



Trabajo de Fin de Máster

Evaluación de migrantes de plásticos
mediante procedimientos analíticos
sostenibles

AUTOR:

Adrián Conde Díaz

TUTOR/ES:

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: **“Evaluación de migrantes de plásticos mediante procedimientos analíticos sostenibles”** realizado por D. Adrián Conde Díaz, durante el curso académico 2020-2021 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 07 de septiembre de 2021.



Fdo: D. Miguel Ángel Rodríguez Delgado Fdo: Dña. Bárbara Socas Rodríguez

Resumen

En este trabajo se ha desarrollado una nueva metodología analítica para llevar a cabo la determinación de un grupo de seis ftalatos y un adipato en muestras de gelatina. Para ello, se ha utilizado la técnica de extracción en fase sólida micro-dispersiva magnética, así como la cromatografía líquida de ultra-alta eficacia acoplada a la espectrometría de masas en tándem.

Summary

In this study, a new analytical methodology has been developed to carry out the determination of a group of six phthalates and one adipate in jellies. For this purpose, a magnetic-micro-dispersive solid-phase extraction procedure has been used, as well as the ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.

Índice

ÍNDICE

1.- Introducción	1
1.1.- Industria de los plásticos.....	1
1.2.- Plastificantes comúnmente usados en la industria	4
1.2.1.- Ésteres de ácidos ftálicos (PAEs)	5
1.3.- Impacto de los ftalatos en la salud	7
1.4.- Legislación sobre el uso de ftalatos	9
1.5.- Técnicas de separación y detección de ftalatos.....	10
1.6.- Técnicas de extracción de ftalatos en alimentos	12
1.7.- Química analítica sostenible	15
1.8.- Nanopartículas magnéticas y su aplicación en el campo de la química analítica	18
2.- Objetivos	23
3.- Parte experimental	27
3.1.- Reactivos, patrones, disolventes y disoluciones.....	27
3.2.- Material.....	28
3.3.- Equipos.....	28
3.3.1.- Aparatos.....	28
3.3.2.- Instrumentos.....	29
3.3.3.- Programas informáticos	29
3.4.- Procedimientos experimentales	29
3.4.1.- Síntesis del sorbente	29
3.4.2.- Lavado del sorbente.....	30
3.4.3.- Preparación de la muestra	30
3.4.4.- Procedimiento de extracción	31
3.4.5.- Separación y cuantificación de los analitos mediante UHPLC-MS/MS	31
3.5 Lavado del material	32
3.6.- Selección y análisis de muestras comerciales	33

4.-Resultados y discusión	37
4.1.- Características de los compuestos estudiados	37
4.2.- Método cromatográfico	39
4.3.- Optimización de las condiciones de extracción	41
4.3.1.- Influencia del grado de recubrimiento del sorbente	42
4.3.2.- Influencia del disolvente de elución	43
4.3.3.- Diseño experimental	44
4.4.- Estudio del efecto matriz	48
4.5.- Calibración en la matriz.....	49
4.6.- Estudio de recuperaciones y entre lotes.....	50
4.7.-Análisis de muestras reales.....	52
5.- Conclusiones	59
6.- glosario.....	63
7.- Bibliografía	69

Introducción

1.- INTRODUCCIÓN

El Neolítico, del griego *νεο- neo-* “nuevo” y *λιθικός lithikós* “de piedra”, es un período histórico comprendido entre el 6000 a.C. y el 4000 a.C., considerado como el último de la edad de piedra. El nombre hace referencia al fin de la etapa nómada del ser humano, así como al refinamiento de las herramientas utilizadas hasta el momento. Este período se caracterizó por la generalización de la agricultura y del pastoreo de animales, dando lugar a sociedades agrarias organizadas y, como consecuencia de ello, a los primeros asentamientos sedentarios de la historia de la humanidad. Desde entonces, las civilizaciones se han desarrollado, en parte, gracias al descubrimiento de nuevos materiales, mejorando las capacidades de supervivencia, progreso, bienestar y crecimiento.

Los plásticos han sido uno de los mayores hitos del desarrollo de los materiales desde la aparición de la baquelita, el primer plástico versátil, no inflamable y barato de producir, desarrollado por Leo Baekeland en 1907, quien es considerado como el padre de los plásticos modernos (ACS, 2015). Desde ese momento, los plásticos han ido progresivamente sustituyendo al resto de materiales tales como la madera, el papel o diferentes metales y aleaciones en muchas aplicaciones. Se trata de derivados de materiales orgánicos naturales, como la celulosa, el carbón, el gas natural, la sal, y el petróleo (Plastics Europe, 2021). El proceso de fabricación de los plásticos consta de tres etapas principales: en primer lugar, al igual que en todo proceso productivo, se deben refinar las materias primas, eliminando las impurezas no deseadas, obteniendo los monómeros base de los plásticos. En segundo lugar, ocurre la polimerización del compuesto mediante procesos de adición o condensación. En tercer y último lugar, ocurre un proceso de composición y refinamiento (Plastic Collectors, 2020).

1.1.- INDUSTRIA DE LOS PLÁSTICOS

La industria de los plásticos es una de las áreas de producción con más relevancia a nivel internacional. Solamente en 2019, se produjeron 368 millones de toneladas de productos plásticos en todo el mundo, incrementando esta cifra en 17 millones de toneladas respecto al año anterior. Del total de plásticos producidos en 2019, el 51% procedía de Asia. Concretamente, China produjo el 31% de todo el plástico manufacturado durante 2019. Así mismo, América fue responsable del 23% de la producción de plásticos durante este año, mientras que Europa produjo el 16% de la misma (Plastics Europe, 2021) (ver **Figura 1.1**).

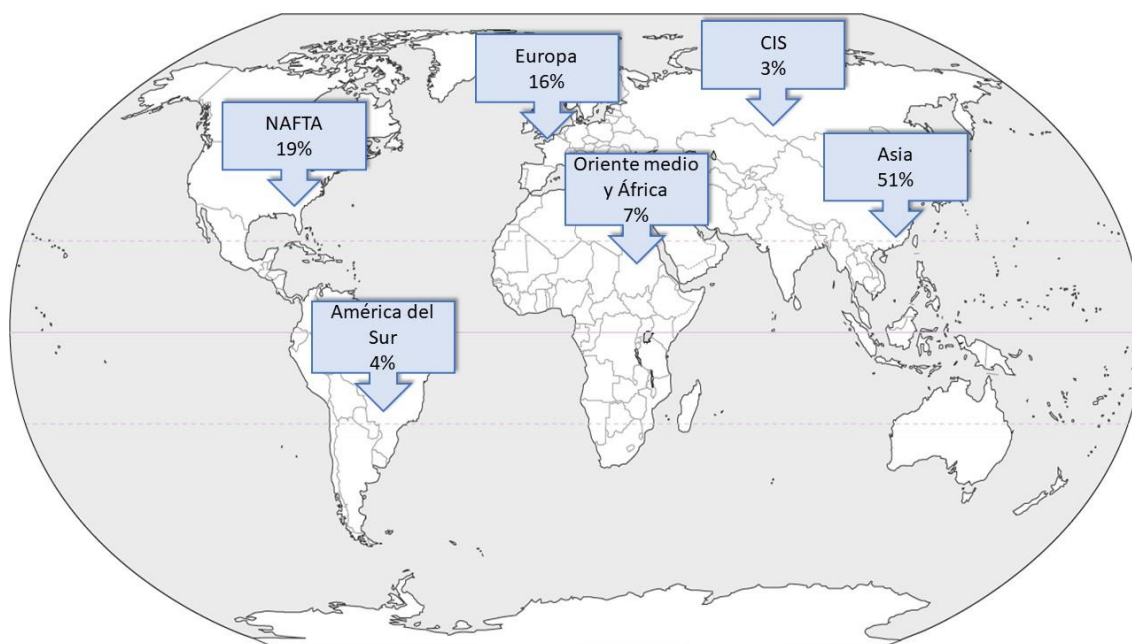


Figura 1.1.- Mapa mundial de producción de plásticos durante 2019 (adaptación de Plastics Europe, 2021).

En este sentido, la industria de los plásticos genera, de forma directa, alrededor de 1,5 millones de puestos de trabajo distribuidos en más de 55000 empresas a nivel europeo. Por otra parte, facturando más de 350 billones de euros durante el ejercicio fiscal de 2019, la industria de los plásticos se sitúa como la séptima más importante en valor añadido en toda Europa, al mismo nivel que la industria farmacéutica, y muy próxima a la industria química (Plastics Europe, 2021).

Por otro lado, el uso de los plásticos es muy diverso, y aplicado en prácticamente todos los ámbitos de producción y consumo existentes. En términos generales, el 19,4% del plástico producido se corresponde al polipropileno, de amplio uso en el ámbito del empaquetamiento alimentario, envoltorios de consumibles, lentillas, y partes de coches, entre otros. El 17% corresponde al polietileno de baja densidad, o PE-LD, y sus aplicaciones se enmarcan, principalmente, en la producción de las bolsas reutilizables, envoltorios de empaquetamiento de comidas y de uso agronómico, así como en la preparación de contenedores y bandejas. En tercer lugar, el PE-HD, o polietileno de alta densidad, que abarca el 12,4% de la producción global de plásticos, es ampliamente utilizado en tuberías, menaje y juguetes, entre otras aplicaciones. Por último, el PET, o tereftalato de polietileno, que comprende el 7,9% de la producción global de plásticos, es de gran aplicación en la producción de botellas de agua, refresco y demás bebidas (Plastics Europe, 2021) (ver **Figura 1.2**).

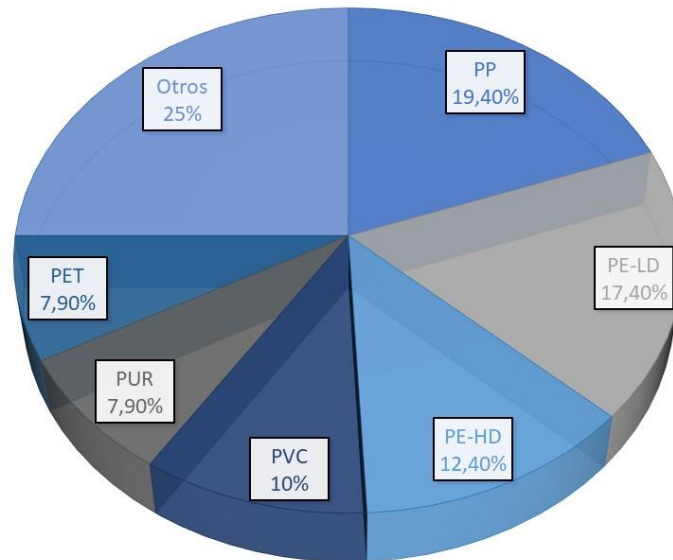


Figura 1.2.- Producción mundial de tipos de plásticos durante 2019. PP: polipropileno; PE-LD: polietileno de baja densidad; PE-HD: polietileno de alta densidad; PVC: policloruro de vinilo; PUR: poliuretano; PET: tereftalato de polietileno (adaptación de Plastics Europe, 2021).

Debido a ello, tanto la sociedad como la industria son ampliamente dependientes de la producción de plásticos. Los constantes avances en la ciencia de los materiales desarrollados en las últimas décadas han llevado a la diversificación del uso de los plásticos en cada vez más sectores, desarrollando plásticos más ligeros, resistentes, duraderos, versátiles y baratos de fabricar. Es por ello que existe una gran exposición del consumidor a los plásticos, sobre todo en el área alimentaria, donde estos se utilizan como envoltorios de productos, envases, y recipientes de todo tipo (Meeker et al., 2009). Uno de los principales problemas asociados a dicha exposición ocurre si se tiene en cuenta que algunos de los agentes plastificantes utilizados para mejorar las propiedades de dichos plásticos actúan, de forma indeseada, como agentes disruptores del sistema endocrino o como productos tóxicos participando en el desarrollo de diversas enfermedades (NRC, 1999).

1.2.- PLASTIFICANTES COMÚNMENTE USADOS EN LA INDUSTRIA

Los agentes plastificantes son sustancias químicas que, al ser incorporadas a un material, aportan propiedades de gran interés, tales como flexibilidad, resistencia o durabilidad. Estos agentes plastificantes son, en su mayoría, productos orgánicos con bajos valores de presión de vapor. Se trata, principalmente, de diversos ésteres que reaccionan con los polímeros para formar unidades homogéneas (Wypych, G., 2017). El 90% de los agentes plastificantes son producidos para la industria del cloruro de polivinilo, o PVC, debido a que es en este polímero donde más beneficios reportan. Esto se debe, principalmente, a la morfología del PVC, que permite aceptar y retener altas cantidades de plastificantes (Walters et al., 2021).

Los agentes plastificantes se clasifican en dos grandes grupos en función de cómo afecten al polímero al que se añaden. Los plastificantes primarios producen una disminución de la temperatura de transición vítrea en el plástico al que se añaden, a la par que incrementan la capacidad de elongación del polímero (Wilkes et al., 2005). Por otro lado, los plastificantes secundarios se caracterizan por tener una compatibilidad limitada con el polímero cuando se añaden solos, pero incrementan notablemente los efectos de los plastificantes primarios en combinación con ellos (Wilkes et al., 2005). Dentro de este tipo de aditivos, se encuentran compuestos tales como los ésteres del ácido ftálico y sus derivados, cuyos grupos carboxilos se hallan en posición orto, y el ácido tereftalático, en posición para. Así mismo, otros compuestos como los ésteres dicarboxílicos de ciclohexanos, los ésteres de benzoato, ésteres de adipato y ésteres de fosfato y de citrato, entre otros, son agentes plastificantes comunes en la industria (Walters et al., 2021).

1.2.1.- ÉSTERES DE ÁCIDOS FTÁLICOS (PAEs)

Los ftalatos, ésteres del ácido ftálico, o PAEs (del inglés *phthalic acid esters*), son un grupo de moléculas cuya estructura deriva de la esterificación dialquílica o arílica del ácido benceno-1,2-dicarboxílico (ver **Figura 1.3**). Se trata de un grupo de compuestos líquidos a temperatura ambiente, con una baja presión de vapor y poca solubilidad en agua. De hecho, tanto la presión de vapor como la solubilidad en agua disminuyen según aumenta el peso molecular del compuesto, al contrario que el coeficiente de reparto octanol-agua, que aumenta. Esto se debe a que, a mayor tamaño de las cadenas radicales, menor importancia fisicoquímica tienen los grupos carboxilos comunes. Por otra parte, se asume que, a pesar de que la ratio de hidrólisis abiótica de los ftalatos es muy baja, son compuestos poco persistentes y fácilmente biodegradables, aunque existen estudios que muestran valores moderados de di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) en muestras frescas de crustáceos (EPA, 2012).

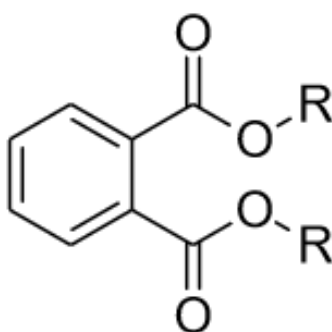


Figura 1.3.- Estructura general de los ftalatos.

Los ftalatos se utilizan como plastificantes en la producción de plásticos, mayoritariamente en la síntesis de PVC. Estos plastificantes aportan, principalmente, flexibilidad y durabilidad a los plásticos, entre otras propiedades de interés. Por tanto, la presencia de ftalatos como agentes plastificantes es común en materiales plásticos que forman parte del mobiliario doméstico, como revestimiento de suelos y persianas, interiores de coche, adhesivos y empaquetamiento de comida (OSHA, 2021 y Müllerová et al., 2016), así como en juguetes, productos electrónicos, fibras textiles y productos de cuidado personal, entre otros (Li et al., 2019). Durante el año 2006, más de 213 millones de kilogramos de ftalatos fueron producidos con este fin, por lo que se considera uno de los grupos de agentes plastificantes más relevantes en la industria plástica (EPA, 2012). En la **Tabla 1.1** se muestran los principales ámbitos de aplicación de algunos de los ftalatos más comunes.

Tabla 1.1.- Aplicaciones de algunos de los ftalatos más comunes (Heudorf et al., 2007).

Ftalato	Principales aplicaciones
Di-etil ftalato, DEP	Productos cosméticos y de cuidado personal
Butil-benzil ftalato, BBP	Baldosas de vinilo, cintas transportadoras de alimentos, cuero artificial, molduras para automóviles y conos de tráfico
Di-n-butil ftalato, DBP	Plásticos de PVC, adhesivos de látex, productos cosméticos, productos para el cuidado personal, plásticos de celulosa y solventes para tintes
Di(2-etilhexil) ftalato, DEHP	Productos de construcción (papel tapiz, aislamiento de cables y alambres), productos para automóviles (tapicería de vinilo, asientos de automóvil), ropa (calzado, impermeables), envases de alimentos, productos para niños (juguetes, agarre parachoques) y dispositivos médicos
Di-n-hexil ftalato, DHP	Productos moldeados por inmersión, como mangos de herramientas, cestas para lavavajillas; suelo, guantes de vinilo, collares anti-pulgas, cintas transportadoras utilizadas en el procesamiento de alimentos
Di-n-octil ftalato, DNOP	Mangueras de jardín, revestimientos para piscinas, baldosas para pisos, lonas, cementos para juntas, revestimientos de tapas de botellas y cintas transportadoras de alimentos
Di-isononil ftalato, DINP	Mangueras de jardín, revestimientos para piscinas, baldosas para pisos, lonas y juguetes
Di-isodecil ftalato, DIDP	Revestimiento de alambres y cables, cuero artificial, juguetes, respaldos de alfombras, piscinas y revestimientos

1.3.-IMPACTO DE LOS FTALATOS EN LA SALUD

Una de las principales características del uso de ftalatos como plastificantes es el hecho de que no se hallan unidos covalentemente al polímero plástico (Koch et al., 2006). Esto permite que, bajo determinadas circunstancias, y en un grado variable, sean capaces de transferirse a otro material con el que se encuentren en contacto en un proceso denominado “migración”. Si bien la alta compatibilidad de los plásticos, como el PVC, con los plastificantes minimiza los fenómenos de migración, este efecto ocurre, de forma inevitable, en mayor o menor medida. La migración de los agentes plastificantes está determinada, entre otros parámetros, por la naturaleza del material que entra en contacto con el plástico, así como por las características del agente plastificante en cuestión, siendo determinante la solubilidad de éste en el disolvente al cual migra (Walters et al., 2021). Otros parámetros fisicoquímicos, como la temperatura de los materiales o la agitación, juegan un papel fundamental en la migración de estos compuestos.

Los procesos de migración, por lo tanto, permiten a los ftalatos desplazarse a materiales y sustancias muy diversas. Esto hace que el grado de exposición al que se ve sometida la población sea elevado, y muy variable mediante ingestión, inhalación, absorción dérmica e incluso durante la gestación (Wang et al., 2020a). De todas estas vías, la más común es mediante la ingesta de alimentos (Serrano et al., 2014). Esto es debido a que, durante todo el proceso de producción y manufacturado, desde que se desarrollan los alimentos, ya sea a nivel agronómico o industrial, hasta que se empaquetan y llegan al consumidor, éstos están en contacto permanente con plásticos desde los que migran los ftalatos. Una vez dichos compuestos entran en el organismo, ocurren dos etapas catabólicas principales: una fase de hidrólisis, donde ocurre la separación del diéster en sus respectivos monoésteres, y una fase de conjugación mediada por el ácido glucorónico. Posteriormente, ocurre la excreción por vía urinaria (Chang et al., 2021).

La exposición a ftalatos se asocia a fenómenos de disrupción del sistema endocrino. Los agentes disruptores del sistema endocrino son aquellas sustancias (plaguicidas, estrógenos, fitoestrógenos, ftalatos, etc.) que interfieren en la síntesis, secreción, transporte o metabolismo de cualquier hormona responsable de la homeostasis corporal, reproducción, o desarrollo normal del organismo. Por ello, la exposición a este tipo de agentes disruptores del sistema suele conllevar problemas de salud muy diversos (Chang et al., 2021). Entre muchas otras cosas, la exposición a ftalatos produce, en hombres, una reducción de la calidad del esperma (Mariana et al., 2016), así como una alteración en la distancia anogenital, un indicador de malformaciones y enfermedades del sistema reproductor (Swan, 2009). En lo que respecta a las mujeres, la exposición a ftalatos se correlaciona con la aparición de endometriosis, es decir, crecimiento

anormal de tejido endometrial fuera del útero, que conlleva a problemas de fertilidad y dolores de diversos tipos (Chou et al., 2020 y Kim et al., 2011).

Por otra parte, la exposición a ftalatos también se asocia al desarrollo de enfermedades cardiovasculares. En este sentido, es relevante la influencia que tiene dicha exposición en la capacidad de contracción del corazón, disminuyéndola e induciendo diversos problemas de salud (Mariana et al., 2016). De hecho, estudios recientes muestran la correlación entre la exposición a ftalatos y la predisposición a sufrir una cardiopatía coronaria (Su et al., 2019). De forma similar, algunos estudios han demostrado la correlación entre la exposición a ftalatos y valores anormalmente altos de presión sanguínea y colesterol (Werner et al., 2015 y Zhang et al., 2018), así como la aparición de arterosclerosis en animales expuestos a DEHP (Shih et al., 2015 y Zhao et al., 2016).

