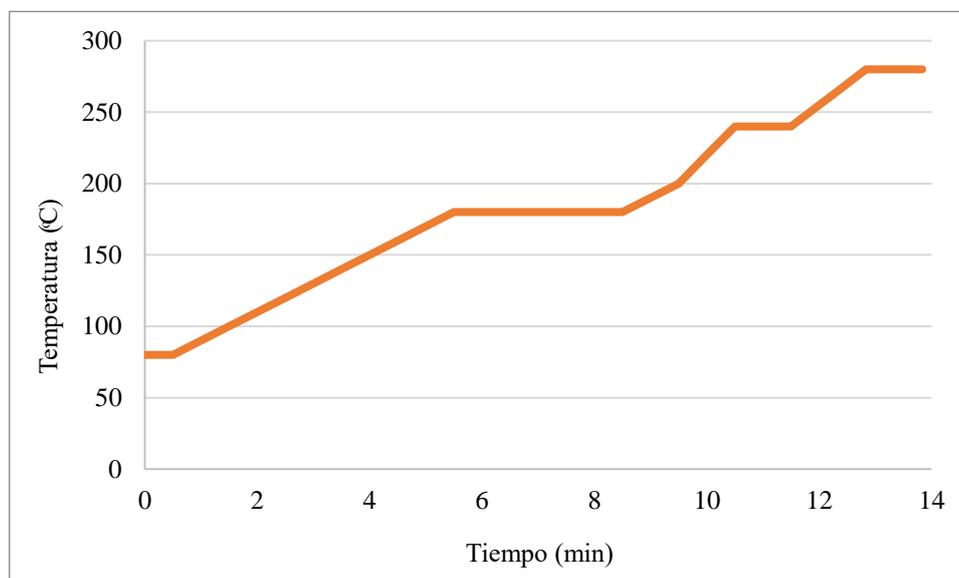
Antes de optimizar las condiciones del espectrómetro de masas, para trabajar en modo de monitorización de reacciones múltiples (MRM), se deben determinar los iones precursores y los iones producto de cada analito.

## Parte experimental

Para determinar los iones precursores se empleó el **modo Full Scan**, que realizó un barrido de masas dentro de un determinado intervalo de relaciones masa/carga ( $m/z$ ). Para ello se inyectaron las disoluciones estándar de cada analito individualmente (2  $\mu\text{L}$ ) y se establecieron las condiciones instrumentales<sup>7</sup> que vienen resumidas en la *Tabla 2* y en la *Ilustración 3*.

*Tabla 2. Condiciones instrumentales del GC-MS.*

<b>Temperatura del inyector</b>
240 °C
<b>Temperatura de la línea de transferencia</b>
250 °C
<b>Temperatura de la fuente</b>
230 °C
<b>Temperatura de los cuadrupolos 1 y 2</b>
150 °C
<b>Voltaje de la fuente de ionización</b>
70 eV



*Ilustración 3. Programa de temperatura.*

Por otra parte, para determinar los iones producto de los analitos se empleó el **modo Product Ion**. En este modo solo pasa un ion con una determinada  $m/z$  (que será el ion precursor previamente establecido) desde el primer cuadrupolo hacia la celda, donde colisiona con el gas de colisión, generando su ruptura, permitiendo observar su espectro de fragmentación y seleccionar las transiciones más intensas para la determinación de los analitos.

## Energía de colisión

Se trata de la energía suministrada en la celda de colisión para generar la fragmentación del ion precursor. Si esta energía es demasiado baja, la molécula no se fragmentará lo suficiente, impidiendo ver los iones que esta genera. Por otra parte, si se suministra un exceso de energía el ion molecular se romperá en mayor medida, dando lugar a iones muy sencillos con los que es inviable tratar de diferenciar entre diferentes compuestos. Por ello se considera necesario optimizar este parámetro, pues se debe encontrar una energía adecuada para fragmentar la molécula y poder observar los iones característicos de ella. El rango de energías de colisión<sup>18</sup> evaluado se estableció desde 10 hasta 25 V, en intervalos de 5 unidades.

## Dwell

El Dwell es el parámetro que establece el tiempo empleado para medir una transición (un ion). Si el Dwell es muy bajo, el tiempo de análisis se alargará sin ofrecer una mayor resolución del pico. Por el contrario, si el Dwell es muy elevado, el pico no tendrá una resolución aceptable para poder trabajar con él. En este caso se inyectó el mix de los analitos y se establecieron los valores de Dwell, que fueron 50 y 200 ms.

### 2.4.4 Optimización de las condiciones del cromatógrafo de gases

#### Programa de temperatura

Con el objetivo de conseguir la mejor separación cromatográfica de los analitos seleccionados con una resolución y selectividad adecuada, así como obtener picos cromatográficos aceptables en términos de eficacia, se evaluaron distintos programas de temperatura. Dichos programas fueron desde los 80 hasta los 280 °C.

*\*Nota aclaratoria respecto al desarrollo del presente trabajo: debido a la crisis sanitaria provocada por el coronavirus los siguientes apartados no se pudieron realizar de forma presencial en el laboratorio.*

### 2.4.5 Validación instrumental

Tras la optimización de las condiciones de separación y detección, se debe llevar a cabo la validación de la metodología analítica. Para realizar la validación instrumental se deben calcular una serie de parámetros que garantizan la calidad del método analítico, que son: sensibilidad (LOD (límite de detección), LOQ (límite de cuantificación)), rango de linealidad y repetibilidad instrumental.

