

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**



**DETERMINACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE MONÓMEROS Y  
ADITIVOS PLÁSTICOS DE ENVASES ALIMENTARIOS**

**Memoria que presenta para aspirar al grado de Doctora en  
Química la licenciada Martha Irene González Castro**



**Dña. FÁTIMA OLEA SERRANO, Doctora en Farmacia, Catedrática de Nutrición y Bromatología del Departamento de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Granada.**

**CERTIFICA:** Que **Dña. MARTHA IRENE GONZÁLEZ CASTRO**, Licenciada en Química por la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, ha realizado su memoria de **TESIS DOCTORAL** con el título **DETERMINACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE MONOMEROS Y ADITIVOS PLÁSTICOS DE ENVASES ALIMENTARIOS** bajo mi tutela y dirección para optar al grado de **DOCTORA EN QUÍMICA** por la Universidad de Granada, dando mi conformidad para que sea presentada, leída y defendida ante el Tribunal que le sea asignado para su juicio crítico y calificación.

Granada, 28 de febrero de 2006

**D. NICOLAS OLEA SERRANO, Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático de Radiología y Medicina Física del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Universidad de Granada y Facultativo Especialista de Área del Servicio de Medicina Nuclear del Hospital Clínico San Cecilio de Granada.**

**CERTIFICA:** Que **Dña. MARTHA IRENE GONZÁLEZ CASTRO**, Licenciada en Química por la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, ha realizado su memoria de **TESIS DOCTORAL** con el título **DETERMINACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE MONOMEROS Y ADITIVOS PLÁSTICOS DE ENVASES ALIMENTARIOS** bajo mi tutela y dirección para optar al grado de **DOCTORA EN QUÍMICA** por la Universidad de Granada, dando mi conformidad para que sea presentada, leída y defendida ante el Tribunal que le sea asignado para su juicio crítico y calificación.

Granada, 28 de febrero de 2006

**Dña ANA MARIA RIVAS VELASCO , Doctora en Farmacia, contratada Ramón y Cajal por el Departamento de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Granada.**

**CERTIFICA:** Que **Dña. MARTHA IRENE GONZÁLEZ CASTRO**, Licenciada en Química por la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, ha realizado su memoria de **TESIS DOCTORAL** con el título **DETERMINACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE MONOMEROS Y ADITIVOS PLÁSTICOS DE ENVASES ALIMENTARIOS** bajo mi tutela y dirección para optar al grado de **DOCTORA EN QUÍMICA** por la Universidad de Granada, dando mi conformidad para que sea presentada, leída y defendida ante el Tribunal que le sea asignado para su juicio crítico y calificación.

Granada, 28 de febrero de 2006

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA  
FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD DE GRANADA

Dña. FÁTIMA OLEA SERRANO, Directora del Departamento de  
Nutrición y Bromatología

CERTIFICA:

Que el presente trabajo ha sido realizado por la licenciada en  
Química Doña **MARTHA IRENE GONZÁLEZ CASTRO** en  
el Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de  
Farmacia de la Universidad de Granada

Granada, 28 de febrero de 2006

Fdo. Profa. Dra. Fátima Olea Serrano

La memoria de Tesis Doctoral que lleva por título **DETERMINACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE MONOMEROS Y ADITIVOS PLÁSTICOS DE ENVASES ALIMENTARIOS**, ha sido presentada por la Lda. Martha Irene González Castro para aspirar al grado de Doctora en Química, habiendo sido dirigida por Dña. Fátima Olea Serrano, Catedrática del Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, por D. Nicolás Olea Serrano, Catedrático del Departamento de Radiología y Medicina Física de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada y por Dña. Ana María Rivas Velasco, Doctora en Farmacia, contratada Ramón y Cajal por el Departamento de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Granada.