Así mismo, la exposición a ftalatos está asociada a problemas respiratorios en niños tales como sensibilización alérgica y rinoconjuntivitis (Beko et al., 2015), a desórdenes de la glándula tiroidea asociados a menores niveles de triyodotironina y tiroxina (Morgenstern et al., 2017 y Weng et al., 2017), y a la predisposición a sufrir diabetes de tipo II debido a la adquisición de resistencia a la insulina y al incremento del estrés oxidativo celular (Kim et al., 2013). Por último, y aunque los experimentos en animales muestran una clara correlación entre la exposición a ftalatos y la aparición de enfermedades neurológicas y renales, los estudios clínicos en personas aún no son determinantes (Chang et al., 2021) (ver **Figura 1.4**).

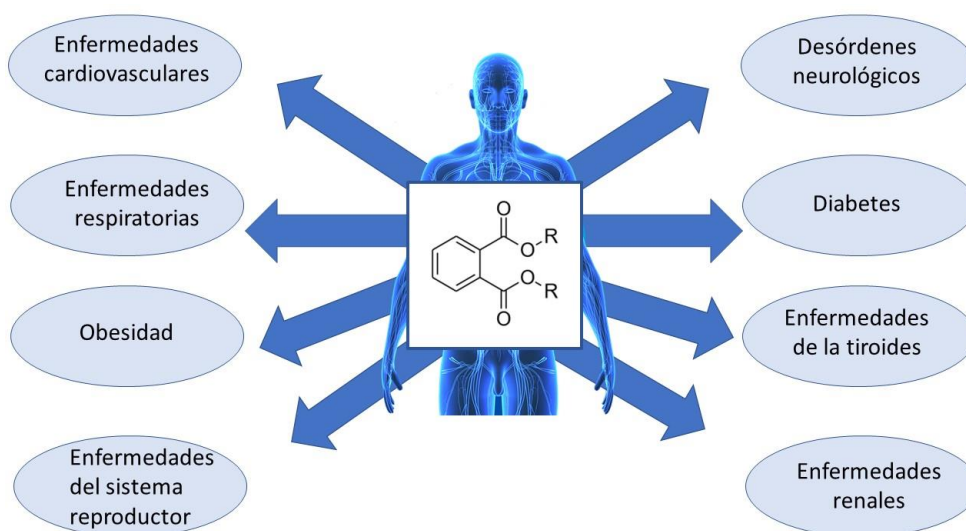


Figura 1.4.- Impactos en la salud de la exposición a ftalatos.

1.4.- LEGISLACIÓN SOBRE EL USO DE FTALATOS

Debido a todo lo expuesto anteriormente, los distintos organismos internacionales y nacionales han establecido una serie de normas orientadas a la regulación del uso de ftalatos en diversos productos. En primer lugar, el Plan de Acción de la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (EPA, del inglés *Environmental Protection Agency*) recomienda el control de 8 ftalatos en la producción, procesado, distribución y comercio de productos de consumo: di-n-butil ftalato (DBP), di-isobutil ftalato (DIBP), BBP, di-n-pentil ftalato (DNPP), DEHP, DNOP, di-isodecil ftalato (DINP) y di-isononil ftalato (DIDP). Además, el documento menciona una serie de agentes plastificantes que pueden actuar como sustitutos de los ftalatos, y que se utilizan actualmente para la producción de artículos de puericultura; concretamente, el acetil tri-n-butil citrato (ATBC), di(2-etilhexil) adipato (DEHA), 1,2-ácido ciclohexanodicarboxílico, diisononil éster y el di(2-etilhexil) tereftalato (DEHT). Además, establece un máximo de 0,006 mg/L de DEHP en agua potable embotellada. De igual manera, el DEHP y el DBP se encuentran en la lista de contaminantes tóxicos del aire (EPA, 2012). Por otra parte, la Comisión de Seguridad de Productos para el Consumidor (CPSC, del inglés *Consumer Products Safety Commission*) prohíbe el uso de DEHP, DBP, BBP, DINP, DIDP y DNOP en productos para el cuidado de niños y juguetes a concentraciones mayores del 0,1%. Además de ello, la Administración de Alimentación y Medicamentos (FDA, del inglés *Food and Drugs Administration*), recomienda el uso de sustitutos del DBP y del DEHP como excipientes para productos farmacéuticos, entre los que cabe destacar el dibenzoato de dipropilenglicol, trioctil trimelitato, DEHA, y el ATBC, siendo este último utilizado en la producción de comprimidos farmacéuticos (Bui et al., 2016).

Respecto a la legislación europea, el Reglamento (UE) 2018/2005 de la Comisión del 17 de diciembre de 2018 que modifica el anexo XVII del Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas (REACH), establece el DEHP, DBP, BBP y DIBP como sustancias tóxicas para la reproducción en la categoría 1B. En ella se establece la concentración máxima de estos compuestos en un 0,1% del peso total del producto en juguetes y productos de puericultura.

Por otra parte, la Directiva 2011/65/UE del Parlamento Europeo y del Consejo del 8 de junio de 2011 sobre las restricciones a la utilización de determinadas sustancias peligrosas en aparatos eléctricos y electrónicos reconoce los riesgos para la salud humana y el medio ambiente derivados del uso del DEHP, DBP y DDP. De forma similar, el Reglamento (UE) nº 10/2011 de la

Comisión del 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos, regula los materiales y objetos hechos exclusivamente con materias y juntas plásticas de las tapas. Los valores máximos permitidos de cada ftalato por kg de producto final están recogidos en la **Tabla 1.2**.

Tabla 1.2.- Límite de migración específico (LME) para cada compuesto de acuerdo con el Reglamento (UE) nº 10/2011.

Compuesto	LME (mg/kg)
DBP	0,3
BBP	30
DEHP	1,5
Dialil ftalato	No detectado
DIDP	9
DINP	9
Isoftalato de dimetilo	0,05
5-Sulfoisofthalato de dimetilo	0,05
DEHT	60
Bis(hexahidroftalato) de triciclodecánodimetanol	0,05

Respecto a las limitaciones de uso, el Reglamento en cuestión regula el uso del DBP, BBP, DEHP, DIDP y DINP como plastificante en materiales y objetos de uso repetido que estén en contacto con alimentos no grasos, y como agente de apoyo técnico en concentraciones de hasta el 0,05%, 0,1% y 0,1% en el producto final respectivamente. En el caso del dialil ftalato (DAP), no existe restricción en su uso como agente de apoyo técnico, pero no debe detectarse en el producto final.

1.5.- TÉCNICAS DE SEPARACIÓN Y DETECCIÓN DE FTALATOS

Teniendo en cuenta los efectos negativos en la salud que conlleva la migración de los ftalatos desde los materiales plásticos, resulta necesario el desarrollo de metodologías analíticas que permitan la determinación fiable de este tipo de compuestos en matrices de interés cuya contaminación suponga un riesgo para la población.

La elección de la técnica de separación y determinación de un grupo de analitos concreto, como son los ftalatos, depende casi exclusivamente de sus propiedades fisicoquímicas. En este caso, y tratándose de moléculas con un peso molecular relativamente bajo, con una polaridad intermedia, una volatilidad alta y una baja termolabilidad, una de las técnicas de separación más utilizada para los ftalatos es la cromatografía de gases, o GC (del inglés *gas chromatography*),

fundamentalmente acoplada a la espectrometría de masas, o MS (del inglés *mass spectrometry*), (Harunarashid et al., 2017).

Sin embargo, la cromatografía líquida, o LC (del inglés *liquid chromatography*), aunque menos utilizada, se sitúa como una alternativa viable para la separación de ftalatos, especialmente en el caso de mezclas de isómeros, donde esta técnica destaca por proporcionar una mayor selectividad (Luís et al., 2021). Además, los tiempos de análisis de la LC son significativamente inferiores a los de la CG. Por ello, la cromatografía líquida de alta eficacia, HPLC (del inglés *high performance liquid chromatography*), y más recientemente, la cromatografía líquida de ultra alta eficacia, o UHPLC (del inglés *ultra-high performance liquid chromatography*) han sido ampliamente utilizadas para la separación de ftalatos, principalmente en fase reversa (Xue et al., 2019; Panio et al., 2020 y Nagorka y Koschorreck, 2020). Respecto a los detectores, la tendencia observada en el caso de la GC se mantiene en la LC, donde los espectrómetros de masas han ido ganando terreno a los detectores convencionales, utilizándose analizadores de tipo triple cuadrupolo (QqQ) (Rodríguez-Ramos et al., 2021 y Hu et al., 2020), cuadrupolo simple (Q) (Ma et al., 2010), cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF) (He et al., 2020) y cuadrupolo con trampa de iones (Q-Orbitrap) (Musatadi et al., 2021). Por otra parte, la ionización por electrospray (ESI, del inglés *electrospray ionisation*) en modo positivo es la fuente de ionización más común en el caso de la determinación de ftalatos por LC. Pese a ello, es también habitual el uso de detectores ultravioleta-visible (UV-Vis) (Dong et al., 2021), y de diodo/fotodiodo array (Ishizaki et al., 2021 y Yadav et al., 2017).

Por último, y aunque se trata de una técnica de mucho menor uso, la electroforesis capilar en su modalidad de cromatografía electrocinética micelar acoplada a un detector de diodo array (MEKC-DAD, del inglés *micelar electrokinetic chromatography-diode array detector*) se ha utilizado para el análisis de ftalatos en bebidas alcohólicas (Sun et al., 2014). Esta técnica, constituyéndose como híbrida entre la electroforesis capilar y la cromatografía, permite realizar separaciones rápidas, eficientes, y con un bajo consumo de disolvente (Hancu et al., 2013).

1.6.- TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE FTALATOS EN ALIMENTOS

Como se ha indicado anteriormente, debido al estrecho contacto entre los alimentos y los materiales plásticos, resulta imprescindible estudiar la composición de los mismos para garantizar la seguridad de los consumidores. En este sentido, se han desarrollado diversas técnicas para la extracción de ftalatos en matrices alimentarias, con el objetivo de controlar la cantidad de este tipo de compuestos que potencialmente puedan migrar desde los envases, envoltorios, cajas, y productos plásticos en general, hasta los alimentos consumidos por la población. Las principales técnicas de extracción de ftalatos en matrices alimentarias se resumen en la **Tabla 1.3**.

Las técnicas más habituales, y las primeras en comenzar a utilizarse, son aquellas basadas en el uso de disolventes. Este conjunto de técnicas ha sido aplicado, principalmente, en muestras líquidas con bajo contenido de grasas, como son las bebidas, utilizando ciclohexano, acetato de etilo (AcOEt), dietiléter y n-hexano como disolventes de extracción (Harunarashid et al., 2017). En este sentido, destaca la extracción líquido-líquido, o LLE (del inglés *Liquid-liquid extraction*), en la cual se utiliza la solubilidad relativa de los analitos en dos disolventes inmiscibles, uno polar y otro apolar, generalmente, seguido por una etapa de separación de fases (Guo et al., 2012). Si bien es cierto que se trata de una técnica ampliamente estudiada y desarrollada, capaz de proveer límites de detección del orden de ng/L (Arfaenia et al., 2020) con valores de recuperaciones absolutas superiores al 80%, es una técnica que requiere de grandes cantidades de disolventes que además pueden ser tóxicos y dañinos para el medio ambiente. Esto entra en contradicción directa con el quinto punto de los doce principios de la química verde (De Marco et al., 2019), cuya premisa es la de utilizar la menor cantidad de sustancias auxiliares, como son los disolventes, en todos los procedimientos experimentales. Esto supone, de igual manera, uno de los primeros problemas a los que se enfrentan otra metodología para la extracción de ftalatos en matrices alimentarias: el método Soxhlet, que a pesar de ser una técnica relativamente simple y apta para su desarrollo a pequeña escala, utiliza un gran volumen de disolvente de extracción, y requiere mucho tiempo, siendo esto, junto a la reducida capacidad de extracción, su principal limitación (Luís et al., 2021).

Tabla 1.3.- Ventajas y desventajas de las técnicas de extracción más comunes para la determinación de ftalatos en muestras alimentarias (Modificado de Luís et al., 2021).

Técnica de extracción	Ventajas	Desventajas
LLE	Económica Alta eficiencia de extracción Fácil de operar Apta para pequeña escala	Alto volumen de disolvente Baja selectividad Difícil de automatizar Lenta
DLLME	Económica Alta eficiencia de extracción Baja cantidad de muestra Bajo consumo de disolvente Rápida	Baja selectividad Requiere centrifugación Requiere el uso de tres disolventes diferentes
Soxhlet	Fácil de operar Fácil de automatizar Apto para muestras sólidas	Alto volumen de disolvente Lenta Baja selectividad
SPE	Fácil de automatizar Apta para gran escala	Múltiples pasos Alto volumen de disolvente
SPME	Pocos pasos Baja cantidad de muestra Rápida Reutilización de la fase polimérica	Potencial contaminación de la fibra Precio de la fibra Equilibrio de adsorción/desorción
QuEChERS	Económica Etapa de <i>clean up</i> eficiente Rápida, simple y robusta	Baja selectividad
m-dSPE	Medioambientalmente sostenible Simple Poca cantidad de sorbente Reutilización del sorbente Rápida	Requiere de vórtex, agitador magnético, o imán Requiere de una elección apropiada del sorbente

DLLME: microextracción líquido-líquido dispersiva; LLE: extracción líquido-líquido; SPE: extracción en fase sólida; SPME: microextracción en fase sólida; m-dSPE: extracción en fase sólida dispersiva-magnética.

Por ello, las técnicas miniaturizadas, como la microextracción en fase líquida (LPME, del inglés *Liquid-phase microextraction*) cobran cada vez más importancia entre la comunidad científica para la extracción y cuantificación de agentes disruptores del sistema endocrino en matrices alimentarias (Chormey et al., 2020). Estas técnicas se caracterizan por el uso de volúmenes mucho más pequeños, del orden de microlitros, por ser selectivas, eficientes y robustas (Kokosa

et al., 2019), y engloban cinco estrategias de extracción principales: microextracción de gota colgante, o SDME (del inglés *single drop microextraction*), microextracción en fase líquida utilizando membranas líquidas soportadas sobre fibras huecas, o HF-LPME (del inglés *hollow fiber liquid-phase microextraction*), microextracción en fase líquida dispersiva, o DLLME (del inglés *dispersive liquid-liquid microextraction*) (Chormey et al., 2020 y Kokosa et al., 2019). Concretamente, la DLLME ha cobrado gran protagonismo en los últimos años debido a varios factores. En primer lugar, esta técnica permite realizar una gran preconcentración de los analitos de interés. Además, el volumen de disolventes se reduce en gran medida, así como la complejidad del procedimiento experimental. Todo esto se traduce en una mayor eficiencia (Dmitrienko et al., 2020). Especialmente remarcable es la aplicación de esta técnica utilizando disolventes sostenibles alternativos a los convencionales, como son los líquidos eutécticos profundos, o DES (del inglés *deep eutectic solvent*), con una menor toxicidad y un mayor carácter sostenible, entre otras ventajas.

Por otra parte, las distintas adaptaciones del método QuEChERS (del inglés *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), desarrollado por Anastassiades y colaboradores en 2003 (Anastassiades et al. 2003), y caracterizado por el uso de una etapa de extracción, seguida por una etapa de limpieza, han permitido desarrollar diversas técnicas polivalentes para la determinación de ftalatos en alimentos infantiles (Socas-Rodríguez et al., 2018), bebidas no alcohólicas (Rodríguez-Ramos et al., 2020), y leche embotellada (Dobaradaran et al., 2020), entre otras. Una de las principales ventajas de esta metodología consiste en la eliminación de muchas sustancias interferentes, y causantes de efecto matriz en el análisis, debido a la etapa de limpieza, o *clean up*, mencionada anteriormente; que se traduce en un incremento de la sensibilidad y de los valores de recuperación del método (Perestrelo et al., 2019).

Por otro lado, las técnicas más convencionales de extracción en fase sólida, o SPE (del inglés *solid-phase extraction*), a pesar de ser fácilmente automatizables y aptas para procesos a gran escala, no garantizan una alta recuperación de los analitos diana y necesitan de una serie de pasos y volúmenes altos de disolventes que han ido reduciendo sistemáticamente su aplicación en el análisis de ftalatos en matrices alimentarias (Luís et al., 2021). Por ello, la SPE ha dado lugar a técnicas más eficientes, como la microextracción en fase sólida, o SPME (del inglés *solid-phase microextraction*), que ha sido ampliamente utilizada en la determinación de ftalatos en alimentos (Carrillo et al., 2007; Moreira et al., 2015 y Huang et al., 2020). Esta técnica consiste en el uso de un soporte sólido recubierto de una capa fina compuesta por un determinado material de extracción que se encuentra fijado en una jeringa; y permite simplificar las etapas de extracción, purificación, concentración e inyección a un único paso, lo que resulta beneficioso

en términos de eficiencia, selectividad y sostenibilidad, al no utilizar disolvente (Yang et al., 2015). Además, se reduce la posibilidad de que exista contaminación cruzada en comparación con otras técnicas. La SPME puede emplearse en la modalidad de inmersión directa, o DI-SPME (del inglés *directly immersed solid-phase microextraction*), y en la modalidad de espacio de cabeza, o HS-SPME (del inglés *headspace solid-phase microextraction*), siendo esta última especialmente útil para evitar la interacción de sustancias interferentes de gran peso molecular disueltas en la matriz con la fibra, aunque es únicamente apta para compuestos volátiles y semivolátiles (Fernández-González et al., 2017).

Por último, otra de las modificaciones de la SPE es la extracción en fase sólida dispersiva, o dSPE (del inglés *dispersive solid-phase extraction*). Esta técnica, consiste en la aplicación del sorbente directamente en el disolvente que contiene los analitos, en lugar de estar empaquetado en una columna. De esta manera, el contacto es inmediato y más efectivo (Socas-Rodríguez et al., 2015). En este sentido, cabe destacar la introducción de materiales magnéticos como sorbentes de extracción que simplifican considerablemente el proceso, dando lugar a la dSPE magnética, o m-dSPE (del inglés *magnetic dispersive solid-phase extraction*). En este caso, las propiedades magnéticas permiten una eficaz dispersión del sorbente en la muestra, a la vez que una rápida separación de las fases tras la extracción utilizando un imán. Esto se traduce en la eliminación de sustancias interferentes y en el enriquecimiento de los analitos, así como en la reducción del tiempo de extracción dada la ausencia de una etapa de centrifugación. Además, la posibilidad de diseñar y usar diferentes sorbentes permite que esta técnica sea altamente sensible y selectiva (Pang et al., 2020).

1.7.- QUÍMICA ANALÍTICA SOSTENIBLE

La química verde se caracteriza, en términos generales, por la aplicación del conocimiento y las tecnologías existentes para la reducción o eliminación del uso de sustancias peligrosas durante el desarrollo de cualquier procedimiento químico, con el objetivo de minimizar los riesgos sobre la salud de los trabajadores, y del medio ambiente. En este sentido, Paul Anastas y John Warner publicaron, en 1998, los 12 principios de la química verde, que han servido de guía para el progreso hacia unas metodologías más comprometidas con el medio ambiente y con la seguridad laboral (Anastas y Warner, 1998). Siguiendo esta tendencia, y debido al gran impacto que tiene la química analítica sobre el desarrollo sostenible de la sociedad, Gałuszka y colaboradores detallaron, en 2013, los 12 principios de la química analítica verde, o GAC (del inglés *green analytical chemistry*), que están enfocados, principalmente, en la reducción o eliminación del uso de sustancias químicas en los procedimientos analíticos, la

minimización del consumo eléctrico, la correcta gestión de los residuos y el incremento de la seguridad de los operadores responsables de estas tareas (Gałuszka et al., 2013 y De Marco et al., 2019) (Ver **Figura 1.5**).

En este contexto, la minimización del pretratamiento de la muestra, así como la miniaturización de los equipos utilizados, han demostrado ser estrategias fundamentales en el desarrollo de procedimientos más sostenibles. Los sistemas portátiles reducen enormemente el muestreo, la necesidad de almacenamiento de las muestras, y el transporte de las mismas, además de reducir el impacto medioambiental y permitir una mayor rapidez en la toma de decisiones, realizando medidas *in situ* (Ballesteros-Vivas et al., 2021). Así mismo, el desarrollo de técnicas de GC miniaturizadas, o μ GC, y su variante bidimensional, μ GC- μ GC (Whiting et al., 2019), resulta de especial interés. Además, este tipo de sistemas minimizan el posible deterioro de la muestra derivado del tiempo entre el muestreo y el análisis, a la vez que reducen el consumo energético. Los sistemas μ GC se caracterizan por la compresión de uno o más componentes, tales como la fuente del gas portador o su sistema de bombeo, el analizador o la columna (Regmi et al., 2018). Por otro lado, el uso de la técnica denominada como *Fast-GC* permite reducir en gran medida el tiempo de análisis mediante el uso de columnas de menor diámetro, multicolumnas, flujo turbulento, vacío, y velocidades de gas portador superiores; minimizando el consumo de fase móvil y energía (Armenta y De la Guardia, 2016).