### 2.4.6 Pretratamiento de la muestra

El método QuEChERS (acrónimo inglés de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe*) permite la extracción múltiple de contaminantes orgánicos presentes en alimentos. Consiste en una extracción líquido-líquido (LLE) con acetonitrilo utilizando NaCl y MgSO<sub>4</sub> para generar un efecto “*salting out*”, favoreciendo

así la separación de las fases, aunque otras sales también han sido utilizadas con este objetivo. Luego, el sobrenadante se somete a un procedimiento de limpieza mediante una extracción en fase sólida dispersiva con amina primaria secundaria (para eliminar los compuestos interferentes polares) y  $\text{MgSO}_4$  (para eliminar el agua). También se pueden usar otros adsorbentes como el carbón negro grafitizado (para eliminar pigmentos como los carotenoides) u octadecylsilano ( $\text{C}_{18}$ ) (para eliminar lípidos)<sup>19</sup>.

#### 2.4.7 Validación de la metodología desarrollada

##### **Evaluación del efecto matriz**

Para evaluar el efecto matriz se deben realizar dos calibrados, uno en el disolvente y otro en la matriz que se vaya a evaluar, preparando, en ambos casos, 10 niveles de concentración e inyectando 3 réplicas de cada uno de ellos<sup>20</sup>.

##### **Calibrado en la matriz**

Este calibrado implica la adición de diferentes volúmenes de una disolución patrón a varias alícuotas de la matriz con la que vamos a trabajar y en la que previamente se ha confirmado que no existen los analitos de interés. Los niveles de concentración del calibrado serían los mismos que para el calibrado instrumental.

##### **Estudio de recuperaciones**

Para el estudio de recuperaciones se deben enriquecer cinco alícuotas de la matriz a 2 niveles de concentración al inicio del procedimiento y someterlas al procedimiento de extracción y análisis desarrollado<sup>20</sup>.

##### **Sensibilidad de la metodología**

La sensibilidad se define como la capacidad de diferenciar pequeñas variaciones en la concentración del analito<sup>21</sup>. Se puede establecer en términos de LOD y LOQ teniendo en cuenta la influencia de la muestra.

Debido al marco legislativo aplicable a estos compuestos<sup>16</sup> se necesita que el método de análisis sea lo más sensible posible, permitiendo detectarlos a bajas concentraciones.

### 3. Resultados y discusión

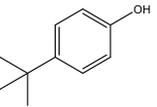
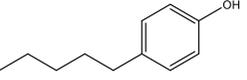
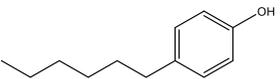
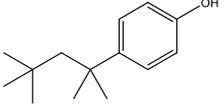
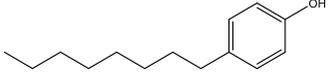
#### 3.1 Propiedades de los compuestos estudiados

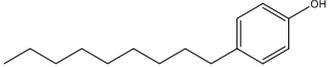
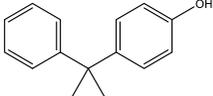
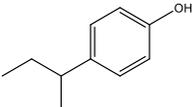
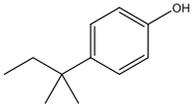
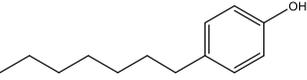
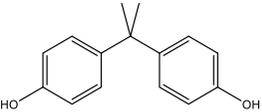
En la *Tabla 3* aparecen las principales características de los analitos seleccionados.

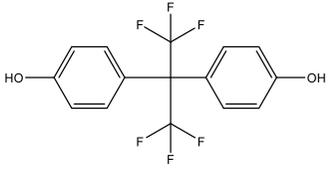
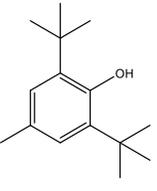
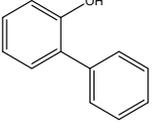
El coeficiente de reparto octanol-agua ( $K_{ow}$ ) es un indicador general de la tendencia de la molécula a formar parte de la fase orgánica. Cuanto mayor sea el  $\log K_{ow}$ , mayor afinidad tendrá la molécula por los tejidos grasos animales y mayor probabilidad de bioacumularse. La mayoría de los analitos de estudio presentan un valor elevado de  $\log K_{ow}$ , que aumenta a medida que aumenta la longitud de la cadena lateral<sup>22</sup>.

Por otra parte, la presión de vapor de los analitos ofrece información sobre su volatilidad, factor clave en el análisis mediante GC. Todos los analitos presentan presiones de vapor relativamente bajas, lo que se traduce en una baja volatilidad. A pesar de ello, y de que en la mayoría de los casos en los que estos analitos se determinan mediante GC se llevan a cabo procesos de derivatización<sup>23</sup> para generar fenoles menos polares y más volátiles, existen trabajos donde se han analizado sin necesidad de derivatizar<sup>6, 18, 24</sup>. Por este motivo, y con el objetivo de disminuir la complejidad de la metodología, en este trabajo se decidió trabajar sin derivatizar.

Tabla 3. Principales características de los analitos de estudio.