Fdo. Martha Irene González Castro

El presente trabajo fue realizado en el departamento de Nutrición y Bromatología de la Universidad de Gramada (España) y en el Laboratorio de Biotecnología de la división de Biología Molecular del Instituto Potosino de investigación Científica y tecnológica bajo la asesoría del doctor Antonio de León Rodríguez . Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico del COPOCYT y del consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT) a través del financiamiento del proyecto Fomix FMSLP-2005-C01-15.



*A Dios*

*A mis padres*

*A mis hermanos*

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b>	<b>PAGS.</b>
I.- INTRODUCCION	3
1.1.- Carbonatos y Epoxiresinas	8
1.1.1.- Bisfenol A y derivados	8
1.1.2.- Descripción y fórmula química	8
1.1.3.- Usos	9
1.1.4.- Exposición alimentaria	10
1.1.5.- Presencia en selladores dentales	11
1.1.6.- Exposición ocupacional	12
1.1.7.- Exposición al medio ambiente	13
1.1.8.- Presencia en muestras biológicas	14
1.1.9.- Efectos biológicos	15
1.1.10.- Medidas legislativas	17
1.2.- Esteres del ácido ftálico (Ftalatos)	18
1.2.1.- Descripción y fórmula química	19
1.2.2.- Usos	19
1.2.3.- Exposición alimentaria	21
1.2.4.- Exposición ocupacional	22
1.2.5.- Exposición al medio ambiente	23
1.2.6.- Presencia en muestras biológicas	24
1.2.8 Medidas legislativas	26
1.3.- Antecedentes del uso de técnicas cromatográficas	27
1.3.1.- Extracción de monómeros	27
1.3.2.- Determinaciones por cromatografía líquida	29
1.4.- ¿Por qué se planteo este estudio?	31
2.- OBJETIVOS	39
3.- MATERIAL Y METODOS.	42
3.1.- Material y reactivos.	42
3.1.1.- Cromatógrafos	42

3.1.2.- Columnas para Cromatografía	42
3.1.3.- Equipo de filtración	43
3.1.4.- Campanas de extracción	43
3.1.5.- Microjeringas	43
3.1.6.- Ultrasonido	43
3.1.7.- Autoclave	43
3.1.8.- Horno de microondas	43
3.1.9.- Centrifuga	44
3.1.10.- Rotavapor	44
3.1.11.- Balanza de precisión	44
3.1.12.- Aparato de destilación	44
3.1.13.- Cámara frigorífica y congeladores	44
3.1.14.- Pipetas automáticas	44
3.1.15.- Tratamiento de textos. Representaciones gráficas	44
3.1.16.- Tratamiento estadístico de datos	45
3.2.- Composición química de patrones	45
3.2.1.- Reactivos para la extracción	45
3.2.2.- Reactivos para Cromatografía	45
3.3.- Métodos	45
3.3.1.- Cromatografía líquida de alta resolución HPLC	46
3.3.2.- Análisis cualitativo de Bisfenoles y Ftalatos	47
3.3.2.1- Validación de métodos analíticos	49
3.3.2.2.-Selectividad	49
3.3.2.3.-Reproductibilidad del método cromatográfico	51
3.3.2.4.-Límite de detección y cuantificación	51
3.3.2.5.- Linealidad y curvas de calibrado	57
3.4.- Cromatografía de gases y espectrometria de masas.	73
3.5.- Análisis de bisfenoles y ftalatos.	75
3.5.1.- Metodología analítica.	75
4.- RESULTADOS	81
4.1.- Análisis de bisfenoles y ftalatos en latas de conserva	81
4.1.1.- Metodología analítica	81