De forma similar, la miniaturización en la LC ha dado lugar a técnicas novedosas, como es el caso de la nano-LC, que, mediante el uso de columnas de pequeño diámetro (columnas capilares) y flujos de fase móvil del orden de nanolitros por minuto, incrementa significativamente la sensibilidad de una medida generando una menor cantidad de residuos y con un menor consumo energético, y, además, se puede acoplar a un sistema ESI-MS (Coppieters et al., 2021). Por otro lado, la aparición de la UHPLC como evolución de la HPLC, que, mediante el uso de columnas de un diámetro menor a dos micrómetros, y un sistema de gestión de la contrapresión permite trabajar a más de 6000 psi, consiguiéndose una separación mucho más rápida y con un menor consumo de disolvente que su homóloga (Nahar et al., 2019).

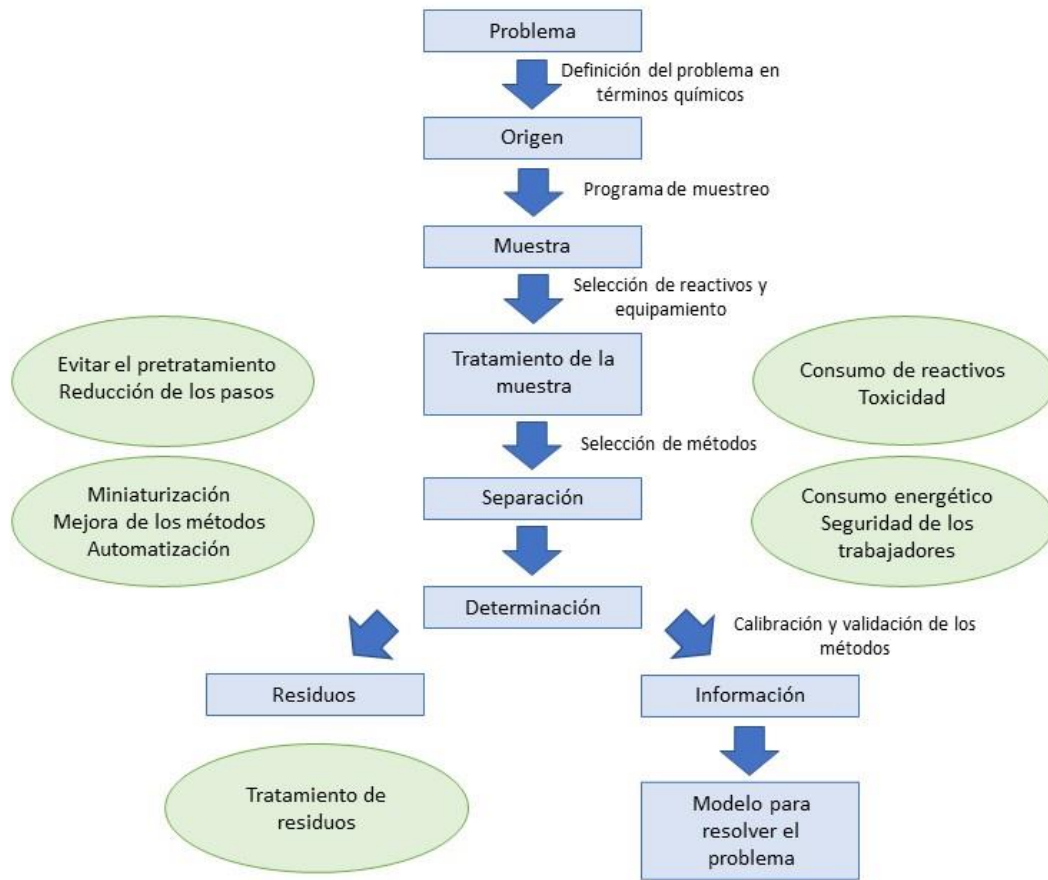


Figura 1.5.- Pasos de un proceso analíticos que deben ser considerados en el marco del paradigma ecológico. (Adaptación de Armenta et al., 2019a).

Por otro lado, y debido al gran número de pasos que pueden estar implicados en el procesamiento de una muestra, tales como la digestión, mineralización, filtración, destilación y extracción, así como al uso de reactivos utilizados, la tendencia de la química sostenible es dirigirse hacia la automatización, integración y miniaturización (Armenta et al., 2019b). La reducción del volumen de disolvente utilizado en un proceso analítico, así como la progresiva sustitución de los más perjudiciales para la salud y el medio ambiente, como son los disolventes derivados del petróleo, es uno de los objetivos más importantes en el área. En este sentido, se ha estudiado la utilización de otros disolventes menos perjudiciales, como son los disolventes eutécticos profundos naturales (NADES, del inglés *natural deep eutectic solvents*), los gases licuados o los fluidos supercríticos, entre otros (Claux et al., 2021). Además, la aplicación de diferentes factores, tales como los ultrasonidos, la agitación mecánica, el calentamiento mediante microondas y el burbujeo de aire ha permitido el desarrollo de diversos métodos de

extracción medioambientalmente compatibles, ya que reducen la dependencia del disolvente de extracción, a la par que incrementan la eficiencia y disminuyen los límites de detección y cuantificación del método (Rutkowska et al., 2017). En este sentido, el desarrollo de sorbentes magnéticos para procedimientos de extracción en fase sólida ha contribuido al desarrollo de métodos de extracción más sencillos mediante la implementación de una fase de separación mediada por un imán que no requiere, por lo tanto, pasos de secado al vacío o centrifugación, reduciendo el tiempo empleado y la energía consumida (Ríos y Zougagh, 2016).

1.8.- NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS Y SU APLICACIÓN EN EL CAMPO DE LA QUÍMICA ANALÍTICA

Las nanopartículas, y concretamente, las nanopartículas magnéticas, o m-NPs (del inglés *magnetic nanoparticles*) se definen como aquellas moléculas submicrómicas formadas por subunidades inorgánicas u orgánicas cuyas propiedades difieren del resto de partículas de mayor tamaño (Martínez et al., 2021), tales como el superparamagnetismo, biocompatibilidad y estabilidad, entre otras muchas (Shabestari-Khiabani et al., 2017). Debido a ello, han sido ampliamente estudiadas en muy diversos campos de aplicación. Entre ellos, destacan las aplicaciones biomédicas en lo que respecta a la inmovilización de proteínas (Xu et al., 2009), como transportador de medicamentos en terapias oncológicas (Lee y Kang, 2017) y como soporte de biosensores de miRNA (Zhang et al., 2018) y de parámetros asociados al estrés oxidativo (Wang et al., 2015). Es también muy relevante la aplicación de estos materiales en la fabricación de sensores ópticos y electroquímicos (Socas-Rodríguez et al., 2020), así como en catálisis (Liu et al., 2010) y en remediación medioambiental (Guo et al., 2015).

Respecto a las aplicaciones en el campo de la química analítica, la convergencia de las tendencias de miniaturización y de las aplicaciones de las m-NPs, ha permitido el desarrollo de la técnica magnética micro-dispersiva de extracción en fase sólida, o m- μ -dSPE (del inglés *magnetic-micro-dispersive solid phase extraction*). Esta técnica consiste en el uso de m-NPs que, combinadas con diferentes materiales, ha llevado al desarrollo de sorbentes con una alta selectividad y capacidad de extracción, así como con una alta velocidad de adsorción/desorción (Socas-Rodríguez et al., 2020). Esto ha permitido desarrollar métodos rápidos, debido a que el equilibrio entre los analitos y el sorbente se alcanza con relativa rapidez, incluso utilizando una pequeña cantidad de sorbente dada la capacidad dispersiva del mismo (Pang et al., 2020). Además, el proceso resulta mucho más simple que en un procedimiento de SPE convencional, ya que el sorbente no necesita estar retenido en una columna o en un cartucho (Kepekci-Tekkeli y Durmus, 2019). Además, la capacidad magnética del sorbente permite evitar etapas de centrifugación o

filtración, ya que puede retenerse mediante el uso de un imán (Alipanahpour-Dil et al., 2019). Estos materiales presentan un pequeño tamaño, variable entre 1 y 100 nanómetros al mismo tiempo que una gran área superficial, resultando de gran interés en el ámbito analítico (Socas-Rodríguez et al., 2020).

En términos generales, la técnica se basa en la interacción específica entre el sorbente y los analitos de interés. Una vez se produce el proceso de adsorción, es posible realizar la separación magnética del par sorbente-analito respecto de la muestra mediante la interacción magnética de la nanopartícula con un imán, para la posterior desorción de los compuestos de interés mediante la elución con un disolvente o la aplicación de calor (Vasconcelos y Fernandes, 2017) (ver **Figura 1.6**).

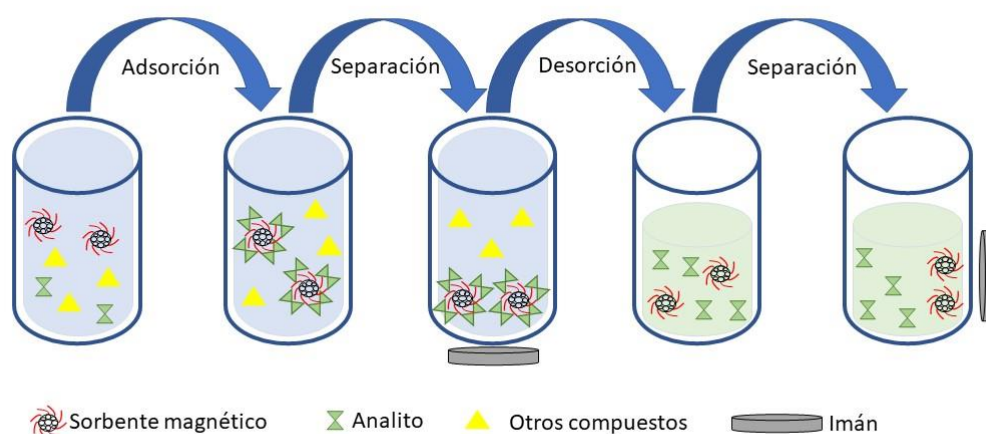


Figura 1.6.- Representación esquemática del funcionamiento de la m- μ -dSPE.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, dichas nanopartículas pueden combinarse con diferentes materiales. Entre ellos, destacan los materiales carbonáceos, de gran utilidad en la química analítica debido a su distribución laminar de átomos de carbono, favoreciendo la estabilidad térmica y química, la resistencia mecánica, y proporcionando una gran superficie específica (Reinholds et al., 2018). Por otra parte, destaca también el uso de redes metalorgánicas, o MOFs (del inglés *metal-organic frameworks*), como sorbentes. Estas estructuras están compuestas por un metal central, o clúster de metales, coordinado con una red tridimensional de ligandos orgánicos (Vaitsis et al., 2019). De la misma manera, se han utilizado redes orgánico-covalentes, o COFs (del inglés *covalent organic frameworks*), en la síntesis de sorbentes magnéticos para la determinación de ftalatos en matrices alimentarias (Pang et al., 2020). Por otra parte, es relevante el uso de polímeros huecos porosos de impronta

molecular, o HP-MIP (del inglés *hollow porous-molecularly imprinted polymers*), sintetizados sobre una nanopartícula de sílice de sacrificio, que es eliminada posteriormente para dar lugar al sorbente poroso. Este tipo de sorbentes salva las dificultades a las que se enfrenta el uso de polímeros de impronta molecular convencionales, tales como la lenta transferencia de masa (Chisvert et al., 2019). Por último, las m-NPs pueden ser recubiertas por polímeros gracias a la presencia de grupos funcionales en estos últimos. Esto, junto a la alta estabilidad de los polímeros, ha permitido el desarrollo de esta combinación como sorbentes de extracción para analitos en diversas matrices alimentarias (Khan et al., 2019). En este caso, es posible encontrar polímeros tanto artificiales, unidos a las nanopartículas generalmente mediante enlaces covalentes (polipirrol, polidopamina o polianilina) como naturales, unidos a las nanopartículas, por lo general, mediante interacciones electrostáticas (agarosa, amilosa de cadena corta, o dextreno) (Xie et al., 2014). Por otro lado, y respecto al tipo de nanopartícula, las más utilizadas son las nanopartículas de óxido de hierro, o SPIONs (del inglés *superparamagnetic iron oxide nanoparticle*) que incluyen, fundamentalmente, a la magnetita, Fe_3O_4 y maghemita, Fe_2O_3 (Kepekci-Tekkeli y Durmus, 2019).

Respecto a la utilización de este tipo de nanomateriales en la determinación de ftalatos en matrices alimentarias, en 2019, Tong y colaboradores desarrollaron un método basado en m-dSPE utilizando submicrotubos de Fe_3O_4 con carbon-grafito como sorbente en combinación con un sistema de HPLC, equipado con un detector UV/Vis para el análisis de la concentración de cinco ftalatos diferentes en bebidas y botellas de plástico, obteniendo excelentes resultados en cuanto a la eficacia de la separación y de la extracción, y de la reutilización del sorbente (Tong et al., 2019). Además, ese mismo año, Moazzen y colaboradores utilizaron nanopartículas de plata y óxido de hierro recubiertas de nanotubos de carbono para la extracción de ftalatos en bebidas carbonatadas, utilizando un sistema de GC acoplado a un espectrómetro de masas para su separación y detección (Moazzen et al., 2019). De forma similar, en 2021, Rodríguez-Ramos y colaboradores desarrollaron un método de extracción y cuantificación de once ftalatos en gelatinas y zumos de manzana mediante la utilización de un sorbente compuesto de nanopartículas de Fe_3O_4 recubiertas de un polímero de polipirrol para la extracción, utilizando un sistema de UHPLC acoplado a un espectrómetro de masas en tándem con un analizador tipo QqQ para su separación y detección (Rodríguez-Ramos et al., 2021).

Objetivos

2.- OBJETIVOS

El objetivo principal de este Trabajo de Fin de Máster es el desarrollo de una nueva metodología analítica para la determinación de un grupo de migrantes de plásticos en gelatinas alimentarias haciendo uso de la m- μ -dSPE como técnica de extracción. Para lograrlo, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- Realizar una búsqueda bibliográfica exhaustiva de la aplicación de este tipo de técnicas a la determinación de ftalatos en matrices alimentarias, haciendo especial hincapié en aquellas relacionadas con el uso de nuevos materiales sostenibles, como las nanopartículas magnéticas.
- Seleccionar un grupo de ftalatos concreto teniendo en cuenta su influencia sobre la salud humana, y su presencia en alimentos debido a procesos de migración.
- Evaluar la influencia de distintos factores que pueden tener influencia sobre la eficiencia precisión, sensibilidad y robustez de la técnica desarrollada, haciendo uso tanto de una optimización paso a paso como de un diseño experimental.
- Hacer uso de la UHPLC acoplada a la espectrometría de masas en tándem para llevar a cabo la separación y la cuantificación de los compuestos de interés.
- Validar el método desarrollado mediante estudios de reproducibilidad, calibración y recuperación, así como calcular los límites de cuantificación del método, con el objetivo de garantizar la utilidad y fiabilidad de la aplicación del mismo.
- Aplicar la metodología desarrollada al análisis de muestras comerciales de diferente marca y formato con el objetivo de demostrar su aplicabilidad en el ámbito de la seguridad alimentaria, así como determinar la posible presencia de ftalatos en dichas muestras.

Parte experimental

3.- PARTE EXPERIMENTAL

3.1.- REACTIVOS, PATRONES, DISOLVENTES Y DISOLUCIONES

- Acetonitrilo (ACN) de grado LC/MS Lichrosolv® (Merck).
- Acetona de grado LC/MS Lichrosolv® (Merck).
- Metanol (MeOH) de grado LC/MS Lichrosolv® (Merck).
- Heptano de grado LC/MS Lichrosolv® (Merck).
- Acetato de etilo (AcOEt) de grado HPLC Chromasol V® (Fisher Scientific).
- Etanol absoluto (EtOH) para síntesis (Scharlau).
- Agua Milli-Q con una resistividad menor de 18 MΩ·cm, y un contenido en materia orgánica no superior a los 2 ppb obtenida a partir de un equipo Milli-Q Gradient A10 (Millipore).
- Ácido fórmico de la gama LC-MS Ultra, Honeywell™ Fluka™, del 98% de pureza (Fisher Scientific).
- Ácido sulfúrico, de pureza superior al 96% (Panreac Química).
- Di-metil ftalato (DMP), DEP, DAP, di-propil ftalato (DPP), DBP, DIBP, di-2-metoxietil ftalato (DMEP), di-isopentil ftalato (DIPP), DNPP, di-2-etoxietil ftalato (DEEP), BBP, dicitclohexil ftalato (DCHP), DHP, DBEP, DEHA, DEHP, DNOP, DINP, DIDP y 3,4,5,6-DHP-d₄ (DHP-d₄), de pureza superior al 97% (Sigma-Aldrich Chemie y Dr. Ehrenstorfer). Las disoluciones de trabajo se prepararon en ACN, y se conservaron a -4 °C en ausencia de luz.
- Disolución electrolítica CRISOLYT A de KCl 3 M para el mantenimiento de la membrana del pH-metro (Crison).
- Disoluciones tampón de pH 4,0 y 7,0 para la calibración del pH-metro (Crison).
- Disolución NOCHROMIX® para la limpieza del material de vidrio (Sigma Aldrich Chemie).
- Hidróxido sódico anhidro, grado reactivo, de pureza superior al 98% (Sigma Aldrich Chemie).
- Ácido clorhídrico para análisis de 25% de pureza (Merck).
- Sulfato de hierro (II) heptahidratado de 88,9% de pureza (Sigma Aldrich Chemie).
- Cloruro de hierro (III) de pureza superior al 99% (Sigma Aldrich Chemie).
- Chitosán (Chi) de bajo peso molecular (Sigma Aldrich Chemie).
- Anilina ReagentPlus®, de pureza superior al 99% (Sigma Aldrich Chemie).
- Persulfato amónico de grado reactivo, de pureza superior al 98% (Sigma Aldrich Chemie).
- Ácido acético glacial de grado reactivo, de pureza superior al 99% (Sigma Aldrich Chemie).

3.2.- MATERIAL

- Vasos de precipitados de 1000 mL, 500 mL, 250 mL, 100 mL y 50 mL (Scharlau y Simax).
- Probetas de 250 mL, 50 mL, 25 mL y 10 mL (Labbox y Pobel).
- Matraces Erlenmeyer de 50 mL (VWR International y Witeg).
- Matraces aforados de 25 mL de clase A (VWR International).
- Viales de vidrio de 2 mL para LC-MS (12x32 mm) con tapa de rosca de politetrafluoroetileno (PTFE) y septum de silicona pre-perforado (*Waters Chromatography*[®]).
- Viales de inserción de fondo cónico de 300 µL para viales de vidrio de 2 mL (Sigma Aldrich Chemie).
- Viales de almacenamiento de 22 mL de color topacio con tapa sólida de PTFE Supelco[®] (Sigma Aldrich Chemie).
- Botellas de vidrio de 500 mL (VWR International).
- Filtros de membrana Durapore[®] de polifluoruro de vinilideno (PVDF) de 0,22 µm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro (Merck).
- Filtros de tubo de centrífuga de acetato de celulosa Corning[®] Costar[®] Spin-X[®] de 0,22 µm de tamaño de poro (Sigma Aldrich Chemie).
- Puntas desechables de micropipeta de diferentes volúmenes libres de ftalatos (Gibson).
- Guantes de nitrilo desechables libres de ftalatos Semperguard[®] Nitrile Xpert powder-free (Sempermed).
- Barras magnéticas de PTFE de diversos tamaños (VWR international).
- Imán de disco compuesto por Nd-Fe-B de 30mm x 17mm recubierto con Ni-Cu-Ni, de Supermagnete (Webcraft GmbH).

3.3.- EQUIPOS

3.3.1.- APARATOS

- Rotavapor RV 10 basic equipado con un baño termostático HB 10 (IKA) y una bomba de control de vacío CVC 3000 (VWR International).
- Rotavapor modelo R-200 equipado con un baño termostático B-490, bomba de vacío modelo V-500 y controlador de vacío modelo V-800 (Büchi Labortechnik).
- Baño de ultrasonidos, modelo 3150MT de 5,5 L de capacidad (Branson).
- Agitador magnético RCT basic con control de temperatura integrado (IKA).
- Centrífuga 5415 D con controlador de tiempo y velocidad máxima de 13200 r.p.m. (Eppendorf).
- Estufa CONTERM de 150 litros y temperatura máxima de 250 °C (JP Selecta).
- Mufla CWF 11/13 de 13 L de capacidad y temperatura máxima de 1100 °C (Carbolite).

- Sistema de purificación de agua Milli-Q gradient A10 (Millipore).

3.3.2.- INSTRUMENTOS

- Micropipetas de volumen variable de 0,5-10 μL , 2-20 μL , 10-100 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL y 500-5000 μL (Brand y Gilson).
- Balanza analítica LA120S de precisión 0,1 mg y capacidad máxima de pesada de 120 g (Sartorius).
- pH-metro con sensor de temperatura GLP-22 (Crison).
- Analizador de potencial Z modelo Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments).
- Cromatógrafo de líquidos Acquity UPLC[®] H-class (*Waters Chromatography*[®]) equipado con una bomba cuaternaria y un automuestreador con aguja de flujo continuo acoplado a un detector de MS Xevo QqQ (*Waters Chromatography*[®]) utilizando ESI como fuente de ionización. Las separaciones se llevaron a cabo en una columna Acquity UPLC[®] BEH C₁₈ (50 mm x 2,1 mm, 1,7 μm) usando una precolumna (5 mm x 2,1 mm, 1,7 μm) con la misma fase estacionaria, ambas de la marca *Waters Chromatography*[®].