Analito	Estructura <sup>(a)</sup>	Fórmula molecular <sup>(a)</sup>	Masa molecular (g/mol) <sup>(a)</sup>	Solubilidad en agua (g/L, 25 °C)	Presión de vapor (mmHg, 25 °C)	log K <sub>ow</sub>	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)
4-t-BP		C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	150,22	6,07·10 <sup>-1</sup> <sup>(b)</sup>	9,19·10 <sup>-3</sup> <sup>(b)</sup>	3,31 <sup>(b)</sup>	98 <sup>(b)</sup>	237,0 <sup>(b)</sup>
4-n-AP		C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O	164,25	8,48·10 <sup>-2</sup> <sup>(c)</sup>	1,11·10 <sup>-2</sup> <sup>(c)</sup>	4,06 <sup>(b)</sup>	23,0 <sup>(b)</sup>	250,5 <sup>(b)</sup>
4-n-hp		C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O	178,28	2,97·10 <sup>-2</sup> <sup>(c)</sup>	7,23·10 <sup>-4</sup> <sup>(c)</sup>	4,52 <sup>(c)</sup>	70,2 <sup>(c)</sup>	281,13 <sup>(c)</sup>
4-t-OP		C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	206,33	5,11·10 <sup>-3</sup> <sup>(b)</sup>	4,78·10 <sup>-4</sup> <sup>(b)</sup>	5,25 <sup>(b)</sup>	84,5 <sup>(b)</sup>	279,0 <sup>(b)</sup>
4-n-OP		C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> O	206,33	3,11·10 <sup>-3</sup> <sup>(c)</sup>	9,76·10 <sup>-5</sup> <sup>(c)</sup>	5,50 <sup>(c)</sup>	44,5 <sup>(b)</sup>	280,0 <sup>(b)</sup>

Analito	Estructura <sup>(a)</sup>	Fórmula molecular <sup>(a)</sup>	Masa molecular (g/mol) <sup>(a)</sup>	Solubilidad en agua (g/L, 25 °C)	Presión de vapor (mmHg, 25 °C)	log K <sub>ow</sub>	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)
4-n-NP		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220,36	7,00·10 <sup>-3</sup> (b)	8,18·10 <sup>-4</sup> (b)	5,76 (b)	42,0 (b)	317,0 (b)
4-CP		C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O	212,90	4,33·10 <sup>-2</sup> (c)	2,50·10 <sup>-5</sup> (b)	4,12 (b)	74,5 (b)	335,0 (b)
4-sec-BP		C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	150,22	1,50 (b)	4,00·10 <sup>-2</sup> (b)	3,08 (b)	61,5 (b)	241,0 (b)
4-t-AP		C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O	164,25	1,68 (b)	2,00·10 <sup>-3</sup> (b)	4,03 (b)	95,0 (b)	262,5 (b)
4-n-HP		C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> O	192,30	9,65·10 <sup>-3</sup> (c)	2,79·10 <sup>-4</sup> (c)	5,01 (c)	27,0 (c)	156,0 (c)
BPA		C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	228,29	3,00·10 <sup>-1</sup> (b)	4,00·10 <sup>-8</sup> (b)	3,32 (b)	160 (b)	360,5 (b)

Analito	Estructura <sup>(a)</sup>	Fórmula molecular <sup>(a)</sup>	Masa molecular (g/mol) <sup>(a)</sup>	Solubilidad en agua (g/L, 25 °C)	Presión de vapor (mmHg, 25 °C)	log K <sub>ow</sub>	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)
BPAF		C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> F <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	336,23	4,30·10 <sup>-3</sup> (c)	5,40·10 <sup>-7</sup> (b)	4,47 (b)	162 (b)	400,0 (b)
BHT		C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	220,36	6,00·10 <sup>-4</sup> (b)	5,16·10 <sup>-3</sup> (b)	5,10 (b)	71,0 (b)	265,0 (b)
2-PP		C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> O	170,21	7,00·10 <sup>-1</sup> (b)	2,00·10 <sup>-3</sup> (b)	3,09 (b)	59,0 (b)	286,0 (b)

<sup>(a)</sup> Obtenido de ChemDraw (versión 18.0, PerkinElmer Inc.); <sup>(b)</sup> Obtenido de [25]; <sup>(c)</sup> Obtenido de [26].

### 3.2 Optimización de las condiciones del espectrómetro de masas

Inicialmente se obtuvieron los iones precursores para cada analito aplicando el modo Full Scan. Posteriormente, tras llevar a cabo la fragmentación, se seleccionó la transición más intensa para cada uno de ellos, con fines cuantitativos, y la segunda con la finalidad de confirmar su identificación.

#### Energía de colisión

La elección entre una energía de colisión u otra se determina mediante el estudio de los espectros de fragmentación generados. En ellos se busca que la intensidad de la señal de los iones precursores sea menor que la de los iones producto, lo que se traduce en que la fragmentación ha ocurrido de forma satisfactoria. Si la intensidad de la señal de los iones de partida es muy superior a la de sus fragmentos significa que la energía aplicada es insuficiente, lo que impediría identificar los iones generados de manera adecuada en modo MRM. En la *Tabla 4* vienen reflejadas las energías de colisión que mejor resultado ofrecieron en cada caso, así como las transiciones seleccionadas y los tiempos de retención ( $t_R$ ) para cada analito.