4.1.2.-	Análisis de bisfenoles y ftalatos en lata de conserva mexicanas	83
4.1.2.1.-	Características de las muestras	83
4.1.2.2.-	Residuos de bisfenoles y ftalatos	85
4.1.3.-	Análisis de bisfenoles y ftalatos en latas de conserva españolas	87
4.1.3.1.-	Características de las muestras	87
4.1.3.2.-	Residuos de bisfenoles y ftalatos en latas de conserva	89
4.2.-	Análisis de bisfenoles y ftalatos en envases plásticos.	92
4.2.1.-	Metodología analítica	92
4.2.2.-	Análisis de bisfenoles y ftalatos en envases plásticos mexicanos.	93
4.2.2.1.-	Características de las muestras	93
4.2.2.2.-	Residuos de bisfenoles y ftalatos en envases plásticos	93
4.2.2.6.-	Residuos de bisfenoles y ftalatos en biberones mexicanos	96
4.2.3.-	Residuos de bisfenoles y ftalatos en envases plásticos españoles	96
4.2.3.5.-	Estadísticos descriptivos de la presencia de bisfenoles y ftalatos en biberones españoles	.98
4.3.-	Comparación de la migración de componentes de las muestras analizadas.	99
4.3.1.-	Comparación de las latas mexicanas con las españolas	99
4.3.2.-	Comparación de los biberones mexicanos con los españoles	101
4.3.3.-	Comparación de los envases plásticos mexicanos con los españoles.	102
5.-	DISCUSION....	104
6.-	CONCLUSIONES	110
7.-	BIBLIOGRAFIA	114

# **INTRODUCCIÓN**

## **I.- INTRODUCCIÓN**

En el año 8000 antes de nuestra era, el uso de vasijas de arcilla como recipiente da lugar al inicio de la historia del embalaje. Desde entonces su uso ha ido en aumento, evolucionando y diversificándose enormemente en los últimos años, al amparo de las nuevas tecnologías y tratando de satisfacer las nuevas necesidades sociales. Se utilizan envases en cualquier sector de la vida cotidiana, hasta el punto de que el consumidor rechaza aquellos productos que no disponen de un embalaje adecuado.

A mediados del siglo XX, la transformación de la vida rural en urbana planteó el transporte de los alimentos, manteniendo al mismo tiempo un buen estado de conservación. Aparecen los supermercados y grandes almacenes de autoservicio, donde los alimentos no podían ser manipulados individualmente desde los contenedores de transporte y se precisan nuevos envases para adaptarse a esos cambios. Los envases de cartón y papel tuvieron una gran aceptación, ya que mantenían las cantidades prepesadas de artículos básicos. Estos eran fáciles de almacenar, apilar y etiquetar. En este periodo aparece un nuevo material de envase, el plástico. Cuando se encontró el procedimiento para unir pequeñas moléculas orgánicas y formar otras más grandes y pesadas, comparables a las de las resinas vegetales, se gestó el mundo de las resinas

sintéticas que se conocen con el nombre genérico de plásticos o materiales poliméricos.

Todo esto ha introducido un cambio cualitativo en la industria al permitir el desarrollo de procesos de envasado integrados. Las ventajas de estos materiales son: ligereza, versatilidad de forma, facilidad de impresión, buena inercia química, resistencia mecánica adecuada. Los inconvenientes son: permeabilidad al paso de gases y aromas, migración de componentes menores (restos de monómeros o aditivos) del plástico al alimento.

En la actualidad, se comercializan gran número de materiales plásticos para envases de alimentos, pero en la práctica sólo un número reducido de ellos alcanzan difusión. Las resinas sintéticas se empezaron a industrializar a partir de la 2ª Guerra Mundial. Hoy día se puede disponer de unos 60 materiales, algunos de ellos en distintas presentaciones o tipos. Esto multiplica las opciones de los materiales plásticos asequibles en la actualidad. Se pueden identificar cuatro resinas de mercado masivo, fácil procesabilidad, y por tanto, de altos volúmenes de producción, precio bajo y tecnología accesible. Estas son: Polietileno (PE) y sus variantes (PET, PEAD, PEBD), Poliestireno (PS), Polipropileno (PP) y Cloruro de polivinilo (PVC).