3.3.3.- PROGRAMAS INFORMÁTICOS

- Masslynx[™] de *Waters Chromatography*[®] para el control del equipo de cromatografía y del espectrómetro de masas, así como para el procesamiento de los datos.
- STATGRAPHICS[™] Centurion XVI para la elaboración y el análisis del diseño experimental.
- Graphpad Prism[®] para tratamiento de datos y análisis estadístico.
- Microsoft Office[®] 365 para todas las labores de tratamiento de datos, análisis estadístico, redacción de la memoria y preparación de la defensa del Trabajo de Fin de Máster.

3.4.- PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

3.4.1.- SÍNTESIS DEL SORBENTE

Las nanopartículas magnéticas mNP-Chi@polianilina (PANI) utilizadas en el presente trabajo se sintetizaron mediante un método de coprecipitación de acuerdo con el trabajo desarrollado por Razavi y colaboradores en 2018 (Razavi, N. y Es'haghi, 2018) con algunas modificaciones. Para ello, se prepararon las disoluciones de Fe²⁺/³⁺ (disolviendo 6,48 g de FeCl₃ y 5,56 g de FeSO₄·7 H₂O en 200 mL de agua) y de chitosán (disolviendo 1,25 g de chitosán en 250 mL de ácido acético al 1% (v/v), para ser posteriormente agitada a 800 r.p.m. y calentada a 50 °C durante 50 minutos). A continuación, la primera disolución se añadió a la segunda, para posteriormente añadir gota a gota y bajo agitación una disolución de 600 mL de NaOH 1,25M desgasificada con N₂ y calentada a 80 °C.

Posteriormente, las nanopartículas resultantes modificadas con chitosán se decantaron magnéticamente y se lavaron en repetidas ocasiones con agua, agua/etanol 1:1 (v/v) y etanol. A continuación, se dejaron secar durante toda la noche a 60 °C.

El segundo paso de la síntesis consistió en la adición de 2 g de las nanopartículas preparadas previamente y 0,25 g de anilina a 100 mL de agua. Esta disolución resultante se acidificó con HCl 1M hasta pH 2 y se agitó durante 45 minutos. A continuación, se añadió 0,3 g de persulfato amónico como iniciador, y se dejó durante toda la noche en agitación a temperatura ambiente. Finalmente, las nanopartículas mNPs-Chi@PANI precipitadas se recolectaron utilizando un imán, y se lavaron en repetidas ocasiones con agua, agua/etanol 1:1 (v/v) y etanol, para posteriormente dejarse secando a 60 °C durante toda la noche.

3.4.2.- LAVADO DEL SORBENTE

Con la finalidad de eliminar las posibles interferencias derivadas del proceso de síntesis y de los materiales de partida, así como la posible contaminación del sorbente por los analitos de estudio, se llevó a cabo una limpieza previa del mismo de la manera que se indica a continuación. En primer lugar, se realizaron diez lavados con 10 mL de ACN por cada gramo de sorbente en un matraz Erlenmeyer. Estos lavados consistieron en la agitación vigorosa de la suspensión del sorbente en el disolvente y una deposición magnética de 5 minutos utilizando un imán situado bajo el matraz. Para finalizar cada ciclo de lavado, se realizó una decantación del disolvente utilizando un recipiente para su posterior eliminación controlada. Por último, se realizó un secado del sorbente en un rotavapor a una temperatura de 40 °C y a una presión de 165 mbar durante 15 minutos para su posterior evaluación mediante UHPLC-MS/MS.

El sorbente limpio y seco se depositó en un tubo vidrio de color topacio dentro de un desecador para su almacenamiento.

3.4.3.- PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para la optimización y validación del método analítico desarrollado en el presente trabajo se utilizó como matriz una gelatina neutra comercial. Para su preparación, se pesaron 10 g de gelatina neutra en polvo, y se disolvieron en 100 mL de agua Milli-Q a temperatura ambiente. Tras una breve agitación, se añadieron 400 mL de agua Milli-Q cerca de su punto de ebullición, y se disolvió completamente. La disolución resultante se dejó enfriar a temperatura ambiente, se transfirió a una botella con un tapón de rosca, y se almacenó en una nevera a 4 °C.

3.4.4.- PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

En primer lugar, se ajustó el pH de la gelatina a 12 utilizando una disolución de NaOH 6M. Posteriormente, se introdujeron 5 mL de la misma en un matraz aforado de 25 mL que contenía 40 mg del sorbente. A continuación, se enrasó hasta 25 mL con agua Milli-Q ajustada a pH 12. Tras ello, el matraz se agitó manualmente durante 1 minuto, y se realizó una deposición magnética durante 10 minutos situando un imán en la parte inferior del mismo. Seguidamente, se decantó la fracción líquida, y el sorbente se secó bajo un suave flujo de nitrógeno. Una vez seco, se añadió 1 mL de ACN como disolvente de elución, y se realizó, de nuevo, una agitación manual durante 1 minuto seguida de una deposición magnética de 5 minutos, y se decantó el disolvente en un matraz Erlenmeyer de 50 mL con tapa. El disolvente se eliminó utilizando un rotavapor a una temperatura de 40 °C y una presión de 165 mbar durante 15 minutos. Una vez seco, se realizó la reconstitución de los analitos en 250 µL de fase móvil inicial (50/50 (v/v) ACN/H₂O, 0,1% (v/v) ácido fórmico). Este volumen se transfirió a un tubo de centrifuga con filtro de 0,22 µm *costar*[®] *Spin-X* de 2 mL de capacidad. La centrifugación para filtrar las muestras se realizó a 13000 r.p.m. durante 7 minutos, y tras ella, se transfirió el volumen filtrado a un inserto de 300 µL en viales de cromatografía líquida de la marca *Waters Chromatography*[®].

3.4.5.- SEPARACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS ANALITOS MEDIANTE UHPLC-MS/MS

La separación y detección de los analitos se realizó mediante UHPLC-MS/MS utilizando el equipo descrito previamente. Para dicha separación cromatográfica en fase reversa, se utilizó una columna ACQUITY UPLC[®]C₁₈ 1,7 µm termostaticada a 40 °C con un flujo de fase móvil de 0,3 mL/min y un volumen de inyección de 5 µL. Las fases móviles utilizadas consistieron en agua Milli-Q filtrada utilizando un filtro de tamaño de poro de 0,22 µm con ácido fórmico al 0,1% (v/v) (A), y ACN de grado LC/MS con ácido fórmico al 0,1% v/v (B). Así mismo, el gradiente utilizado se muestra a continuación, en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.4.- Gradiente empleado en la separación de ftalatos mediante UHPLC-MS/MS.

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	50	50
4	30	70
7	0	100
8	0	100
9	50	50
11	50	50

El modo de trabajo del espectrómetro de masas utilizado para la detección y cuantificación de los analitos fue MRM, del inglés *multiple reaction monitoring*, utilizando un ion precursor y dos iones productos. Respecto a las condiciones de trabajo del equipo, se estableció un voltaje del capilar de 3.5 kV y una temperatura de la fuente de 150 °C. La temperatura de desolvatación se estableció en 500 °C, y el flujo del gas del cono en 50 L/h.

El procedimiento de detección se optimizó previamente a la realización de este trabajo mediante la perfusión directa en el espectrómetro de masas de cada uno de los estándares de los ftalatos a una concentración de 2 mg/L en la composición inicial de la fase móvil (50/50 (v/v) ACN/H₂O, 0,1% (v/v) ácido fórmico). De esta manera, para la determinación de cada uno de los analitos se seleccionó una transición para la cuantificación, la de mayor intensidad, y otra para la confirmación del analito, la siguiente de mayor intensidad.

3.5 LAVADO DEL MATERIAL

La limpieza del material volumétrico consistió en un primer lavado con agua y jabón, desechando toda la fracción sólida correspondiente al sorbente utilizado en un contenedor específico. En segundo lugar, se dejó sumergido el material en una disolución de NOCHROMIX® en ácido sulfúrico durante 24 horas, para posteriormente ser enjuagado varias veces con agua Milli-Q. Por último, se realizó un lavado con MeOH de grado LC-MS, y se dejó secando a temperatura ambiente.

Por otra parte, el material no volumétrico de vidrio se lavó con agua y jabón abundante, para posteriormente ser secados en una estufa a 80 °C durante, al menos, un día. Tras ello, el material se depositó en una mufla a 550 °C durante 5h. Finalmente se almacenó tapado en los armarios para su posterior uso.

En lo que respecta al material de teflón, este se lavó con agua y jabón abundante. A continuación, se realizaron 3 lavados con 50/50 (v/v) H₂O/EtOH seguidos de 15 minutos de ultrasonidos cada uno. Para finalizar, se realizaron 2 lavados con MeOH grado LC/MS y se dejó secar el material a temperatura ambiente.

3.6.- SELECCIÓN Y ANÁLISIS DE MUESTRAS COMERCIALES

La aplicación del método optimizado se llevó a cabo en un grupo de 10 muestras de gelatinas comerciales preparadas a la misma concentración que la matriz con la que se realizó la optimización y validación del método analítico, es decir, 20 g de gelatina por litro de agua. Las muestras fueron preparadas en agua Milli-Q el mismo día del análisis. Algunas propiedades de interés de las matrices analizadas, tales como el sabor, formato, y tipo de recipiente, se describen en la **Tabla 3.2**. Las muestras se analizaron siguiendo el procedimiento m- μ -dSPE descrito previamente en este documento.

Tabla 3.5.- Sabor, formato y tipo de recipiente de las muestras de gelatina analizadas.

Muestra	Sabor	Formato	Tipo de recipiente
1	Arándano	En polvo	Recipiente de aluminio
2	Limón	En polvo	Recipiente de aluminio
3	Neutra	En láminas	Recipiente de plástico
4	Frutas del bosque	Líquido	Envase de plástico
5	Fresa	En polvo	Recipiente de aluminio
6	Frutas mediterráneas	Sólido	Envase de plástico
7	Fresa	En polvo	Recipiente de plástico
8	Limón	En polvo	Recipiente de plástico
9	Limón	Sólido	Envase de plástico
10	Cola	Sólido	Envase de plástico

Resultados y discusión

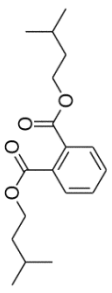
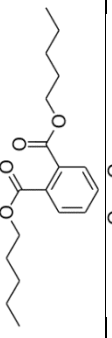
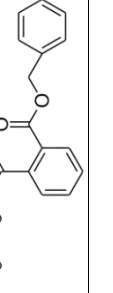
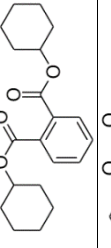
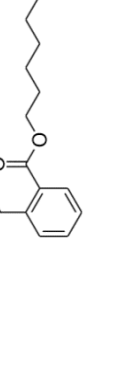
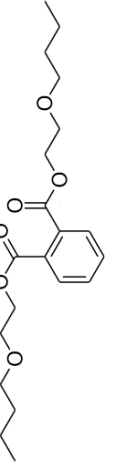
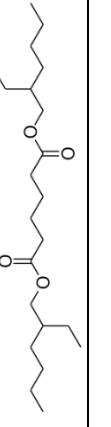
4.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- CARACTERÍSTICAS DE LOS COMPUESTOS ESTUDIADOS

Para realizar este trabajo, se ha seleccionado un grupo de compuestos formado por seis ftalatos y un adipato: DIPP, DNPP, BBP, DCHP, DHP, DBEP y DEHA. El principal motivo de la evaluación de estos compuestos en las matrices alimentarias, como la gelatina estudiada en este caso, es el hecho de que se utilizan comúnmente como plastificantes en los envases y envoltorios. Esto permite que, bajo determinadas circunstancias, puedan migrar hacia el alimento, y ser ingeridos por la población, causando un potencial riesgo sanitario debido a su actividad disruptora del sistema endocrino. Todos los compuestos estudiados muestran un valor de área superficial polar, o TPSA (del inglés *topological polar surface area*) de 52,6 Å², a excepción del DBEP, que asciende a 71,1 Å². Este índice, calculado de forma computacional mediante el uso de una herramienta de Molinspiration® Cheminformatics en base a los átomos hidrofílicos de la molécula y su superficie relativa, es un indicador de la capacidad que tiene un determinado compuesto para penetrar las membranas celulares y, por lo tanto, tener actividad biológica. Concretamente, todas las moléculas con un valor de TPSA menor de 90 Å² son capaces de penetrar plenamente la barrera hematoencefálica, y actuar a nivel del sistema nervioso central. Es por ello que, determinar la concentración de estos compuestos en los alimentos, sobre todo en aquellos destinados a la alimentación infantil, es muy importante en el contexto de la seguridad alimentaria.

Los ftalatos, tal y como se ha señalado anteriormente, son compuestos derivados de la esterificación dialquílica o arílica del ácido benceno-1,2-dicarboxílico. Es común encontrar, por lo tanto, cadenas radicales de entre 1 y 13 átomos de carbono. La estructura de los compuestos estudiados, así como algunas propiedades fisicoquímicas de interés se encuentran en la **Tabla 4.1**. Tal y como se puede observar, se trata de compuestos con un alto punto de ebullición, comprendido en el rango entre 270 y 417 °C. Esta última característica es justamente la que permite su aplicación como plastificantes en la industria de los plásticos y, a su vez, es un indicador de su capacidad para ser liberado al medio ambiente.

Tabla 4.1.- Ftalatos estudiados y propiedades fisicoquímicas de interés.

Nombre	Abreviatura	Masa molecular ⁽¹⁾ (g/mol)	Fórmula molecular	Solubilidad en agua (mg/mL, 20 °C)	Densidad ⁽³⁾ (g/mL, 20°C)	Punto de ebullición (°C)	Punto de fusión (°C)	Estructura
Diisopentil ftalato	DIPP	306,4	C ₁₈ H ₂₆ O ₄	< 1 ⁽¹⁾	1,028	339 ⁽⁴⁾	<-25 ⁽⁴⁾	
Dipentil ftalato	DNPP	306,4	C ₁₈ H ₂₆ O ₄	< 1 ⁽¹⁾	1,022	342 ⁽¹⁾	<-55 ⁽¹⁾	
Benzil butil ftalato	BBP	312,4	C ₁₉ H ₂₀ O ₄	< 1 ⁽¹⁾⁽²⁾	1,113	370 ⁽¹⁾	>-31 ⁽¹⁾	
Diciclohexil ftalato	DCHP	330,4	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	Insoluble ⁽¹⁾	0,718	200-235 ⁽¹⁾	62,2-65 ⁽¹⁾	
Dihexil ftalato	DHP	334,4	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	Insoluble ⁽¹⁾	0,995	350 ⁽¹⁾	-57,7 ⁽¹⁾	
Di-(2-butoxietil) ftalato	DBEP	366,4	C ₂₀ H ₃₀ O ₆	300 ⁽³⁾	1,060	270 ⁽²⁾	-55 ⁽²⁾	
Di-(2-etilxil) adipato	DEHA	370,6	C ₂₂ H ₄₂ O ₄	< 1 ⁽¹⁾	0,925	417,2 ⁽¹⁾	-67,7 ⁽¹⁾	

(1) De acuerdo con CAMEO Chemicals DataBase, National Toxicology Program, Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health (NTP). 1992. National Toxicology Program Chemical Repository Database. Research Triangle Park, North Carolina.

(2) Medido a 25 °C.

(3) De acuerdo con Hazardous Substances Data Bank (HSDB), USEPA; Drinking Water Criteria Document for Phthalic Acid Esters (PAES). U.S. EPA, Environ Criter Assess Off, Cincinnati, OH ECAO-CIN-D009, NTIS PB92-173442 (1991).

(4) De acuerdo con el documento de apoyo para la identificación del DIPP de la Agencia Europea de productos Químicos (ECHA).

Otro parámetro relevante es el coeficiente de reparto octanol-agua (K_{ow}), que se define como la fracción de concentraciones en el equilibrio en una mezcla octanol-agua. Este parámetro permite estimar no solamente la bioacumulación y biodegradación, sino la distribución de estos contaminantes en los alimentos, dependiendo de su naturaleza (Yang et al, 2015). Por norma general, el logaritmo de K_{ow} incrementa según lo hace el tamaño de la cadena alquílica, ya que los compuestos se vuelven más apolares. Por ello, los ftalatos de cadena larga serán menos hidrofílicos que aquellos de cadena corta.

4.2.- MÉTODO CROMATOGRÁFICO

La separación y cuantificación de los compuestos estudiados se llevó a cabo utilizando un sistema UHPLC-MS/MS empleando las condiciones descritas en la sección 3.4.5. Dichas condiciones, previamente optimizadas en el laboratorio (Santana-Mayor et al., 2018), permitieron la correcta separación de todos los analitos a nivel de línea base, incluidos los isómeros DIPP y DNPP, cuya cuantificación por separado en un espectrómetro de masas no es posible sin la previa separación cromatográfica. El gradiente empleado se muestra en la Tabla 3.1. Los tiempos de retención de cada compuesto estudiado se indican en el cromatograma mostrado en la **Figura 4.1**, con un tiempo de análisis inferior a 9 minutos, así como las intensidades relativas de cada pico.

Por otra parte, y de acuerdo con las directrices de Decisión 2002/657/CE de la Comisión Europea, la detección y cuantificación de los compuestos estudiados se realizó utilizando cuatro puntos de identificación, la molécula protonada como ion precursor, y dos iones producto, además del tiempo de retención específico de cada compuesto. La tolerancia máxima permitida en la variabilidad de la ratio entre el área del ion precursor y los iones producto fue del 20% con el fin de garantizar la correcta identificación de los compuestos estudiados. En la **Tabla 4.2** se recogen las transiciones elegidas para la identificación de los compuestos estudiados, seleccionadas en base a su intensidad; así como los valores de voltaje de cono y energía de colisión.

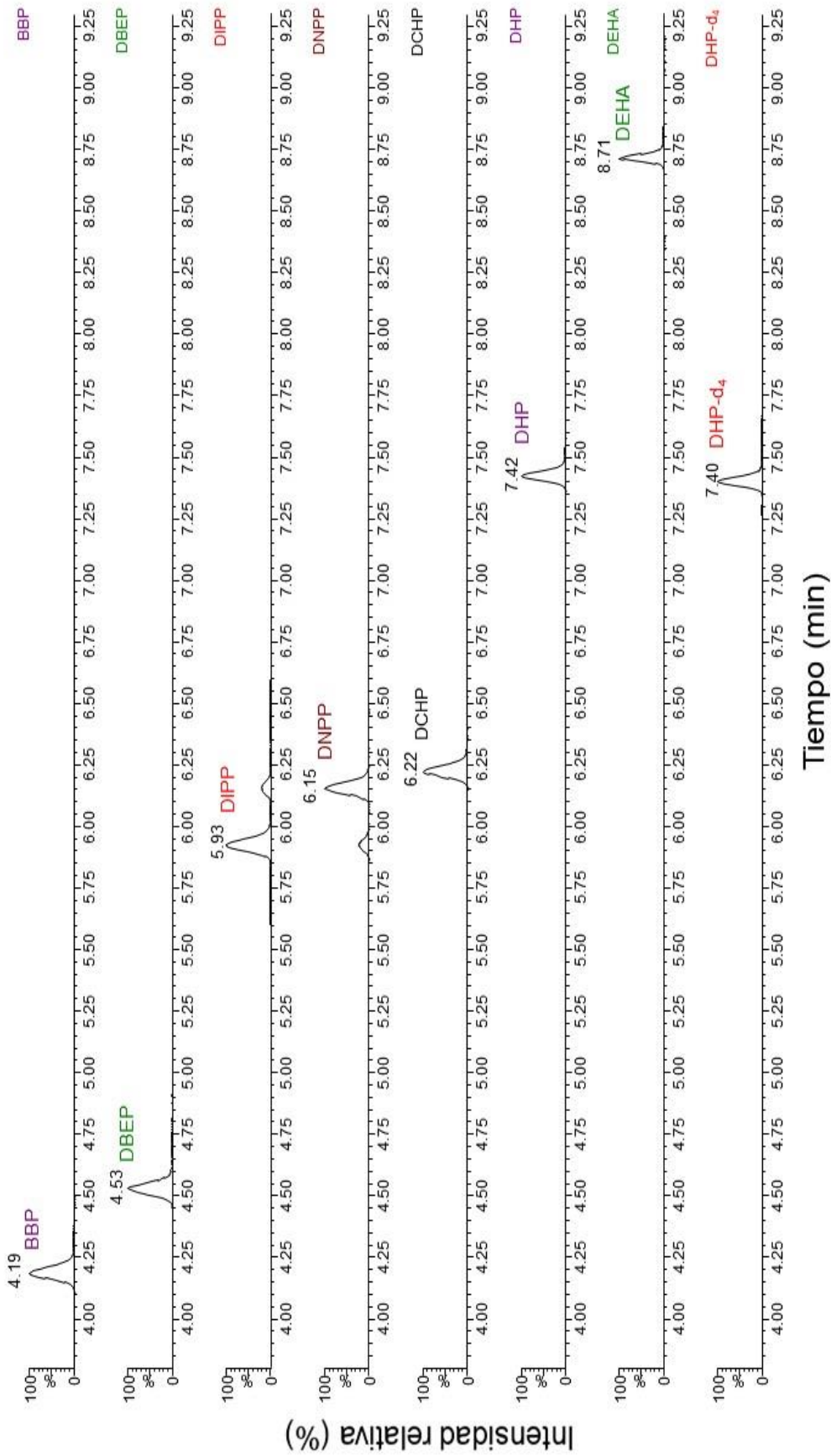


Figura 4.1.- Cromatograma de separación realizada mediante UHPLC-MS/MS de los compuestos estudiados a una concentración inyectada de 125 µg/L. Volumen de inyección: 5 µL. Flujo de fase móvil: 0.3 mL/min. Fase móvil (50/50 (v/v) ACN/H₂O, 0.1% (v/v) ácido fórmico). Temperatura de la columna: 40 °C.