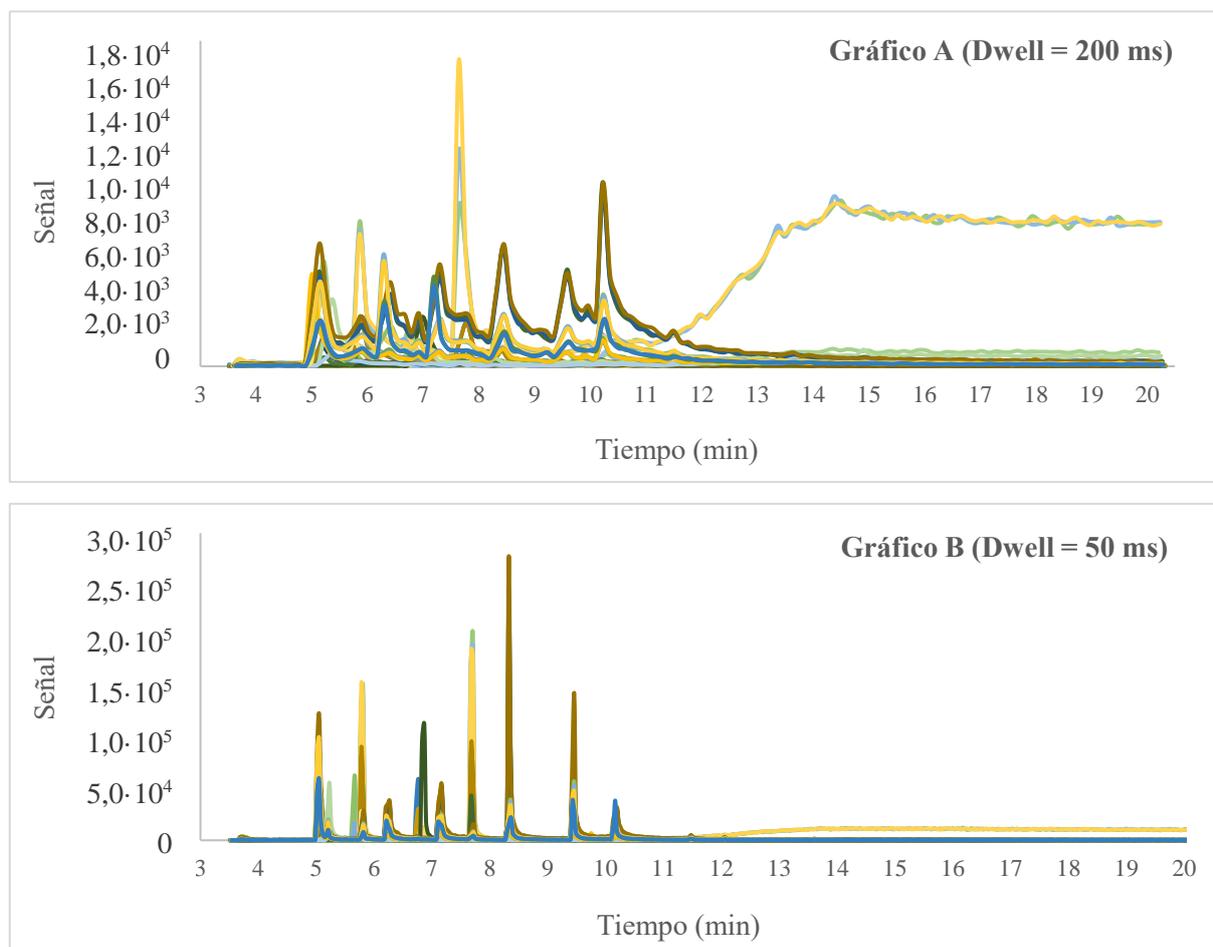
*Tabla 4. Energías de colisión seleccionadas para cada analito y sus correspondientes transiciones.*

Orden	Analito	$t_R$ (min)	1ª transición	$E_{colisión}$ (V)	2ª transición	$E_{colisión}$ (V)
1	4-Cl-3-MP	5,002	142 → 77	25	142 → 107	10
2	4-t-BP	5,021	135 → 107	10	135 → 77	25
3	4-sec-BP	5,161	121 → 77	25	121 → 91	25
4	5-Br-2-Cl <sub>a</sub> (IS)	5,607	222 → 179	25	222 → 207	10
5	4-t-AP	5,733	135 → 107	10	135 → 77	25
6	4-n-AP	5,739	107 → 77	10	107 → 79	10
7	BHT	6,710	205 → 57	10	205 → 105	25
8	2-PP	6,797	170 → 141	10	170 → 169	10
9	4-n-hp	7,078	107 → 77	10	107 → 79	10
10	4-t-OP	7,614	135 → 107	10	135 → 95	10
11	4-n-HP	8,259	107 → 77	25	107 → 51	25
12	4-n-OP	9,391	107 → 77	25	107 → 79	10
13	4-n-NP	10,102	107 → 77	10	107 → 79	10
14	4-CP	10,112	197 → 103	25	197 → 91	25
15	BPAF	11,235	267 → 199	15	267 → 201	25
16	BPA-d <sub>16</sub> (IS)	11,983	224 → 125	10	224 → 97	25
17	BPA	12,018	213 → 91	25	213 → 119	15

#### Dwell

Los picos de los cromatogramas MRM obtenidos tras aplicar un Dwell de 200 ms presentan una eficacia y resolución muy bajas con las que es inviable trabajar. Sin embargo, los cromatogramas MRM obtenidos con un Dwell de 50 ms presentan picos cromatográficos bastante aceptables, con una buena intensidad y con

adecuada eficacia. En la *Ilustración 4* se puede observar la comparación de cromatogramas obtenidos con ambos valores de Dwell.