Además de los citados, los poliésteres de más aplicación es el Tereftalato de polietileno (PETP). Son moléculas lineales con elevado grado de cristalinidad, excelentes propiedades mecánicas y gran inercia química frente a ácidos, álcalis y disolventes orgánicos excepto fenoles. Son muy transparentes, de buena resistencia mecánica y conservan la forma en un amplio margen de temperaturas desde  $-60^{\circ}\text{C}$  a  $+150^{\circ}\text{C}$ . Otros poliésteres se pueden obtener a partir de alcoholes y derivados del ácido carbónico. Reciben el nombre genérico de policarbonatos. Son de precio elevado y su aplicación por tanto más limitada.

En general, los envases de plástico fueron más económicos y fáciles de producir respecto de los otros materiales. Eran más livianos que los otros y con esto se reducía el costo de transporte. Al momento, el plástico ha reemplazado muchos materiales, permitiendo que la preparación de alimentos sea efectuada muy rápidamente, desde el frigorífico pasando al horno y a la mesa .

Actualmente, con el deseo de facilitar aun más el uso del envase, manteniendo un bajo costo, los diseñadores han desarrollado nuevos materiales complejos, aquellos que contienen combinaciones de metal, papel y plástico. Ejemplos de estos son los *Tetrabik* utilizados para envasar zumos, leche, vino, etc. Los envases que se fabrican con estos



materiales, son más livianos, durables y con gran capacidad de mantener las características sanitarias de los alimentos.

En resumen, los envases son materiales habitualmente en contacto con los alimentos. Se entiende por envase un producto que puede estar fabricado en una gran cantidad de materiales y que sirve para contener, proteger, manipular, distribuir y presentar mercancías en cualquier fase de su proceso productivo, de distribución o venta.

Todo material en contacto con alimentos deberá: 1) Estar fabricado con materiales autorizados para este fin; 2.) No ocasionar modificación en composición o caracteres organolépticos del alimento; 3.) No ceder constituyentes que supongan riesgo para la salud.

Los materiales complejos formados por varias capas distintas se consideraran como una unidad a estos efectos. Si están formados por varios materiales, estos no interaccionaran de forma negativa para el alimento

Actualmente, los alimentos envasados reflejan las necesidades presentes: facilidad de apertura, descripción fiel de su contenido y protección del mismo, buena calidad precio razonable, etc. En los consumidores influye el aspecto, el colorido y el peso del producto. Las decisiones de compra, están influidas por las características externas de los envases. Los primeros envases posiblemente se utilizaron solo para contener bienes necesarios para la supervivencia, especialmente alimentos y agua.

Los materiales utilizados, como envases de pueden clasificar de la siguiente manera

#### 1.- Materiales poliméricos:

Homopolímeros: Macromoléculas en las que se repite un solo tipo de unidad monomérica.

Copolímeros: Macromoléculas en las que se repiten dos o más tipos de unidades monoméricas.

Mezclas de polímeros: mezclas de dos o más polímeros, homo copolímeros.

#### 2.- Revestimientos a base de barnices y pinturas:

Polímeros termoplásticos: Película formada por simple evaporación del disolvente o por proceso térmico, empleando si es necesario medio dispersante.

Polímeros o resinas reticulares Las propiedades finales se logran mediante reacciones de reticulación química.

#### 3.- Aditivos para materiales poliméricos:

Los utilizables serán los que figuren en las listas positivas aprobadas por la Directiva 2004/19/CE.

Además, la Unión Europea, también establece otra clasificación:

*Envase primario.* Todo envase diseñado para constituir en el punto de venta una unidad de venta destinada al consumidor o usuario final.

*Envase Secundario.* Todo envase diseñado para constituir en el punto de venta una agrupación de un número determinado de unidades de venta, tanto si va a ser vendido como tal al usuario o consumidor final, como si se utiliza únicamente como medio para reaprovisionar los anaqueles en el punto de venta; puede separarse del producto sin afectar a las características del mismo.