Tabla 4.2.- Parámetros de transición QqQ-MS/MS de los analitos estudiados y IS.

Analito	Masa molecular (g/mol)	MRM (m/z)	Voltaje de cono (V)	Energía de colisión (V)
DIPP	306,4	307,22 > 42,94	22	28
		307,22 > 72,95	22	14
DNPP	306,4	307,22 > 148,93	22	14
		307,22 > 219,00	22	8
BBP	312,4	313,36 > 90,90	22	16
		313,36 > 204,98	22	8
DCHP	330,4	331,22 > 148,94	22	26
		331,22 > 166,94	22	12
DHP	334,4	335,05 > 148,89	24	14
		335,05 > 233,00	24	8
DBEP	336,4	367,23 > 44,88	18	24
		367,23 > 54,57	18	16
DEHA	370,6	371,4 > 110,92	24	24
		371,4 > 128,98	24	16
DHP-d ₄	338,31	339,31 > 152,95	22	12
		339,31 > 237,06	22	8

4.3.- OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE EXTRACCIÓN

Con el objetivo de maximizar la capacidad de extracción de los analitos de interés, así como de garantizar la mayor reproducibilidad y robustez del método, minimizando el uso de disolventes y reactivos, e incrementando la rapidez de todo el procedimiento; se realizó una optimización de las condiciones de extracción, haciendo especial hincapié en cinco factores considerados críticos para la misma. Estos factores fueron: el grado de recubrimiento del sorbente, el disolvente de elución utilizado para la desorción y su volumen, el pH de la muestra y la proporción sorbente-muestra. Para esto, en primer lugar, se realizó, una evaluación paso a paso con el objetivo de optimizar el grado de recubrimiento y el tipo de disolvente de elución. A continuación, se llevó a cabo un diseño experimental para optimizar los tres factores restantes: el pH, el volumen de disolvente de elución, y la proporción sorbente-muestra.

Todos los experimentos realizados para la optimización de las condiciones de extracción se realizaron por triplicado partiendo de una disolución formada por 5 mL de muestra de gelatina y 20 mL de agua Milli-Q enriquecida con los ftalatos seleccionados a una concentración de 125 µg/L. Como estándar interno (IS) se utilizó el DHP-d₄. La elección de un compuesto deuterado

isótopo de un analito estudiado como IS, se debe a que su ratio de extracción es similar a la de los analitos de interés, así como el comportamiento cromatográfico en términos de co-elución y tiempos de retención y la respuesta a la ionización por ESI en la etapa de MS (Davison et al. 2013). En general, esto resulta en una gran ventaja para corregir los errores instrumentales y derivados del procedimiento experimental.

4.3.1.- INFLUENCIA DEL GRADO DE RECUBRIMIENTO DEL SORBENTE

En primer lugar, se evaluó el grado de recubrimiento del sorbente. Dicho recubrimiento, formado por un polímero de anilina, es responsable de las interacciones de adsorción y desorción de los analitos sobre el sorbente, por lo que su evaluación es de gran interés. Estos procesos de adsorción y desorción ocurren, principalmente, debido a las interacciones π - π existentes entre las estructuras aromáticas de los analitos y del recubrimiento polimérico (Meng et al., 2011). En este estudio se evaluaron tres condiciones de síntesis diferentes, mostradas en la **Tabla 4.3**.

Tabla 4.3.- Proporciones de los reactivos implicados en la síntesis de los distintos sorbentes.

Sorbente	m-NPs (g)	PANI (mL)	Persulfato amónico (g)
Recubrimiento A	8	1	1,2
Recubrimiento B	4	1	1,2
Recubrimiento C	2	1	1,2

Los experimentos se llevaron a cabo manteniendo el resto de las condiciones de extracción sin modificar (pH 10, 40 mg de sorbente y 2 mL de ACN como disolvente de elución). Los resultados del estudio de recuperaciones absolutas se muestran en la **Figura 4.2**. Tal y como se puede observar, el sorbente con el recubrimiento C proporcionó los valores más bajos de recuperaciones para todos los analitos a excepción del DEHA, por lo que se descartó su aplicación para el método. En cuanto a los recubrimientos A y B, no se hallaron diferencias significativas, como se puede observar en la gráfica, aunque sí que se observa una tendencia a valores de recuperación ligeramente mayores para las extracciones llevadas a cabo con el recubrimiento A, el cual contiene la menor cantidad de anilina por gramo de partículas. Los resultados obtenidos en este ensayo sugieren una relación inversa entre la cantidad de polímero que recubre la nanopartícula y su capacidad para extraer los compuestos estudiados. En este sentido, es posible que, por un lado, los impedimentos estéricos existentes entre los analitos y el polímero cuando este se encuentra en una mayor concentración dificulten la extracción; y por otro, que exista un mayor aglutinamiento de las nanopartículas, y por lo tanto una disminución del área superficial y por ende de dicha capacidad.

Debido a todo lo expuesto anteriormente se seleccionó el sorbente con el recubrimiento A para el desarrollo del método.

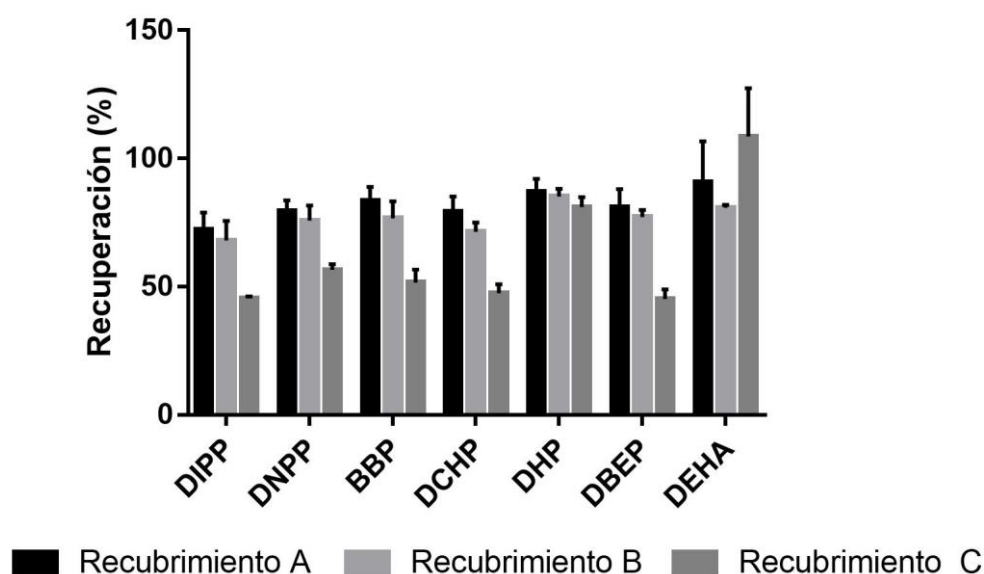


Figura 4.2.- Efecto del grado de recubrimiento del sorbente en las recuperaciones de los analitos de interés (n=3). Condiciones de extracción: pH 10, 40 mg de sorbente y 2 mL de ACN como disolvente de elución.

4.3.2.- INFLUENCIA DEL DISOLVENTE DE ELUCIÓN

Debido a la importancia de la naturaleza del disolvente de elución en la efectividad del procedimiento en términos de eficacia y selectividad, se llevó a cabo un estudio de este parámetro. Para ello, se evaluaron cinco disolventes de diversas polaridades: heptano, AcOEt, acetona, MeOH y ACN. El momento dipolar y el índice de polaridad de cada uno de estos disolventes se muestran en la Tabla 4.4. El resto de las condiciones de extracción se mantuvieron constantes durante el estudio (pH 10, 40 mg del sorbente con el recubrimiento A y 2 mL de volumen de disolvente de elución).

Tabla 4.4.- Características relativas a la polaridad de los disolventes de elución estudiados.

Disolvente	Momento dipolar (μ) a 25 °C (D)	Índice de polaridad
Heptano	0	0
AcOEt	1,88	4,4
Acetona	6,69	5,1
MeOH	3,44	5,1
ACN	8,87	5,8

Tal y como se observa en la **Figura 4.3**, el heptano mostró los peores valores de recuperación de todos los disolventes, siendo incapaz de extraer cuantitativamente los ftalatos estudiados. Por otro lado, el AcOEt y el MeOH mostraron valores de recuperación estadísticamente inferiores a los mostrados por el ACN y la acetona, por lo que no fueron considerados apropiados para ser empleados como disolventes de elución. Respecto a la comparación entre la viabilidad del ACN y de la acetona, esta última mostró peores valores de recuperación que el ACN para todos los analitos, a excepción del DEHA. Además, se observó una mayor irreproducibilidad cuando se utilizó dicho disolvente, lo que podría asociarse a su mayor volatilidad. Estos resultados fueron determinantes para seleccionar el ACN como disolvente óptimo de elución, aunque dicha selección se confirmó en un segundo estudio de recuperación donde se comparó únicamente el ACN y la acetona como disolventes de elución, en el cual la irreproducibilidad de la técnica utilizando acetona como disolvente de elución quedó patente al obtenerse valores de desviación estándar relativa, o RSD (del inglés *relative standard deviation*) de hasta el 34% para el DIPP y significativamente superiores a las RSD de las extracciones realizadas usando ACN como disolvente de elución, inferiores al 17% en todos los casos.

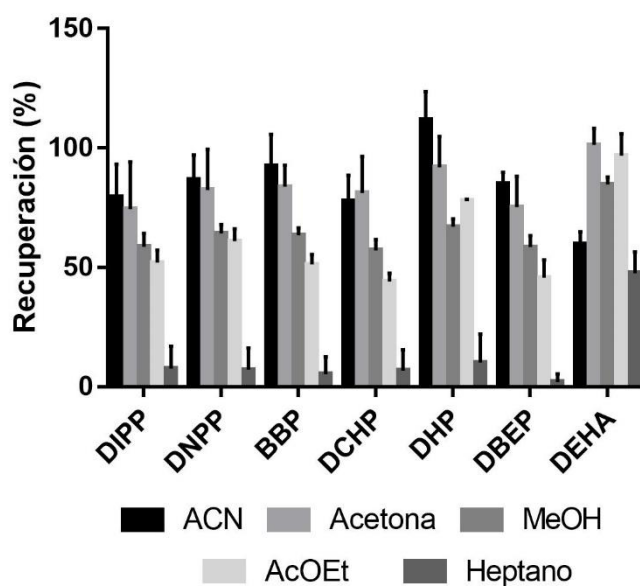


Figura 4.3.- Efecto del disolvente de elución en las recuperaciones de los analitos de interés (n=3). Condiciones de extracción: pH 10, 40 mg de sorbente y 2 mL de disolvente de elución.

4.3.3.- DISEÑO EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo la optimización del volumen del disolvente de elución, del pH de la muestra, y de la proporción de la cantidad de sorbente frente al de muestra, se realizó un diseño experimental de tipo Box-Behnken (BBD, del inglés *Box-Behnken design*) aleatorizado. Este

diseño es una superficie de respuesta esférica y giratoria que incluye un punto central y puntos medios entre las esquinas circunscritos en una esfera (Jaramillo et al., 2013). Las superficies de respuesta resultan aptas para la optimización de las múltiples y complejas variables que forman parte de un procedimiento de extracción. Concretamente, el BBD opera a tres niveles por cada factor, alto, medio y bajo, y requiere de un menor número de experimentos que otros diseños valorados, como el diseño central compuesto, o CCD (Del inglés *central composite design*). A diferencia de otros diseños experimentales, el BBD no examina las regiones límite del rango estudiado para cada variable (Rakic et al., 2014 y Alam et al., 2020), lo cual resultó apropiado para los requerimientos del trabajo, ya que las evidencias consultadas previamente sugerían valores óptimos alejados de los extremos de cada factor.

Para simplificar el estudio, se fijó la cantidad de muestra en 5 mL de una disolución de gelatina preparada a 20 g/L; por lo que la evaluación de la proporción de la cantidad de sorbente frente a la de la muestra se evaluó variando únicamente la cantidad de sorbente.

Respecto a la optimización del pH, es relevante mencionar que los ftalatos no son compuestos que se ionicen en el rango de pH estudiado, por lo que la forma iónica del sorbente no debería afectar a la manera en la que este interactúa con los analitos, ya que las interacciones electrostáticas entre dicho sorbente y los compuestos no se estarían produciendo. Por otra parte, dichos cambios en el pH pueden afectar a la superficie del sorbente, así como a su estabilidad, y por lo tanto a su capacidad de interactuar con los analitos (Pinsrithong et al., 2018). Por ello, se evaluó la influencia del pH sobre la capacidad de extracción del sorbente en valores superiores e inferiores al punto isoeléctrico del mismo (6,55), determinado experimentalmente (ver **Figura 4.4**).

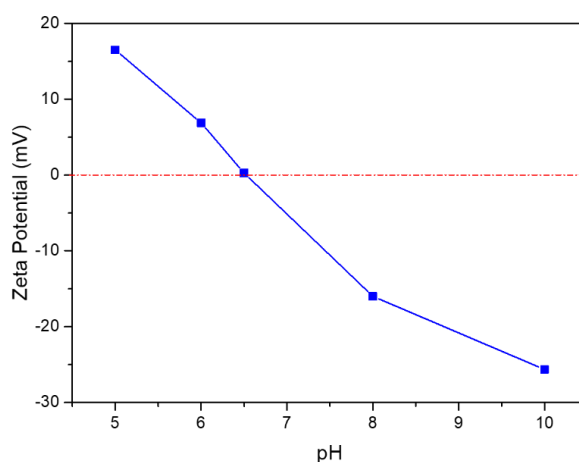


Figura 4.4.- Representación del punto isoeléctrico del sorbente.

El diseño constó de 17 experimentos que se realizaron por duplicado con cinco réplicas del punto central para evaluar su reproducibilidad, y se utilizó el área del analito como variable de respuesta. En la **Tabla 4.5** se muestran los niveles de los tres factores seleccionados para este estudio.

Tabla 4.5.- Diseño experimental utilizado para la optimización de las condiciones de extracción.

Factor	Valor -1	Valor 0	Valor +1
pH	4	8	12
Cantidad de sorbente (mg)	10	35	60
Volumen de elución (mL)	1	3	5

Los resultados del diseño experimental mostraron que únicamente el pH y la cantidad de sorbente tenían influencia estadísticamente significativa sobre la capacidad de extracción del método para un nivel de confianza del 95%, mientras que el volumen de elución no tenía influencia sobre la misma. Esto se puede observar en la **Figura 4.5**, donde se muestra el efecto estandarizado de cada factor, y de cada combinación de factores, sobre la variable de respuesta estudiada para dos analitos representativos, el BBP y DBEP.

Teniendo en cuenta que el volumen de disolvente de elución utilizado para la re-extracción de los compuestos no tenía influencia sobre la eficacia del método, se decidió establecer el volumen de disolvente de elución en 1mL, el menor de todos los evaluados, coincidiendo con los principios de la química verde referentes a la reducción de disolventes y productos químicos derivados.

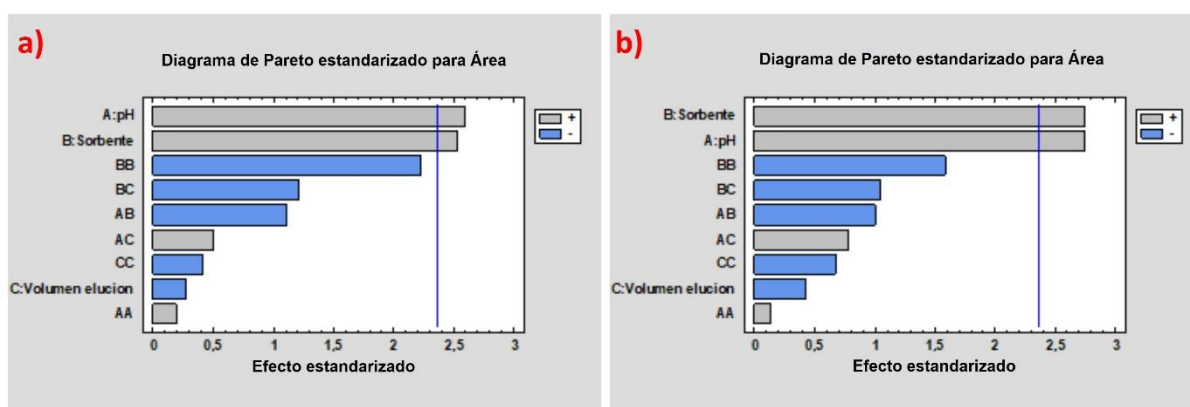


Figura 4.5.- Efecto estandarizado de cada factor estudiado sobre la variable de respuesta para a) BBP y b) DBEP.

En la **Figura 4.6**, se muestran los efectos individuales de los factores sobre la respuesta para el BBP y el DBEP. Tal y como se puede observar, a medida que el pH incrementa, la capacidad de extracción del método mejora.

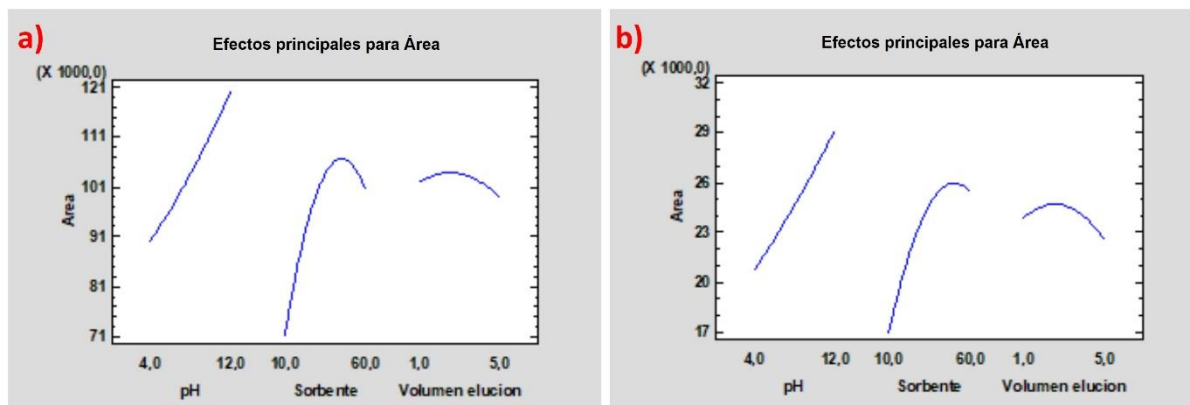


Figura 4.6.- Efectos principales de los factores estudiados para a) BBP y b) DBEP.

En el caso de la cantidad de sorbente, y atendiendo a los valores óptimos individuales para cada analito, el análisis experimental mostró un valor óptimo de 60 mg para los compuestos de cadena corta, y de 40 mg para los de cadena larga. Debido a ello, se realizó un segundo estudio comparativo utilizando ambas cantidades de sorbente, y ante la ausencia de diferencias significativas en los valores de recuperación del método, así como en pos de cumplir en la mayor medida posible con los criterios de la química verde, se estableció 40 mg como la cantidad de sorbente más adecuada.

Por último, y respecto al volumen de disolvente de elución utilizado, la tendencia observada es que, a medida que aumenta este, disminuye la eficacia del método, por lo que se ve reforzada la elección del valor mínimo estudiado, 1 mL, como el valor más adecuado para este factor.

Lo expuesto anteriormente se confirma observando las superficies de respuesta para los dos analitos modelo, mostradas en la **Figura 4.7**. En ambas superficies se puede observar el máximo de área para un valor de 40 mg de cantidad de sorbente, así como para un valor de pH 12, el mayor de los 3 niveles estudiados.