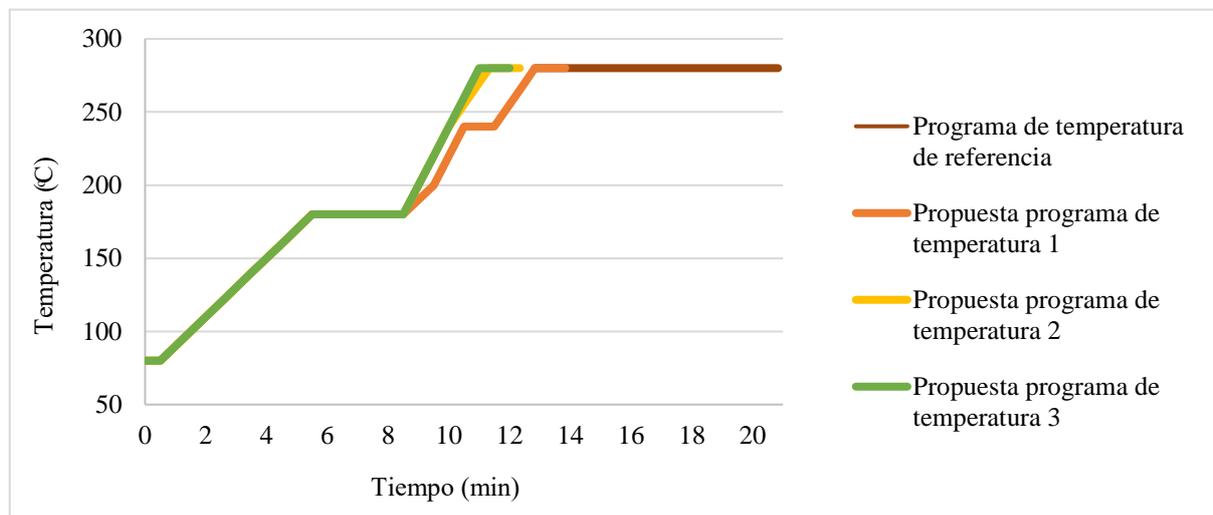


*Ilustración 4. Gráfico A) Cromatograma MRM del mix de analitos para un Dwell de 200 ms. Gráfico B) Cromatograma MRM del mix de analitos para un Dwell de 50 ms.*

## 3.3 Optimización de las condiciones del cromatógrafo de gases

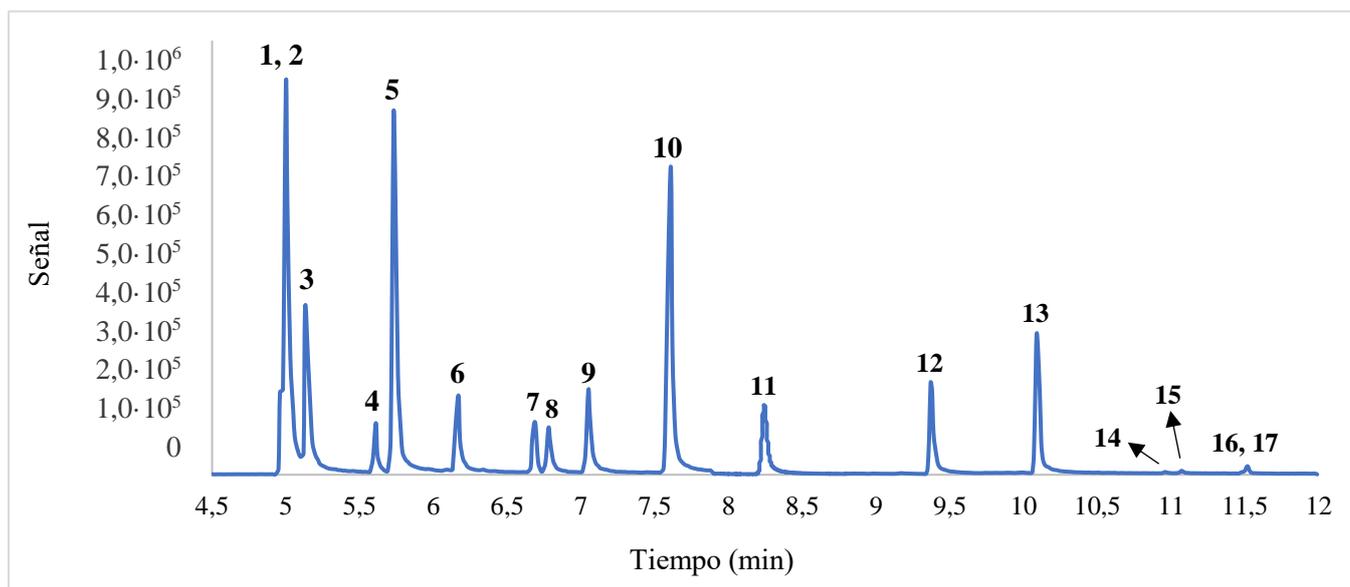
**Programa de temperatura**

Los programas de temperatura propuestos para el análisis simultáneo de alquilfenoles y bisfenoles vienen reflejados en la *Ilustración 5*.



*Ilustración 5. Programas de temperatura propuestos para el análisis simultáneo de alquilfenoles y bisfenoles frente al programa de temperatura de referencia<sup>7</sup>.*

De los programas propuestos el que mejor resultado ofreció fue el programa 3, ya que proporciona picos cromatográficos con altas eficacias y buenas resoluciones. Además, el tiempo de análisis se reduce considerablemente, de 18 hasta 12 min, tal y como se muestra en el siguiente cromatograma (*Ilustración 6*).