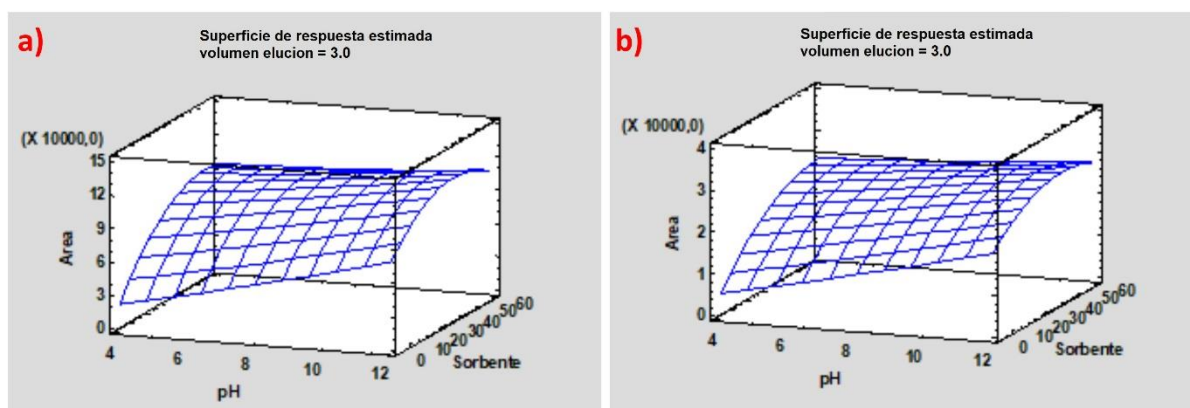


Figura 4.7.- Superficies de respuesta estimadas para a) BBP y b) DBEP, estableciendo el valor del volumen de elución en 3 mL (Valor +0 del BBD).

Debido a todo lo expuesto anteriormente, las condiciones óptimas de extracción sugeridas por el diseño experimental son las indicadas en la **Tabla 4.6**.

Tabla 4.6.- Condiciones óptimas sugeridas por el BBD

Factor	Valor óptimo
pH	12
Cantidad de sorbente utilizado para 5 mL de muestra (20 mg/L)	40 mg
Volumen de disolvente de elución	1 mL

4.4.- ESTUDIO DEL EFECTO MATRIZ

Las gelatinas alimentarias, usualmente consumidas como postres, son una mezcla proteica de origen animal producida a partir del colágeno hidrolizado de tendones, huesos y piel animal. Debido a la gran variedad de fuentes de colágeno utilizadas, así como a la diversidad de técnicas existentes para la preparación de estos alimentos, y a los aditivos utilizados para aportar propiedades organolépticas, las gelatinas comerciales tienen una composición altamente heterogénea (Djagny et al., 2001). Este gran número de componentes, de diversa naturaleza, puede dar lugar a un efecto matriz (EM) en los resultados obtenidos, es decir, supresión o incremento de las señales analíticas debido a compuestos ajenos al estudio.

Para determinar el EM de la muestra, se siguió el procedimiento desarrollado por Matuszewski y colaboradores en 2003, en el que el EM se calcula como el porcentaje de relación entre el área del pico del analito en las muestras enriquecidas en la matriz al final del procedimiento de extracción y el área del pico del analito disuelto en fase móvil inicial a la misma concentración (Matuszewski et al., 2003). Este método establece que, para un valor superior al 120% e inferior

al 80%, existe EM destacable; mientras que dentro de la región comprendida en este intervalo no se puede afirmar la existencia del mismo.

En la **Tabla 4.7** se muestran los resultados del estudio del EM. Tal y como se puede observar, tanto DIPP como DNPP tienen valores de EM muy cercanos al 80%, límite inferior del intervalo mencionado anteriormente. A su vez, el DHP, DEHA, y el IS, DHP-d₄, mostraron un remarcado EM con unos valores del 73,6%, 57,4% y 76,7%, respectivamente. Además, y tras llevar a cabo la extracción de los blancos de las muestras, se observó la presencia de los analitos de interés debido, principalmente, a fenómenos de contaminación aleatorios en el material y reactivos. Por ello, se decidió hacer uso de una calibración en la matriz para la correcta cuantificación de los analitos seleccionados.

Tabla 4.7.- Resultado promedio (n=6) del estudio de efecto matriz. Este efecto matriz se evaluó a dos niveles: 125 y 200 µg/kg.

Analito	Efecto matriz (%)	RSD (%)
DIPP	83,9	5,7
DNPP	83,1	4,7
BBP	91,3	8,4
DCHP	82,2	7,0
DHP	73,6	9,8
DBEP	110,6	10,1
DEHA	57,4	29,5
DHP-d ₄	73,7	11,7

RSD: desviación estándar relativa.

4.5.- CALIBRACIÓN EN LA MATRIZ

La calibración en la matriz se realizó llevando a cabo siete extracciones utilizando 5 mL de muestra, y aplicando las condiciones óptimas mencionadas en el apartado 4.2, es decir, pH 12, 40 mg de sorbente y 1 mL de acetonitrilo como disolvente de elución. Al final del procedimiento, el extracto obtenido, se enriqueció cada uno a un nivel de concentración diferente en el rango 0,25-200 µg/L con todos los analitos estudiados, y se inyectaron por triplicado. Las rectas de calibrado se realizaron representando la relación entre el área del pico de cada analito y el área del pico del IS frente a la concentración de cada analito. Los resultados de la calibración se muestran en la Tabla 4.8. Tal y como se puede observar, los coeficientes de determinación, mayores de 0,9904 en todos los casos, confirmaron la linealidad de la metodología en el rango de concentraciones estudiado.

Tabla 4.8.- Datos del calibrado en la matriz para el grupo de ftalatos estudiado.

Analito	Rango lineal ($\mu\text{g/L}$)	$b \pm S_b \cdot t_{(0,05,5)}$	$a \pm S_a \cdot t_{(0,05,5)}$	R^2	$S_{y/x}$
DIPP	0,25 – 250	$4,29 \cdot 10^{-3} \pm 1,89 \cdot 10^{-4}$	$-1,94 \cdot 10^{-2} \pm 2,16 \cdot 10^{-2}$	0,9904	0,0442
DNPP	0,25 – 250	$9,46 \cdot 10^{-3} \pm 3,42 \cdot 10^{-4}$	$-2,80 \cdot 10^{-2} \pm 3,91 \cdot 10^{-2}$	0,9935	0,0800
BBP	1 – 250	$4,14 \cdot 10^{-3} \pm 1,15 \cdot 10^{-4}$	$-5,5 \cdot 10^{-3} \pm 1,32 \cdot 10^{-2}$	0,9961	0,0270
DCHP	0,25 – 250	$9,69 \cdot 10^{-3} \pm 2,71 \cdot 10^{-4}$	$-1,76 \cdot 10^{-2} \pm 3,1 \cdot 10^{-2}$	0,9960	0,0636
DHP	0,5 – 250	$1,12 \cdot 10^{-2} \pm 3,16 \cdot 10^{-4}$	$-2,44 \cdot 10^{-2} \pm 3,62 \cdot 10^{-2}$	0,9961	0,0741
DBEP	0,25 – 250	$1,29 \cdot 10^{-3} \pm 3,58 \cdot 10^{-5}$	$-2,44 \cdot 10^{-3} \pm 4,1 \cdot 10^{-3}$	0,9962	0,0084
DEHA	0,25 – 250	$7,59 \cdot 10^{-3} \pm 1,52 \cdot 10^{-4}$	$9,98 \cdot 10^{-2} \pm 1,74 \cdot 10^{-3}$	0,9980	0,0357

b: pendiente. S_b : desviación estándar de la pendiente. a: ordenada en el origen. S_a : desviación estándar de la ordenada en el origen. R^2 : Coeficiente de determinación. $S_{y/x}$: desviación estándar de los residuales.

4.6.- ESTUDIO DE RECUPERACIONES Y ENTRE LOTES

A continuación, se realizó un estudio de recuperaciones, a dos niveles de concentración, con el objetivo de validar la metodología en cuanto a la reproducibilidad y a la eficacia de la extracción. Para ello, se realizaron cinco réplicas para cada nivel (200 $\mu\text{g/L}$, en el caso del nivel alto, es decir, el 80% del rango lineal utilizado en la calibración; y a dos veces el límite inferior del calibrado para cada analito, en el caso del nivel bajo, es decir, 0,5 $\mu\text{g/L}$ para DIPP, DNPP, DCHP, DBEP y DEHA, 1 $\mu\text{g/L}$ para el DHP, y 2 $\mu\text{g/L}$ para BBP).

Los resultados obtenidos, mostrados en la **Tabla 4.9**, confirman la eficacia del método desarrollado, con recuperaciones absolutas superiores al 70,4% e inferiores al 111,7%, y valores de RSD inferiores al 18,8% para todos los analitos y niveles de concentración estudiados. Para el cálculo del límite de cuantificación del método de cada analito (LOQ, del inglés *limit of quantification*), que se define como el nivel más bajo de un compuesto en la matriz capaz de proporcionar una señal ruido (S/R) superior a 10 para la transición de cuantificación, y superior a 3 para la de confirmación; se llevó a cabo teniendo en cuenta el punto del calibrado más bajo (LCL, del inglés *lowest calibration level*), así como el factor de dilución y el dato de recuperación. Para todos los analitos, el LOQ se encontró comprendido entre 16,7 y 64,1 ng/L.

Tabla 4.9.- Resultados del estudio de recuperaciones (n=5) del método optimizado para el grupo de compuestos estudiado en muestra a dos niveles diferentes de concentración.

Analito	Recuperaciones absolutas (%)		LOQ _{método} ^c (ng/L)
	Nivel bajo ^a (n=5) (RSD, %)	Nivel alto ^b (n=5) (RSD, %)	
DIPP	75,1 (18,8)	74,5 (12,4)	16,7
DNPP	81,2 (18,9)	81,3 (13,3)	15,4
BBP	77,3 (9,8)	79,1 (14,2)	64,1
DCHP	70,4 (11,7)	73,1 (13,9)	17,9
DHP	84,8 (11,7)	94 (14,2)	28,0
DBEP	73,7 (6,3)	72,9 (16,1)	16,0
DEHA	111,7 (6,1)	123,5 (14,3)	11,1

^a Concentración de los analitos inyectada: 0.5 µg/L para todos los analitos, excepto para el DHP y el DBP, que fue de 1 µg/L y 2 µg/L, respectivamente; ^b Concentración de los analitos inyectada: 200 µg/L; ^c Definido como la concentración más baja del calibrado en la matriz capaz de proporcionar una señal ruido (S/R) superior a 10 para la transición de cuantificación, y superior a 3 para la transición de confirmación, tras aplicar el factor de dilución y el dato de recuperación.

En este contexto, Ma y colaboradores desarrollaron, en 2010 un método para la cuantificación de ftalatos en gelatinas comerciales basado en una dSPE cuyos LOQs se encuentran en el rango de 0,28 – 11,5 µg/L (Ma et al., 2010). Además, el método desarrollado por Rodríguez-Ramos y colaboradores en 2020, basado en una extracción µ-m-dSPE aplicada a gelatinas y zumos de manzana, se sitúan en el rango de 0,147 – 0,165 µg/L (Rodríguez-Ramos et al., 2020). Por otro lado, y en lo relativo a la determinación de ftalatos en alimentos infantiles, Socas-Rodríguez y colaboradores desarrollaron, en 2018, un método QuEChERS aplicado a compotas para alimentación de bebés, cuyos límites de cuantificación están comprendidos en el rango de 0,03 – 0.67 µg/L (Socas-Rodríguez et al., 2018), mientras que los método puestos a punto por Notardonato y colaboradores en 2018, y por Russo y colaboradores en 2016, para determinar ftalatos en alimentos infantiles, y basados en una microextracción líquido-líquido (LLME), poseen límites de cuantificación en el rango de 2,3 – 7,5 µg/kg (Notardonato et al., 2018) y 3 – 20 µg/kg (Russo et al., 2016) respectivamente. En base a esto, es posible afirmar que el método desarrollado en el presente trabajo posee unos límites de cuantificación por debajo de los existentes previamente en el tipo de alimentos estudiado, permitiendo detectar y cuantificar dichos compuestos a una menor concentración.

Por último, y referente al estudio de la robustez del método, se realizó un estudio entre lotes del sorbente con el objetivo de evaluar si las distintas síntesis de este ofrecían la repetibilidad esperada. Para ello, se realizaron cuatro extracciones por duplicado utilizando cuatro lotes del

sorbente sintetizados por separado, aplicando las condiciones de extracción optimizadas, y se evaluaron los valores de RSD de todas ellas. Los resultados, menores de 16,8% para todos los analitos, confirmaron la robustez del método y la repetibilidad independientemente del lote de sorbente utilizado.

4.7.-ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES

La última parte del presente trabajo consistió en el análisis del contenido en ftalatos de diez gelatinas comerciales diferentes, preparadas a partir de polvo o láminas, a una concentración de 20 g/L, utilizando el método desarrollado.

En la **Tabla 4.10** se muestran los resultados obtenidos tras la extracción, separación y cuantificación de los analitos de interés en dichas muestras.

Tabla 4.10.- Resultados del análisis de diez gelatinas comerciales diferentes utilizando la metodología desarrollada. LOQ: Límite de cuantificación.

Analitos	Concentración \pm intervalo de confianza ($\mu\text{g/L}$)				
	M1	M2	M3	M4	M5
DIPP	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
DNPP	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
BBP	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
DCHP	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
DHP	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
DBEP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DEHA	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

Analitos	Concentración \pm intervalo de confianza ($\mu\text{g/L}$)				
	M6	M7	M8	M9	M10
DIPP	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
DNPP	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
BBP	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
DCHP	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
DHP	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
DBEP	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DEHA	6,85 \pm 0,40	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ

n.d.: no detectado.

Tal y como se puede observar, la mayoría de los analitos fueron detectados en todas las muestras, pero no cuantificados, lo que indica los bajos niveles de contaminación existentes en los productos comerciales evaluados, teniendo en cuenta la buena sensibilidad mostrada por el método. Sin embargo, en este sentido, cabe destacar la importancia de seguir trabajando en la mejora de este aspecto ya que, como se ha indicado a lo largo de este trabajo, los PAEs tiene actividad disruptora incluso a muy bajos niveles, por lo que es fundamental la búsqueda de mejoras en esta línea, especialmente en la disminución de la contaminación ambiental asociada a estos analitos que constituye uno de los principales problemas en el desarrollo de métodos para su determinación ya que comprometen la sensibilidad de los mismos, impidiendo, en algunos casos la correcta determinación a los niveles de interés.

Por otra parte, como se puede observar en la **Figura 4.8**, para una de las muestras analizadas, es relevante el hecho de que el DBEP no ha sido detectado en ninguna muestra, de forma similar a lo ocurrido en estudios realizados previamente otros alimentos, tales como compotas de macedonias de frutas y de manzana, leche de vaca, agua embotellada, huevos, carnes, vegetales y legumbres, entre otros (Otero et al., 2015; Socas-Rodríguez et al., 2018; Lu et al., 2018 y Yang et al., 2018). Por el contrario, Rodríguez-Ramos y colaboradores detectaron, en 2019, DEBP en una muestra de cervezas envasadas en plástico a una concentración de $0,4 \pm 0,2 \mu\text{g/L}$ (Rodríguez-Ramos et al., 2020).

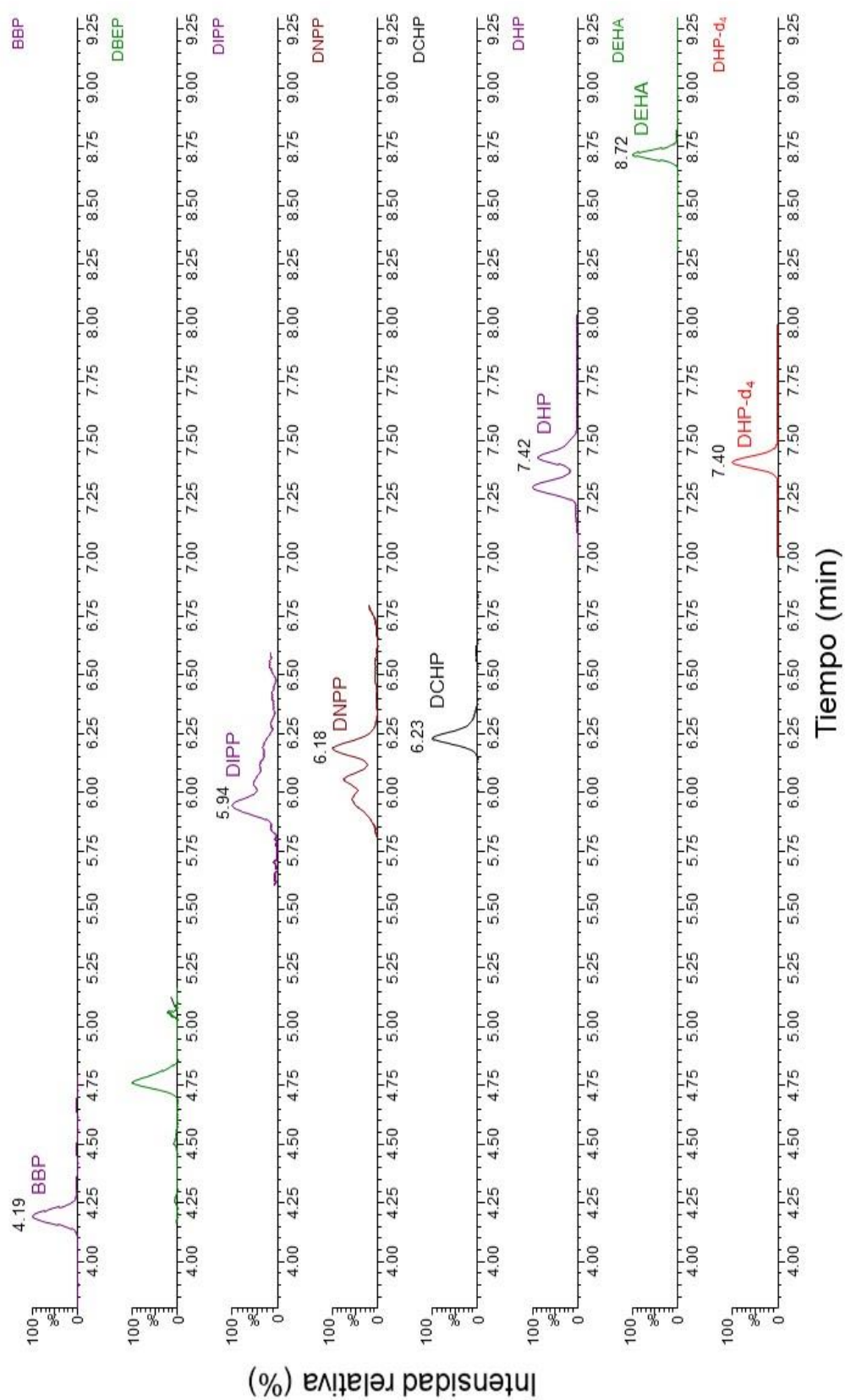


Figura 4.8.- Cromatograma de una muestra real tras aplicar la metodología desarrollada m- μ -dSPE. Volumen de inyección: 5 μ L. Flujo de fase móvil: 0,3 mL/min. Reconstitución de la muestra en 250 μ L de la composición inicial de fase móvil (50/50 (v/v) ACN/H₂O, 0,1% (v/v) ácido fórmico). Temperatura de la columna: 40 °C.

Otro aspecto destacable es el contenido en DEHA de la muestra 6 (6,85 $\mu\text{g/L}$) (Ver **Figura 4.9**). Si bien el DEHA es un adipato, y no un ftalato, se trata de un plastificante ampliamente utilizado en la industria de los plásticos que ha sido detectado y cuantificado exitosamente en otros trabajos previos en cantidades similares a la del presente estudio. Concretamente, Fasano y colaboradores detectaron DEHA en muestras de carne, pescado y vegetales en concentraciones de 2,97; 5,67 y 7,30 $\mu\text{g/L}$ (Fasano et al., 2015), al igual que Cao y colaboradores en 2020, que detectaron DEHA en muestras de leche a una concentración de 17,7 ng/L (Cao et al., 2020), y anteriormente, en 2015, en el rango de los 5,04 a los 1300 ng/L (Cao et al, 2015). Por el contrario, en otros estudios, como el realizado por Caldeirão y colaboradores en 2021, no fue posible detectar dicho compuesto en un cierto grupo de bebidas aromáticas (Caldeirão et al., 2021), por lo que la capacidad de migración de dicho compuesto en matrices alimentarias sigue siendo objeto de estudio, debido, en gran parte, a la importancia que ha cobrado como sustituto de determinados ftalatos.

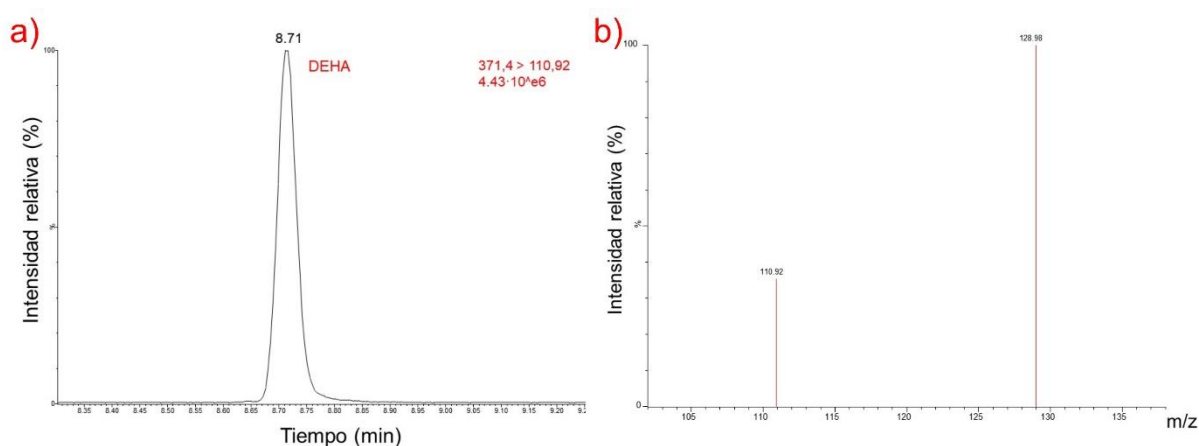


Figura 4.9.- Determinación de DEHA en la muestra 6. a) Cromatograma y b) espectro de masas del compuesto.