*Ilustración 6. Cromatograma obtenido con el programa de temperatura 3.*

### 3.4 Validación instrumental

Los parámetros necesarios para la validación instrumental son los detallados a continuación:

#### **Límite de detección (LOD)**

El LOD se establece como la mínima concentración capaz de producir una señal significativamente distinta de la señal ofrecida por el blanco para un nivel de confianza dado<sup>27</sup>. Se trata de una concentración calculada para dar una relación señal/ruido (S/N) de 3. Para calcularlo, se debe inyectar varias veces un nivel bajo de concentración de un analito y calcular la S/N<sup>20</sup>. Una vez se tenga calculada dicha relación, se determina la concentración correspondiente para una S/N de 3.

#### **Límite de cuantificación (LOQ)**

El LOQ se define como la mínima concentración a la que se puede cuantificar. Se trata de una concentración que proporciona una S/N de 10, y se calcula de la misma manera que el LOD<sup>20</sup>.

#### **Rango de linealidad**

El rango de linealidad es aquel en el que la respuesta instrumental es linealmente proporcional a la concentración del analito. La linealidad se evalúa mediante el coeficiente de correlación ( $R^2$ ) de la curva de calibrado. Para que un método analítico sea útil debe tener un intervalo lineal de, al menos, dos órdenes de magnitud<sup>21</sup>.

#### **Repetibilidad instrumental**

La repetibilidad instrumental evalúa la precisión de las áreas y de los tiempos de retención, que se obtienen al inyectar varias veces una misma disolución dentro de un mismo día (repetibilidad intradía) y en distintos días (repetibilidad interdía). La repetibilidad se considera adecuada cuando los valores de desviación estándar relativa (RSD) son inferiores al 10% en el caso de las áreas y 5% para los tiempos de retención.

En el caso particular de este trabajo también se utilizarían ISs que permitirían solventar posibles problemas de repetibilidad, en el caso de que los hubiese, en las determinaciones realizadas.

### 3.5 Pretratamiento de la muestra

En la *Tabla 5* se presenta un resumen de los pretratamientos usados por otros grupos de investigación para determinar alquiflenoles y bisfenoles en diversas muestras alimentarias.

Tabla 5. Comparación de diferentes pretratamientos en muestras alimentarias para la determinación de alquilfenoles y bisfenoles mediante GC-MS.

Analitos	Muestra (cantidad)	Método de extracción	Recuperación (%)	LOD	LOQ	Observaciones	Cita
4-t-BP 4-n-AP 4-t-OP 4-n-hp 4-n-OP 4-n-NP	Fórmulas y cereales infantiles (0,5 g)	m- $\mu$ -dSPE	89,9 – 121,4	400 – 1700 ng/kg	1400 – 5700 ng/kg	- Antes de la extracción se sometió a una hidrólisis ácida con ácido tricloroacético - Derivatización con anhídrido acético	[7]
4-t-OP 4-n-NP BPA	Pescados y mariscos (2 g)	SPE asistida por ultrasonidos	84 - 105	0,5 – 0,6 ng/kg	-	Derivatización con BSTFA + 1% TMCS	[1]
4-t-AP 4-CP 4-n-OP	Agua (1 mL)	SPE	83,2 – 97,8	16 – 33 ng/L	53 – 110 ng/L	-	[24]
4-n-OP 4-n-NP BPA	Comida casera envasada (1 g)	QuEChERS	36 - 130	0.35 – 14.37 pg/kg	-	-	[19]
4-n-NP 4-t-BP BPA	Verduras (2 g)	dSPE asistida por ultrasonidos	74 – 104	100 – 200 ng/kg	200 – 800 ng/kg	Derivatización con BSTFA + 1% TMCS	[28]

Analitos	Muestra (cantidad)	Método de extracción	Recuperación (%)	LOD	LOQ	Observaciones	Cita
4-n-OP 4-n-NP	Aceites vegetales (0,5)	LLE	81,4 – 98,6	1,2 – 3,0 µg/kg	-	-	[18]
4-n-OP 4-n-NP 2-PP BPA	Cereales (2 g)	SPE	82 - 105	0,4 – 0,6 ng/kg	-	- Extracción asistida por microondas previa a la SPE - Derivatización con BSTFA + 1% TMCS	[29]
BPA BPF	Carne enlatada (5 g)	QuEChERS y µ-DLLME	72 - 95	0,15 – 0,40 µg/kg	0,5 – 1,5 µg/kg	Derivatización con anhídrido acético	[3]
BPA BPF	Agua embotellada (1 L)	SPE	73,3 – 114,8	0,68 – 0,91 ng/L	2,27 – 3,02 ng/L	Derivatización con BSTFA + 1% TMCS	[30]
BPA BPF	Carne enlatada (10 g)	µ-SPE	79 - 84	0,10 µg/kg	-	Derivatización con anhídrido acético	[31]

**m-µ-dSPE** (microextracción magnética en fase sólida); **SPE** (extracción en fase sólida); **LLE** (extracción líquido-líquido); **dSPE** (extracción en fase sólida dispersiva); **µ-DLLME** (microextracción líquido-líquido dispersiva); **µ-SPE** (microextracción en fase sólida); **BSTFA** (N, O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida); **TMCS** (trimetilclorosilano).

Tras la evaluación de la bibliografía, se propuso la utilización del método QuEChERS basado en una LLE y una posterior limpieza, tal y como se indica en la parte experimental. La elección se basa en que este método es sencillo y permite tratar un mayor número de muestras de forma simultánea, aspectos de gran importancia en la industria alimentaria, cumpliendo, además, con los requisitos de la llamada “Química verde” o “Química sostenible”<sup>32</sup>.

Este pretratamiento se aplicaría a muestras de zumo, siendo necesario optimizarlo para el grupo de analitos de interés.

### 3.6 Validación de la metodología desarrollada

#### **Evaluación del efecto matriz**

Para evaluar el efecto matriz se comparan las pendientes de las curvas de calibrado descritas en el procedimiento experimental y se determina el efecto matriz a partir de la siguiente expresión<sup>20</sup>:

$$\% \text{ Efecto Matriz (\% EM)} = \left( 1 - \frac{\text{pendiente calibrado disolvente}}{\text{pendiente calibrado matriz}} \right) \cdot 100$$

Si el % EM es superior al 50% se considera que existe un fuerte EM asociado a un incremento de la señal. Si el valor se encuentra entre el 20-50%, el EM es moderado, mientras que si el valor obtenido está en el rango 0-20% se considera que se ha producido una influencia leve por parte de la matriz. Lo mismo ocurre con los valores negativos, en este caso debido a una supresión de la señal<sup>33</sup>.

#### **Calibrado en la matriz**

Este tipo de calibrado se realiza en caso de que exista efecto matriz<sup>20</sup>.

#### **Estudio de recuperaciones**

Las recuperaciones se calculan mediante la siguiente expresión<sup>34</sup>:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Cantidad de analito recuperado}}{\text{Cantidad de analito añadido}} \cdot 100$$

Este valor permite conocer la cantidad de analito que el método es capaz de recuperar tras someter la muestra a la metodología aplicada.

#### **Sensibilidad**

La sensibilidad se determina a partir del cálculo de los LODs y LOQs, teniendo en cuenta las pérdidas asociadas al procedimiento experimental, la eficacia de la extracción (recuperaciones) y el efecto de la matriz analizada (efecto matriz)<sup>21</sup>.

## 4. Conclusiones

De este Trabajo de Fin de Máster se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se ha desarrollado una metodología analítica para la determinación simultánea de 15 disruptores endocrinos, incluyendo alquilfenoles y bisfenoles, mediante GC-MS con un tiempo de análisis de 12 minutos.
- La metodología ha sido optimizada consiguiendo una adecuada separación cromatográfica de los distintos compuestos isoméricos, lo que permite la identificación inequívoca de cada analito de forma individual.
- Se ha seleccionado un pretratamiento de muestra basado en el método QuEChERS, que podría ser adecuado para la determinación de estos compuestos en muestras de zumo, teniendo en cuenta la información bibliográfica recopilada.
- Se ha propuesto una estrategia de validación de la metodología analítica basada en la legislación actual para muestras alimentarias con el objetivo de garantizar la correcta aplicación de la misma en muestras de zumo.
- La validación satisfactoria de la metodología propuesta permitirá llevar a cabo el análisis de un gran número de zumos ampliamente consumidos con el objetivo de evaluar la exposición de la población a los disruptores endocrinos seleccionados.

## 5. Bibliografía

- [1] Azzouz A., Palacios L., Souhail B., Ballesteros E. (2019). A multi-residue method for GC-MS determination of selected endocrine disrupting chemicals in fish and seafood from European and North African markets. *Environmental Research*, 178, 108727.
- [2] Wu P., Zhang L., Yang D., Zhang J., Hu Z., Wang L., Ma B. (2016). Isotope dilution gas chromatography with mass spectrometry for the analysis of 4-octylphenol, 4-nonylphenol and bisphenol A in vegetable oils. *J. Sep. Sci.*, 39, 904-909.
- [3] Cunha S., Inácio T., Almada M., Ferreira R., Fernandes J. (2020). Gas chromatography-mass spectrometry analysis of nine bisphenols in canned meat products and human risk estimation. *Food Research International*, 135, 109293.
- [4] Soto A., Schaeberle C., Maier M., Sonnenschein C., Maffini M. (2017). Evidence of absence: estrogenicity assessment of a new food-contact coating and the bisphenol used in its synthesis. *Environ. Sci. Technol.*, 51, 1718-1726.
- [5] Viñas P., Campillo N., Pastor M., Hernández M. (2015). Ultrasound assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of alkylphenol levels in cleaning products. *Anal. Methods*, 7, 6718-6725.
- [6] Viñas P., Pastor M., Torres A., Campillo N., Hernández M. (2016). Use of oleic-acid functionalized nanoparticles for the magnetic solid-phase microextraction of alkylphenols in fruit juices using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 151, 217-223.
- [7] Pastor M., Viñas P., Campillo N., Hernández M. (2017). Magnetic solid phase extraction with CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/oleic acid nanoparticles coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the determination of alkylphenols in baby foods. *Food Chemistry*, 221, 76-81.
- [8] Sungur S., Koroglu M., Ozkan A. (2014). Determination of bisphenol a migrating from canned food and beverages in markets. *Food Chemistry*, 142, 87-91.
- [9] Salgueiro N., Muniategui S., López P., Prada D. (2017). Trends in analytical methodologies for the determination of alkylphenols and bisphenol A in water samples. *Analytica Chimica Acta*, 962, 1-14.
- [10] Xie W., Zhao J., Zhang Q., Ye C., Zheng G., Shan Q., Li L., Shao X. (2020). Occurrence, distribution and bioaccumulation of alkylphenols in the Pearl River networks, South China. *Ecological Indicators*, 110, 105847.