Conclusiones

5.- CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este Trabajo de Fin de Máster se pueden deducir las siguientes conclusiones:

- Se ha desarrollado y optimizado un nuevo método para la determinación de seis ftalatos y un adipato (DIPP, DNPP, BBP, DCHP, DHP, DBEP y DEHA) en gelatinas mediante el uso de la m- μ -dSPE y de la UHPLC-MS/MS como técnicas de extracción y determinación, respectivamente.
- Se ha empleado con éxito la UHPLC-MS/MS para llevar a cabo la separación de los analitos seleccionados con un tiempo de análisis inferior a 11 minutos, utilizando como fase móvil una mezcla de ACN:H₂O, 0,1% en ácido fórmico. La determinación se ha llevado a cabo exitosamente utilizando una interfaz ESI, trabajando en modo positivo, y un analizador de QqQ.
- Se ha utilizado un nuevo material constituido por NPs de Fe₃O₄ y PANI, sintetizado y caracterizado por miembros del grupo de investigación, como sorbente para la m- μ -dSPE desarrollada. La evaluación del grado de recubrimiento del sorbente utilizado para la extracción de los analitos resultó en un valor óptimo de 8 g de nanopartículas magnéticas por cada gramo de anilina.
- La optimización del procedimiento de extracción se llevó a cabo mediante un estudio inicial del tipo de recubrimiento de las NPs, así como de la naturaleza del disolvente de elución, seguido de un diseño experimental BBD, en el que se evaluó el pH de la muestra, el volumen de disolvente de elución y la ratio muestra/sorbente, así como el efecto de su interacción en la eficacia de la extracción. Los valores óptimos obtenidos para los factores evaluados fueron 40 mg del sorbente con el recubrimiento A, pH 12 y 1 mL de ACN como disolvente de elución.
- La metodología analítica desarrollada se validó mediante los correspondientes estudios de efecto matriz, calibración, reproducibilidad y sensibilidad, así como la repetibilidad del proceso de síntesis. Los resultados obtenidos confirmaron la linealidad del método, con valores de R² superiores al 0,9904 para los calibrados en la matriz de cada uno de los analitos. Además, los resultados del estudio de recuperaciones, mostraron valores comprendidos en el rango de 70,4 – 123,5%, con RSDs inferiores al 18,9%, demostrando la excelente eficiencia de la extracción del método, así como su reproducibilidad. Por otro lado, los LOQs del método, situados en el rango de 11,1 - 64,1 ng/L, demostraron la alta sensibilidad de la metodología desarrollada, mayor que la reportada previamente por la

bibliografía en matrices similares. Finalmente, el estudio entre distintos lotes del sorbente desarrollado demostró la robustez del proceso de síntesis obteniendo RSDs inferiores al 16,8% entre los resultados obtenidos, utilizando cuatro lotes distintos.

- La metodología se aplicó a la determinación de ftalatos en diez gelatinas comerciales, detectándose todos los analitos a excepción del DEBP, y pudiéndose cuantificar el DEHA en una de ellas. Si bien los niveles de contaminación aleatoria tanto en las muestras como en los medios utilizados para la determinación dificultan el correcto análisis cuando las concentraciones de los analitos se encuentran muy próximas a los límites de cuantificación, el método constituye una excelente forma de determinar ftalatos en alimentos.

El método desarrollado es, por tanto, un método rápido, sencillo y sostenible. El bajo volumen de disolvente utilizado, así como la capacidad de separar el sorbente de cualquier disolución mediante la aplicación de un campo magnético, hacen que este método cumpla con algunos de los principios de la Química Analítica Verde.

Glosario

6.- GLOSARIO

ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
ATBC	Acetil tri-n-butil citrato
BBD	Diseño experimental Box Beknken
BBP	Butil-benzil ftalato
CCD	Diseño experimental central compuesto
Chi	Chitosán
COF	Red organicovalente
CPSC	Comisión de Seguridad de Productos para el Consumidor
DAP	Dialil ftalato
DBEP	Di-(2-butoxietil) ftalato
DBP	Di-butil ftalato
DBP	Di-butil-ftalato
DCHP	Diciclohexil ftalato
DEEP	Di-2-etoxietil ftalato
DEHA	Di-(2-etilhexil) adipato
DEHP	Di-(2-etilhexil) ftalato
DEHT	Di-(2-etilhexil) tereftalato
DEP	Di-etil ftalato
DES	Líquido eutéctico profundo
DHP	Di-hexil ftalato
DHP-d ₄	3,4,5,6-d ₄ -dihexil ftalato

DIBP	Di-isobutil ftalato
DIBP	Di-isobutil ftalato
DIDP	Di-isononil ftalato
DINP	Di-isodecil ftalato
DIPP	Di-isopentil ftalato
DI-SPME	Microextracción en fase sólida de inmersión directa
DLLME	Microextracción líquido – líquido dispersiva
DMEP	Di-2-metoxil ftalato
DMP	Di-metil ftalato
DNOP	Di-octil ftalato
DNPP	Di-pentil ftalato
DPP	Di-propil ftalato
dSPE	Extracción en fase sólida dispersiva
EM	Efecto matriz
EPA	Agencia de Protección Ambiental
EPA	Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos
ESI	Ionización por electrospray
EtOH	Etanol
Fast-GC	Cromatografía de gases rápida
FDA	Agencia de Alimentación y Medicamentos
GAC	Química analítica verde
GC	Cromatografía de gases
μ GC	Cromatografía de gases miniaturizada

HF-LPME	Microextracción en fase líquida utilizando membranas líquidas soportadas sobre fibras huecas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
HP-MIP	Polímero hueco poroso de impronta molecular
HS-SPME	Microextracción en fase sólida de espacio de cabeza
K_{ow}	Coefficiente de reparto octanol agua
LC	Cromatografía de líquidos
LLE	Extracción líquido - líquido
LLME	Microextracción líquido-líquido
LME	Límite de migración específico
LOD	Límite de detección del método
LOQ	Límite de cuantificación del método
LPME	Microextracción en fase líquida
m- μ -dSPE	Extracción en fase sólida micro-dispersiva magnética
m-dSPE	Extracción en fase sólida dispersiva-magnética
MECK-DAD	Cromatografía electrocinética micelar – detector diodo array
MeOH	Metanol
m-NP	Nanopartícula magnética
MOF	Red metalorgánica
MRM	Monitorización de reacción múltiple
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tandem
NADES	Líquido eutéctico profundo natural
PAE	Éster de ácido ftálico o ftalato

PANI	Polianilina
PE-HD	Polietileno de alta densidad
PE-LD	Polietileno de baja densidad
PET	Tereftalato de polietileno
PP	Polipropileno
PTFE	Politetrafluoroetileno
PUR	Poliuretano
PVC	Policloruro de vinilo
PVDF	Polifluoro de vinilideno
Q	Cuadrupolo simple
Q-Orbitrao	Cuadrupolo – Trampa de iones
QqQ	Triple cuadrupolo
Q-TOF	Cuadrupolo – Tiempo de vuelo
RSD	Desviación estándar relativa
S/R	Señal/ruido
SDME	Microextracción de gota colgante
SPE	Extracción en fase sólida
SPION	Nanopartículas paramagnéticas de óxido de hierro
SPME	Microextracción en fase sólida
TPSA	Área superficial polar
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra-alta eficacia
UV-Vis	Ultravioleta – Visible

Bibliografía

7.- BIBLIOGRAFÍA

A

Alam, P., Siddiqui, N. A., Rehman, M. T., Hussain, A., Akhtar, A., Mir, S. R. y Alajmi, M. F. (2021). Box-behnken design (BBD)-based optimization of microwave-assisted extraction of parthenolide from the stems of *Tarconanthus camphoratus* and cytotoxic analysis. *Molecules*, 26(7). <https://doi.org/10.3390/molecules26071876>

Alipanahpour Dil, E., Asfaram, A. y Sadeghfar, F. (2019). Magnetic dispersive micro-solid phase extraction with the CuO/ZnO@Fe₃O₄-CNTs nanocomposite sorbent for the rapid pre-concentration of chlorogenic acid in the medical extract of plants, food, and water samples. *Analyst*, 144(8), 2684–2695. <https://doi.org/10.1039/c8an02484g>

Algarra, M. y Perestrelo, R. (2021). *Comprehensive Insight from Phthalates Occurrence: From Health Outcomes to Emerging Analytical Approaches*. 1–26

ACS. (2015). American Chemical Society National Historic Chemical Landmarks. Bakelite: The World's First Synthetic Plastic. <http://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/bakelite.html> (Último acceso en julio de 2021)

Anastas, P. T. y Warner, J. C. (1998). *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press: New York, p.30.

Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D. y Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method empl. *Yang* 185–198.

Arfaeinia, L., Dobaradaran, S., Nasrzadeh, F., Shamsi, S., Poureshgh, Y. y Arfaeinia, H. (2020). Phthalate acid esters (PAEs) in highly acidic juice packaged in polyethylene terephthalate (PET) container: Occurrence, migration and estrogenic activity-associated risk assessment. *Microchemical Journal*, 155, 104719. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104719>

Armenta, S. y de la Guardia, M. (2016). Green chromatography for the analysis of foods of animal origin. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 80, 517–530. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.06.012>

Armenta, S., Garrigues, S., De la Guardia, M y Esteve-Turrillas, F. A. (2019a). Green analytical chemistry. *Encyclopedia of Analytical Science*. doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.13980-0

Armenta, S., Garrigues, S., Esteve-Turrillas, F. A. y de la Guardia, M. **(2019b)**. Green extraction techniques in green analytical chemistry. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *116*, 248–253. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.03.016>

B

Ballesteros-Vivas, D., Ra-Rodríguez, B., Mendiola, J. A., Ibáñez, E. y Cifuentes, A. **(2021)**. Green food analysis: Current trends and perspectives. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, *31(iv)*, 100522. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100522>

Beko, G., Callesen, M., Weschler, C. J., Toftum, J., Langer, S., Sigsgaard, T., Høst, A., Kold Jensen, T. y Clausen, G. **(2015)**. Phthalate exposure through different pathways and allergic sensitization in preschool children with asthma, allergic rhinoconjunctivitis and atopic dermatitis. *Environmental Research*, *137*, 432–439. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.01.012>

Bui, T. T., Giovanoulis, G., Cousins, A. P., Magnér, J., Cousins, I. T. y de Wit, C. A. **(2016)**. Human exposure, hazard and risk of alternative plasticizers to phthalate esters. *Science of the Total Environment*, *541*, 451–467. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.036>

C

Caldeirão, L., Fernandes, J. O., da Silva Oliveira, W., Godoy, H. T. y Cunha, S. C. **(2021)**. Phthalic acid esters and adipates in herbal-based soft drinks: an eco-friendly method. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *413(11)*, 2903–2912. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03219-5>

Cao, X. L., Zhao, W. y Dabeka, R. **(2015)**. Di-(2-ethylhexyl) adipate and 20 phthalates in composite food samples from the 2013 Canadian Total Diet Study. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, *32(11)*, 1893–1901. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1079742>

Cao, X. L., Sparling, M., Zhao, W. y Arbuckle, T. E. **(2021)**. GC-MS Analysis of Phthalates and Di-(2-thylhexyl) Adipate in Canadian Human Milk for Exposure Assessment of Infant Population. *Journal of AOAC International*, *104(1)*, 98–102. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsa108>

Carrillo, J. D., Salazar, C., Moreta, C. y Tena, M. T. **(2007)**. Determination of phthalates in wine by headspace solid-phase microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry: Fibre comparison and selection. *Journal of Chromatography A*, *1164(1–2)*, 248–261. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.06.059>

Carlos, K.S.; de Jager, L.S. y Begley, T.H. **(2021)** Determination of phthalate concentrations in paper-based fast-food packaging available on the U.S. market. *Food Addit. Contam. Part A*, *38*, 501–512

Chang, W. H., Herianto, S., Lee, C. C., Hung, H. y Chen, H. L. **(2021)**. The effects of phthalate ester exposure on human health: A review. *Science of the Total Environment*, *786*, 147371. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147371>

Chisvert, A., Cárdenas, S. y Lucena, R. **(2019)**. Dispersive micro-solid phase extraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *112*, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.12.005>

Chormey, D. S., Zaman, B. T., Kasa, N. A y Bakirdere, S. **(2020)**. Liquid phase microextraction strategies and their application in the determination of endocrine disruptive compounds in food samples. *TrAC - Trends Anal. Chem.* *128*

Chou, Y. C., Chen, Y. C., Chen, M. J., Chang, C. W., Lai, G. L., & Tzeng, C. R. **(2020)**. Exposure to mono-n-Butyl phthalate in women with endometriosis and its association with the biological effects on human Granulosa cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *21(5)*, 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms21051794>

Claux, O., Santerre, C., Abert-Vian, M., Touboul, D., Vallet, N. y Chemat, F. **(2021)**. Alternative and sustainable solvents for green analytical chemistry. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, *31*, 100510. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100510>

Coppieters, G., Deventer, K., Van Eenoo, P. y Judák, P. **(2021)**. Combining direct urinary injection with automated filtration and nanoflow LC-MS for the confirmatory analysis of doping-relevant small peptide hormones. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *1179*<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122842>

D

David, F., Sandra, P., Tienpont, B., Vanwallenghem, F. e Ikonou, M. **(2003)**. Analytical Methods Review. *The Handbook of Environmental Chemistry Part Q*, Springer, 3:9-56.

Davison, A. S., Milan, A. M. y Dutton, J. J. **(2013)**. Potential problems with using deuterated internal standards for liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Annals of Clinical Biochemistry*, *50(3)*, 274. <https://doi.org/10.1177/0004563213478938>

Decisión 2002/657/CE de la Comisión, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. Diario Oficial de las Comunidades Europeas. L 22, 17.8.2002.

Chormey, B. A., Rechelo, B. S., Tócoli, E. G., Kogawa, A. C. y Salgado, H. R. N. (2019). Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.07.011>

Del Carlo, M., Pepe, A., Sacchetti, G., Compagnone, D., Mastrocola, D. y Cichelli, A. (2008). Determination of phthalate esters in wine using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 111(3), 771–777. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.04.065>

Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T. y Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: An Endocrine Society scientific statement. *Endocrine Reviews*, 30(4), 293–342. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>

Directiva 2011/65/UE del Parlamento Europeo del Consejo del 8 de junio de 2011 sobre las restricciones a la utilización de determinadas sustancias peligrosas en aparatos eléctricos y electrónicos

Dmitrienko, S. G., Apyari, V. V., Tolmacheva, V. V. y Gorbunova, M. V. (2020). Dispersive Liquid-Liquid Microextraction of Organic Compounds: An Overview of Reviews. *Journal of Analytical Chemistry*, 75(10), 1237–1251. <https://doi.org/10.1134/S1061934820100056>

Dobaradaran, S., Akhbarizadeh, R., Javad Mohammadi, M., Izadi, A., Keshtkar, M., Tangestani, M., Moazzen, M., Shariatifar, N. y Mahmoodi, M. (2020). Determination of phthalates in bottled milk by a modified nano adsorbent: Presence, effects of fat and storage time, and implications for human health. *Microchemical Journal*, 159, 105516. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105516>

Dong, W., Guo, R., Sun, X., Li, H., Zhao, M., Zheng, F., Sun, J., Huang, M. y Wu, J. (2019). Assessment of phthalate ester residues and distribution patterns in Baijiu raw materials and Baijiu. *Food Chemistry*, 283, 508–516. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.069>

Dong, Y., Song, Z., Liu, Y. y Gao, M. (2021). Polystyrene particles combined with di-butyl phthalate cause significant decrease in photosynthesis and red lettuce quality. *Environmental Pollution*, 278, 116871. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116871>

E

EPA. (2012). *Phthalates Action Plan - U.S. Environmental Protection Agency*. <https://www.epa.gov/>, 1–16. https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/phthalates_actionplan_revised_2012-03-14.pdf (Último acceso en agosto de 2021)

F

Fasano, E., Cirillo, T., Esposito, F. y Lacorte, S. (2015). Migration of monomers and plasticizers from packed foods and heated microwave foods using QuEChERS sample preparation and gas chromatography/mass spectrometry. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1015–1021. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.066>

FDA. (2012). *Guidance for Industry Limiting the Use of Certain Phthalates as Excipients in CDER-Regulated Products*. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM294086.pdf> (Último acceso en julio de 2021).

Fernández-González, V., Moscoso-Pérez, C., Muniategui-Lorenzo, S., López-Mahía, P. y Prada-Rodríguez, D. (2017). Reliable, rapid and simple method for the analysis of phthalates in sediments by ultrasonic solvent extraction followed by head space-solid phase microextraction gas chromatography mass spectrometry determination. *Talanta*, 162, 648–653. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.068>

G

Gałaszka, A., Migaszewski, Z. y Namieśnik, J. (2013). The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 50, 78-84. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>.

Guo, Y. y Kannan, K. (2012). Challenges encountered in the analysis of phthalate esters in foodstuffs and other biological matrices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(9), 2539–2554. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-5999-2>

Guo, Z., Li, Y., Pan, S. y Xu, J. (2015). Fabrication of Fe₃O₄@cyclodextrin magnetic composite for the high-efficient removal of Eu(III). *Journal of Molecular Liquids*, 206, 272–277. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.02.034>

H

Haji Harunarashid, N. Z. I., Lim, L. H. y Harunsani, M. H. (2017). Phthalate Sample Preparation Methods and Analysis in Food and Food Packaging: a Review. *Food Analytical Methods*, 10(12), 3790–3814. <https://doi.org/10.1007/s12161-017-0938-7>

Hancu, G., Simon, B., Rusu, A., Mircia, E. y Gyéresi, Á. (2013). Principles of micellar electrokinetic capillary chromatography applied in pharmaceutical analysis. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 3(1), 1–8. <https://doi.org/10.5681/apb.2013.001>

Hansen, B. B., Spittle, S., Chen, B., Poe, D., Zhang, Y., Klein, J. M., Horton, A., Adhikari, L., Zelovich, T., Doherty, B. W., Gurkan, B., Maginn, E. J., Ragauskas, A., Dadmun, M., Zawodzinski, T. A., Baker, G. A., Tuckerman, M. E., Savinell, R. F. y Sangoro, J. R. (2021). Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chemical Reviews*, 121(3), 1232–1285. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00385>

He, M. J., Lu, J. F., Wang, J., Wei, S. Q. y Hageman, K. J. (2020). Phthalate esters in biota, air and water in an agricultural area of western China, with emphasis on bioaccumulation and human exposure. *Science of the Total Environment*, 698. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134264>

Heudorf, U., Mersch-Sundermann, V. y Angerer, J. (2007). Phthalates: Toxicology and exposure. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 210(5), 623–634. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2007.07.011>

Hu, A., Qiu, M., Liu, H., Xu, Y., Tao, Y., Yang, G., He, Y., Xu, J. y Lu, Z. (2020). Simultaneous determination of phthalate diesters and monoesters in soil using accelerated solvent extraction and ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1626. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461347>

Huang, Z., Tu, C., Liu, H., Wang, L., Zhu, Z. y Watanabe, I. (2020). Hollow fiber-solid phase microextraction of phthalate esters from bottled water followed by flash evaporation gas chromatography-flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, 1619, 460953. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.460953>

I

Ishizaki, A. y Kataoka, H. (2021). Online in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the determination of tobacco-specific nitrosamines in hair samples. *Molecules*, 26(7), 1–9. <https://doi.org/10.3390/molecules26072056>

J

Jaramillo, A. C., Echavarría, A. M. y Hormaza, A. (2013). Diseño Box-Behnken para la optimización de la adsorción del colorante azul ácido sobre residuos de flores. *Ingeniería y Ciencia*, 9(18), 75–91. <https://doi.org/10.17230/ingciencia.9.18.4>

K

Kepekci-Tekkeli, S.E. y Durmus, Z. (2019). Magnetic solid phase extraction applications combined with analytical methods for determination of drugs in different matrices. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 64(2), 4448-4458. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072019000204448>

Kim, J. H., Park, H. Y., Bae, S., Lim, Y. H. y Hong, Y. C. (2013). Diethylhexyl phthalates is associated with insulin resistance via oxidative stress in the elderly: a panel study. *PLoS One*, 8(8), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071392>

Kim, S. H., Chun, S., Jang, J. Y., Chae, H. D., Kim, C. H. y Kang, B. M. (2011). Increased plasma levels of phthalate esters in women with advanced-stage endometriosis: A prospective case-control study. *Fertility and Sterility*, 95(1), 357–359. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.07.1059>

Kingsley, O. y Witthayawirasak, B. (2020). Deterministic assessment of the risk of phthalate esters in sediments of U-Tapao Canal, Southern Thailand. *Toxics*, 8(4), 1–18. <https://doi.org/10.3390/toxics8040093>

Koch, H. M., Preuss, R., Angerer, J., Foster, P., Sharpe, R. y Toppari, J. (2006). Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP): Human metabolism and internal exposure - An update and latest results. *International Journal of Andrology*, 29(1), 155–165. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2005.00607.x>

Kokosa, J. M. (2019). Selecting an extraction solvent for a greener liquid phase microextraction (LPME) mode-based analytical method. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 118, 238–247. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.012>

L

Laconte, L., Nitin, N. y Bao, G. (2005). Magnetic nanoparticle probes. *Materials Today*, 8, 32–38. [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(05\)00893-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(05)00893-X)

Lee, Y. C. y Kang, I. J. (2017). Optimal Fabrication Conditions of Chitosan–Fe₃O₄–Gold Nanoshells as an Anticancer Drug Delivery Carriers. *Liu* 313–319. <https://doi.org/10.1002/bkcs.11083>

Li, H. L., Ma, W. L., Liu, L. Y., Zhang, Z., Sverko, E., Zhang, Z. F., Song, W. W., Sun, Y. y Li, Y. F. (2019). Phthalates in infant cotton clothing: Occurrence and implications for human exposure. *Science of the Total Environment*, 683, 109–115. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.132>

Li, G. y Row, K. H. (2019). Utilization of deep eutectic solvents in dispersive liquid-liquid micro-extraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 120, 115651. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115651>

Liu, S., Chen, H., Lu, X., Deng, C., Zhang, X. y Yang, P. (2010). Facile synthesis of copper(II) immobilized on magnetic mesoporous silica microspheres for selective enrichment of peptides for mass spectrometry analysis. *Angewandte Chemie - International Edition*, 49(41), 7557–7561. <https://doi.org/10.1002/anie.201003602>

Lu, C., Tang, Z., Gao, X. X., Ma, X. y Liu, C. (2018). Computer-aided design of magnetic dummy molecularly imprinted polymers for solid-phase extraction of ten phthalates from food prior to their determination by GC-MS/MS. *Microchimica Acta*, 185(8). <https://doi.org/10.1007/s00604-018-2892-5>

Luís, C.; Algarra, M.; Câmara, J.S. y Perestrelo, R. (2021). Comprehensive Insight from Phthalates Occurrence: From Health Outcomes to Emerging Analytical Approaches. *Toxics*, 9, 157. <https://doi.org/10.3390/toxics9070157>

M

Ma, Y., Hashi, Y., Ji, F. y Lin, J. M. (2010). Determination of phthalates in fruit jellies by dispersive SPE coupled with HPLC-MS. *Journal of Separation Science*, 33(2), 251–257. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900557>

Mariana, M., Feiteiro, J., Verde, I. y Cairrao, E. (2016). The effects of phthalates in the cardiovascular and reproductive systems: A review. *Environment International*, 94, 758–776. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.07.004>

Martínez, G., Merinero, M., Pérez-Aranda, M., Pérez-Soriano, E. M., Ortiz, T., Begines, B. y Alcudia, A. (2021). Environmental impact of nanoparticles' application as an emerging technology: A review. *Materials*, 14(1), 1–26. <https://doi.org/10.3390/ma14010166>

Matuszewski, B. K., Constanzer, M. L. y Chavez-Eng, C. M. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75(13), 3019–3030. <https://doi.org/10.1021/ac020361s>

Meeker, J. D., Sathyanarayana, S. y Swan, S. H. (2009). Phthalates and other additives in plastics: human exposure and associated health outcomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2097–2113. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0268>

Meng, J., Bu, J., Deng, C. y Zhang, X. (2011). Preparation of polypyrrole-coated magnetic particles for micro solid-phase extraction of phthalates in water by gas chromatography-mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*, 1218(12), 1585–1591. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.01.057>

Moazzen, M., Mousavi Khaneghah, A., Shariatifar, N., Ahmadloo, M., Eş, I., Baghani, A. N., Yousefinejad, S., Alimohammadi, M., Azari, A., Dobaradaran, S., Rastkari, N., Nazmara, S., Delikhoon, M. y Jahed Khaniki, G. R. (2019). Multi-walled carbon nanotubes modified with iron oxide and silver nanoparticles (MWCNT-Fe₃O₄/Ag) as a novel adsorbent for determining PAEs in carbonated soft drinks using magnetic SPE-GC/MS method. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(4), 476–488. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.03.003>

Moreira, M. A., André, L. C. y Cardeal, Z. D. L. (2015). Analysis of plasticiser migration to meat roasted in plastic bags by SPME-GC/MS. *Food Chemistry*, 178, 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.01.078>

Morelli, D. C., Bernardi, G., Morés, L., Pierri, M. E. y Carasek, E. (2020). A green - high throughput –extraction method based on hydrophobic natural deep eutectic solvent for the determination of emerging contaminants in water by high performance liquid chromatography – diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 1626, 461377. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461377>

Morgenstern, R., Whyatt, R. M., Insel, B. J., Calafat, A. M., Liu, X., Rauh, V. A., Herbstman, J., Bradwin, G. y Factor-Litvak, P. (2017). Phthalates and thyroid function in preschool age children: Sex specific associations. *Environment International*, 106, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2017.05.007>

Müllerová, D., Bouchalová, V., Matějková, D., Kovářová, K., Svačina, Š., Vrbík, K., Pavloušková, J., Dvořáková, J. y Müller, L. (2016). Phthalates exposure indicators determined by urinary phthalate metabolites in healthy non-obese Czech adults: FANTOM study. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 33(12), 1817–1825. <https://doi.org/10.1080/19440049.2016.1241898>

Musatadi, M., González-Gaya, B., Irazola, M., Prieto, A., Etxebarria, N., Olivares, M. y Zuloaga, O. (2021). Multi-target analysis and suspect screening of xenobiotics in milk by uhplc-hrms/ms. *Separations*, 8(2), 1–22. <https://doi.org/10.3390/separations8020014>

N

Nagorka, R. y Koschorreck, J. (2020). Trends for plasticizers in German freshwater environments – Evidence for the substitution of DEHP with emerging phthalate and non-phthalate alternatives. *Environmental Pollution*, 262, 114237. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114237>

Nahar, L., Onder, A. y Sarker, S. D. (2020). A review on the recent advances in HPLC, UHPLC and UPLC analyses of naturally occurring cannabinoids (2010–2019). *Phytochemical Analysis*, 31(4), 413–457. <https://doi.org/10.1002/pca.2906>

Napolitano-Tabares, P. I., Negrín-Santamaría, I., Gutiérrez-Serpa, A. y Pino, V. (2021). Recent efforts to increase greenness in chromatography. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 32, 100536. <https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2021.100536>

Notardonato, I., Salimei, E., Russo, M. V. y Avino, P. (2018). Simultaneous determination of organophosphorus pesticides and phthalates in baby food samples by ultrasound–vortex-assisted liquid–liquid microextraction and GC–IT/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(14), 3285–3296. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0986-x>

Notardonato, I., Passarella, S., Ianiri, G., Di Fiore, C., Russo, M. V. y Avino, P. (2020). Analytical method development and chemometric approach for evidencing presence of plasticizer residues in nectar honey samples. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(5). <https://doi.org/10.3390/ijerph17051692>

NRC. (1999). *Hormonally active agents in the environment*. Washington, DC: National Research Council, NationalAcademies Press.

O

Ortega-Zamora, C., Jiménez-Skrzypek, G., González-Sálamo, J. y Hernández-Borges, J. (2021). Extraction of phthalic acid esters from soft drinks and infusions by dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of the floating organic drop using a menthol-based natural deep eutectic solvent. *Journal of Chromatography A*, 1646, 462132. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462132>

OSHA. (2021). *Occupational Safety and Health Guideline for Dibutyl Phthalate*. <https://www.osha.gov/chemicaldata/720>. (Último acceso en septiembre de 2021).

Otero, P., Saha, S. K., Moane, S., Barron, J., Clancy, G. y Murray, P. (2015). Improved method for rapid detection of phthalates in bottled water by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 997, 229–235. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.05.036>

Otoukesh, M., Es'haghi, Z., Feizy, J. y Nerin, C. (2020). Graphene oxide/ layered double hydroxides@ sulfonated polyaniline: A sorbent for ultrasonic assisted dispersive solid phase extraction of phthalates in distilled herbal beverages. *Journal of Chromatography A*, 1625, 461307. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461307>

P

Pang, Y. H., Yue, Q., Huang, Y. ying, Yang, C. y Shen, X. F. (2020). Facile magnetization of covalent organic framework for solid-phase extraction of 15 phthalate esters in beverage samples. *Talanta*, 206, 120194. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120194>

Panio, A., Fabbri Corsarini, S., Bruno, A., Lasagni, M., Labra, M. y Saliu, F. (2020). Determination of phthalates in fish fillets by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS): A comparison of direct immersion solid phase microextraction (SPME) versus ultrasonic assisted solvent extraction (UASE). *Chemosphere*, 255, 127034. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127034>

Plastics Collectors (2020). ¿Cómo se hace el plástico? Proceso de producción de plástico simplificado. <https://www.plasticcollectors.com/es/blog/how-is-plastic-made/> (Último acceso en junio de 2021)

Plastics Europe. (2021). *Plastics – The facts 2020*. https://www.plasticseurope.org/application/files/5716/0752/4286/AF_Plastics_the_facts-WEB-2020-ING_FINAL.pdf (Último acceso en junio de 2021)

Perestrelo, R., Silva, P., Porto-Figueira, P., Pereira, J. A. M., Silva, C., Medina, S. y Câmara, J. S. (2019). QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. *Analytica Chimica Acta*, 1070, 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.036>

Perestrelo, R., Silva, C. L., Algarra, M. y Câmara, J. S. (2021). Evaluation of the occurrence of phthalates in plastic materials used in food packaging. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(5), 1–11. <https://doi.org/10.3390/app11052130>

Pinsrithong, S. y Bunkoed, O. (2018). Hierarchical porous nanostructured polypyrrole-coated hydrogel beads containing reduced graphene oxide and magnetite nanoparticles for extraction of phthalates in bottled drinks. *Journal of Chromatography A*, 1570, 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.074>

Q

R

Rakić, T., Kasagić-Vujanović, I., Jovanović, M., Jančić-Stojanović, B. y Ivanović, D. (2014). Comparison of Full Factorial Design, Central Composite Design, and Box-Behnken Design in Chromatographic Method Development for the Determination of Fluconazole and Its Impurities. *Analytical Letters*, 47(8), 1334–1347. <https://doi.org/10.1080/00032719.2013.867503>

Razavi, N. y Es'haghi, Z. (2018). Employ of magnetic polyaniline coated chitosan nanocomposite for extraction and determination of phthalate esters in diapers and wipes using gas chromatography. *Microchemical Journal*, 142, 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.07.015>

Reddy, B. S., Rozati, R., Reddy, B. V. R. y Raman, N. V. V. S. S. (2006). Association of phthalate esters with endometriosis in Indian women. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 113(5), 515–520. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2006.00925.x>

Reglamento (UE) nº 10/2011 de la Comisión del 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos.

Reglamento (UE) 2018/2005 de la Comisión del 17 de diciembre de 2018 que modifica el anexo XVII del Reglamento (CE) nº 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y mezclas químicas (REACH)

Regmi, B. P. y Agah, M. (2018). Micro Gas Chromatography: An Overview of Critical Components and Their Integration. *Analytical Chemistry*, 90(22), 13133–13150. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b01461>

Reinholds, I., Jansons, M., Pugajeva, I. y Bartkevics, V. (2019). Recent Applications of Carbonaceous Nanosorbents in Solid Phase Extraction for the Determination of Pesticides in Food Samples. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 49(5), 439–458. <https://doi.org/10.1080/10408347.2018.1542586>

Ríos, Á. y Zougagh, M. (2016). Recent advances in magnetic nanomaterials for improving analytical processes. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 84, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.03.001>

Rodríguez-Ramos, R., Socas-Rodríguez, B., Santana-Mayor, Á. y Rodríguez-Delgado, M. Á. (2020). A simple, fast and easy methodology for the monitoring of plastic migrants in alcoholic and non-alcoholic beverages using the QuEChERS method prior to gas chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(7), 1551–1561. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-02382-0>

Rodríguez-Ramos, R., Socas-Rodríguez, B., Santana-Mayor, Á., Salazar-Carballo, P. Á., y Rodríguez-Delgado, M. Á. (2021). Sustainable polypyrrole-based magnetic-microextraction of phthalates from jellies and apple-based beverages prior to tandem mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*, 1637. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461858>

Russo, M. V., Avino, P. y Notardonato, I. (2016). Fast analysis of phthalates in freeze-dried baby foods by ultrasound-vortex-assisted liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography-ion trap/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1474, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.10.058>

Rutkowska, M., Owczarek, K., Guardia, M. de la, Płotka-Wasyłka, J. y Namieśnik, J. (2017). Application of additional factors supporting the microextraction process. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 97, 104–119. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.005>

S

Santana-Mayor, Á., Socas-Rodríguez, B., Afonso, M. del M., Palenzuela-López, J. A., y Rodríguez-Delgado, M. Á. (2018). Reduced graphene oxide-coated magnetic-nanoparticles as sorbent for

the determination of phthalates in environmental samples by micro-dispersive solid-phase extraction followed by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1565, 36–47. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.06.031>

Santana-Mayor, Á., Socas-Rodríguez, B., Rodríguez-Ramos, R., Herrera-Herrera, A. V. y Rodríguez-Delgado, M. Á. (2021). Quality assessment of environmental water by a simple and fast non-ionic hydrophobic natural deep eutectic solvent-based extraction procedure combined with liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of plastic migrants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 413(7), 1967–1981. <https://doi.org/10.1007/s00216-021-03166-1>

Sapozhnikova, Y. (2021). Non-targeted screening of chemicals migrating from paper-based food packaging by GC-Orbitrap mass spectrometry. *Talanta*, 226, 122120. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122120>

Serrano, S. E., Braun, J., Trasande, L., Dills, R. y Sathyanarayana, S. (2014). Phthalates and diet: A review of the food monitoring and epidemiology data. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/1476-069X-13-43>

Shabestari-Khiabani, S., Farshbaf, M., Akbarzadeh, A. y Davaran, S. (2017). Magnetic nanoparticles: preparation methods, applications in cancer diagnosis and cancer therapy. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 45(1), 6–17. <https://doi.org/10.3109/21691401.2016.1167704>

Shih, M. F., Pan, K. H. y Cherng, J. Y. (2015). Possible mechanisms of Di(2-ethylhexyl) phthalate-induced MMP-2 and MMP-9 expression in A7r5 rat vascular smooth muscle cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(12), 28800–28811. <https://doi.org/10.3390/ijms161226131>

Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A. V., Asensio-Ramos, M. y Hernández-Borges, J. (2015). Dispersive Solid-Phase Extraction. *Analytical Separation Science*, 1525–1570. <https://doi.org/10.1002/9783527678129.assep056>

Socas-Rodríguez, B., González-Sálamo, J., Herrera-Herrera, A. V., Santana-Mayor, Á. y Hernández-Borges, J. (2018). Determination of phthalic acid esters in different baby food samples by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410(22), 5617–5628. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0977-y>

Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A. V., Asensio-Ramos, M. y Rodríguez-Delgado, M. Á. (2020). Recent applications of magnetic nanoparticles in food analysis. *Processes*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/PR8091140>

Su, T. C., Hwang, J. J., Sun, C. W. y Wang, S. L. (2019). Urinary phthalate metabolites, coronary heart disease, and atherothrombotic markers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 173, 37–44. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.021>

Sun, J., He, H. y Liu, S. (2014). Determination of phthalic acid esters in Chinese white spirit using dispersive liquid-liquid microextraction coupled with sweeping β -cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Separation Science*, 37(13), 1679–1686. <https://doi.org/10.1002/jssc.201400118>

Swan, S. H. (2008). Environmental phthalate exposure in relation to reproductive outcomes and other health endpoints in humans. *Environmental Research*, 108(2), 177–184. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2008.08.007>

T

Tankiewicz, M., Olkowska, E., Berg, A. y Wolska, L. (2020). Advancement in Determination of Phthalate Metabolites by Gas Chromatography Eliminating Derivatization Step. *Frontiers in Chemistry*, 7, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00928>

Tong, Y., Liu, X. y Zhang, L. (2019). Green construction of Fe₃O₄@GC submicrocubes for highly sensitive magnetic dispersive solid-phase extraction of five phthalate esters in beverages and plastic bottles. *Food Chemistry*, 277, 579–585. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.021>

V

Vaitsis, C., Sourkouni, G. y Argiris, C. (2019). Metal Organic Frameworks (MOFs) and ultrasound: A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 52, 106–119. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.11.004>

Vasconcelos, I. y Fernandes, C. (2017). Magnetic solid phase extraction for determination of drugs in biological matrices. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 89, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.11.011>

W

Walters, P., Cadogan, D.F. y Howick, C.J. (2021). *Plasticizers*. In Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH. https://doi.org/10.1002/14356007.a20_439.pub2

Wang, L., Wu, Z., Gong, M., Xu, Y. y Zhang, Y. (2020a). Non-dietary exposure to phthalates for pre-school children in kindergarten in Beijing, China. *Building and Environment*, 167, 106438. <https://doi.org/10.1016/j.buildenv.2019.106438>

Wang, X. L., Lu, Y., Shi, L., Yang, D. y Yang, Y. (2020b). Novel low viscous hydrophobic deep eutectic solvents liquid-liquid microextraction combined with acid base induction for the determination of phthalate esters in the packed milk samples. *Microchemical Journal*, 159, 105332. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105332>

Weng, T. I., Chen, M. H., Lien, G. W., Chen, P. S., Lin, J. C. C., Fang, C. C. y Chen, P. C. (2017). Effects of gender on the association of urinary phthalate metabolites with thyroid hormones in children: A prospective cohort study in Taiwan. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(2), 1–23. <https://doi.org/10.3390/ijerph14020123>

Werner, E.F., Braun, J.M., Yolton, K., Khoury, J.C. y Lanphear, B.P. (2015). The association between maternal urinary phthalate concentrations and blood pressure in pregnancy: the HOME study. *Environmental Health* 14, 75. <https://doi.org/10.1186/s12940-015-0062-3>.

Whiting, J. J., Myers, E., Manginell, R. P., Moorman, M. W., Anderson, J., Fix, C. S., Washburn, C., Staton, A., Porter, D., Graf, D., Wheeler, D. R., Howell, S., Richards, J., Monteith, H., Achyuthan, K. E., Roukes, M. y Simonson, R. J. (2019). A high-speed, high-performance, microfabricated comprehensive two-dimensional gas chromatograph. *Lab on a Chip*, 19(9), 1633–1643. <https://doi.org/10.1039/c9lc00027e>

Wilkes, C.E.; Summers, J.W. y Daniels, C.A. (2005). *PVC Handbook*. Carl Hanser Verlag GmbH & Co.

Wypych, G. (2017). *Handbook of plasticizers*. ChemTec Publishing.

X

Xu, L., Kim, M. J., Kim, K. Do, Choa, Y. H. y Kim, H. T. (2009). Surface modified Fe₃O₄ nanoparticles as a protein delivery vehicle. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 135(1–3), 8–12. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2009.08.022>

Xue, S., Wang, Y., Wu, D., Shen, J., Wei, Y. y Wang, C. (2019). Core-shell structured magnetic mesoporous carbon nanospheres derived from metal-polyphenol coordination polymer-coated

Fe3O4 and its application in the enrichment of phthalates from water samples. *Journal of Separation Science*, 42(23), 3512–3520. <https://doi.org/10.1002/jssc.201900465>

Y

Yadav, S., Rai, S., Srivastava, A. K., Panchal, S., Patel, D. K., Sharma, V. P., Jain, S. y Srivastava, L. P. (2017). Determination of pesticide and phthalate residues in tea by QuEChERS method and their fate in processing. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(3), 3074–3083. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7673-2>

Yang, J., Li, Y., Wang, Y., Ruan, J., Zhang, J. y Sun, C. (2015). Recent advances in analysis of phthalate esters in foods. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 72, 10–26. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.03.018>

Yang, X., Chen, D., Lv, B., Miao, H., Wu, Y. y Zhao, Y. (2018). Dietary exposure of the Chinese population to phthalate esters by a Total Diet Study. *Food Control*, 89, 314–321. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.11.019>

Z

Zhang, S.H., Shen, Y.X., Li, L., Fan, T.T., Wang, Y. y Wei, N. (2018). Phthalate exposure and high blood pressure in adults: a cross-sectional study in China. *Environe. Sci. Pollut. Res.* 25 (16), 15934–15942. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-1845-1>.

Zhao, J. F., Hsiao, S. H., Hsu, M. H., Pao, K. C., Kou, Y. R., Shyue, S. K. y Lee, T. S. (2016). Di-(2-ethylhexyl) phthalate accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Archives of Toxicology*, 90(1), 181–190. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1377-5>