- [11] Lee H., Lewin M., Peart T., Smyth S. (2016). Optimization of a microwave-assisted extraction procedure for the determination of selected alkyl, aryl, and halogenated phenols in sewage sludge and biosolids. *Environment and Climate Change Canada*, 344-356.
- [12] Pastor M., Drauschke T., Campillo N., Arroyo N., Torres C., Pérez M., Hernández M., Viñas P. Dual stir bar sorptive extraction coupled to thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of endocrine disruptors in human tissues.
- [13] Shuan C., Wang D. (2018). Isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry coupled with injection-port butylation for the determination of 4-t-octylphenol, 4-nonylphenols and bisphenol A in human urine. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 149, 572-576.
- [14] Caporossi L., Alteri A., Campo G., Paci E., Tranfo G., Capanna S., Papaleo E., Pignini D., Viganò P., Papaleo B. (2020). Cross sectional study on exposure to BPA and phthalates and semen parameters in men attending a fertility center. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17, 489-507.
- [15] Pandelova M., Piccinelli R., Lopez W., Henkelmann B., Molina J., Arrebola J., Olea N., Leclercq C., Schramm K. (2011). Assessment of PCDD/F, PCB, OCP and BPA dietary exposure of non-breast-fed European infants. *Food Additives and Contaminants*, 28, 1110-1122.
- [16] Resolución del Parlamento Europeo (2012/2066(INI)), de 14 de marzo de 2013, sobre la protección de la salud pública contra los alteradores endocrinos. *Diario Oficial de la Unión Europea*, 36, 85-91.
- [17] Reglamento (UE) 2018/213 de la Comisión de 12 de febrero de 2018 sobre el uso del 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*, 41, 6-12.
- [18] Ze R., Jiang J., Mao T., Song Y., Lu Y. (2016). Multiresidue analysis of environmental pollutants in edible vegetable oils by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 207, 43-50.
- [19] Anastassiades M., Lehotay S. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86, 412-431.
- [20] Socas B., González J., Herrera A., Santana A., Hernández B. (2018). Determination of phthalic acid esters in different baby foods samples by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410, 5617-5628.

- [21] Skoog D., Holler J., Nieman T., (2000), *Principios de Análisis Instrumental*, España, S.A. MCGRAW-HILL.
- [22] Chiou C., Schmedding D., Manes M. (2005). Improved prediction of octanol-water partition coefficients from liquid-solute water solubilities and molar volumes. *Environmental Sci. Technol.*, 39, 8840-8846.
- [23] Martínez M.P. (2015). Métodos analíticos para la determinación de compuestos disruptores endocrinos (Tesis Doctoral). Universidad de La Rioja, España.
- [24] Grover A., Kaur R., Mohiuddin I., Malik A., Singh J., Fai Y., Kim K. (2019). Surfactant-modified Zn/Al-layered double hydroxides for efficient extraction of alkyl phenols from aqueous samples. *Environmental Research*, 177, 108605.
- [25] *PubChem*. National Library of Medicine. Recuperado el 26 de junio de 2020 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- [26] *ChemSpider*. ChemSpider search and share chemistry. Recuperado el 26 de junio de 2020 de <http://www.chemspider.com/>
- [27] Todd J. (1991). Recommendations for nomenclature and symbolism for mass spectrometry. *Pure and Appl. Chem.*, 63, 1541-1566.
- [28] Albero B., Sánchez C., Miguel E., Tadeo J. (2017). Application of matrix solid-phase dispersion followed by GC-MS/MS to the analysis of emerging contaminants in vegetables. *Food Chemistry*, 217, 660-667.
- [29] Azzouz A., Palacios L., Hejji L., Ballesteros E. (2020). Determination of alkylphenols, phenylphenols, bisphenol A, parabens, organophosphorus pesticides and triclosan in different cereal-based foodstuffs by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412, 2621-2631.
- [30] Wang H., Liu Z., Tang Z., Zhang J., Yin H., Dang Z., Wu P., Liu Y. (2020). Bisphenol analogues in Chinese bottled water: Quantification and potential risk analysis. *Science of the Total Environment*, 713, 136583.
- [31] Rastkari N., Ahmadkhaniha R., Yunesian M., Baleh L., Mesdaghinia A. (2020). Sensitive determination of bisphenol A and bisphenol F in canned food using a solid-phase microextraction fibre coated with single-walled carbon nanotubes before GC/MS. *Food Additives and Contaminants*, 27, 1460-1468.

## Bibliografía

[32] Santana A., Socas B., Herrera A., Rodríguez M.A. (2019). Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, 116, 214-235.

[33] Pano N., Ceballos S., Muñiz R., Gonzalez J. (2017). Validation and assessment of matrix effect and uncertainty of a gas chromatography coupled to mass spectrometry method for pesticides in papaya and avocado samples. *Journal of food and drug analysis*, 25, 501-509.

[34] Rodríguez S., Pellerano R., Acevedo C., Vázquez F. (2012). Validación de un método analítico para la determinación de boro en muestras foliares de *Citrus reticulata*. *Tumbaga*, 7, 55-71.