Los envases de aluminio se empezaron a utilizar en Europa, hace unos 60 años. Por sus excelentes características, adquieren formas muy diversas: envases rígidos (latas), semirígidos (tarrinas y bandejas), flexibles (bolsas) o bien sólo o formando complejos con materiales plásticos. Las aleaciones comerciales de este metal, requieren una protección adicional para disminuir la corrosión, frente a la mayor parte de los alimentos elaborados, en particular de productos vegetales. En ocasiones es suficiente el tratamiento de pasivación del metal (adonizado), pero en la mayoría de sus aplicaciones los envases se protegen con barnices o materiales plásticos. La protección interior del envase, se realiza por revestimientos orgánicos, esto es barnizado, que son compuestos macromoleculares constituidos por una resina base y productos auxiliares que le dan propiedades particulares. Se aplican en forma de soluciones o dispersiones en disolventes orgánicos, que por evaporación del mismo o bien, por reacción química, se transforman en una película sólida adherida al soporte metálico (RAR, U.E., 2003).

El mayor campo de aplicación actual de los envases rígidos de aluminio, son: los envasados de cervezas, bebidas carbonatadas no alcohólicas, conservas de pescados y mariscos en aceite y salsas especiales. Las frutas y vegetales en conserva, por su mayor agresividad, sólo pueden envasarse en este material, si previamente el aluminio se ha cubierto de barniz adecuado. Para los envases semirígidos y flexibles de aluminio, se utilizan láminas de aluminio cuya cara externa del envase está recubierta de un material de elevada resistencia mecánica (poliéster, poliamida, etc.) y la cara interna recubierta con un termoplástico (generalmente polietileno o polipropileno). Para los alimentos que requieran aislamiento del oxígeno y vapor de agua, como alimentos deshidratados, café, etc. se usa polipropileno. (Cray., 1998).

Los materiales poliméricos, presentan algunos inconvenientes como la permeabilidad al paso de gases y aromas, y la migración de algunos componentes (restos de monómeros

y aditivos) del plástico al alimento. ( Mungia y col., 2001; Kang y col., 2002; Braunrath y col., 2005).

El problema se puede originar en la interacción envase- alimento. En estos envases, hay una actividad físico-química continua en las interfases del material, tanto con el alimento, como con el medio ambiente. Como consecuencia, el alimento queda expuesto a ciertos cambios químicos que pueden alterar sustancialmente las características sensoriales o nutricionales del alimento, o bien, incorporar al mismo residuos tóxicos que pueden hacerlo rechazable. Algunos componentes no volátiles del alimento, poseen afinidad por los polímeros y son absorbidos, por ejemplo: las grasas por polímeros olefílicos y los colorantes de los alimentos pueden ser absorbidos por los plásticos, ( Page y col., 1992; Aurela y col., 1999; Ozaki y col., 2002, Thomson y col. 2005).

El fenómeno de migración, consiste en la transferencia de masa entre el material de envase, el alimento envasado y el entorno, si bien, se aplica más concretamente a la transferencia de masa del envase al producto envasado. Aunque los polímeros utilizados son muy inertes y difícilmente ceden masa al alimento, no ocurre así con los componentes minoritarios que pueden incorporarse fácilmente al producto envasado. ( Brotons y col., 1995; Mungia y col., 2001; Yoshida y col., 2001; Goodson y col, 2002; Thomson y col., 2005). Estos componentes minoritarios son de diferente naturaleza:

Monómeros residuales no polimerizados o polímeros de bajo peso molecular, originados por defectos de polimerización o por degradación de los polímeros en el tratamiento térmico.

- Aditivos adicionados intencionalmente al polímero, para modificar sus propiedades físicas (ej: esteres de ácido sebásico como plastificantes o alquilfenoles como antioxidantes)

- Sustancias de bajo peso molecular, tales como adhesivos en películas laminadas, barnices, tintas de impresión, etc.

La polimerización de los monómeros constituyentes de las resinas, puede no ser completa por lo que es frecuente encontrar algunos de estos compuestos como contaminantes de los alimentos contenidos en estos envases. Además, la esterilización en autoclave de los alimentos contenidos en tales envases metálicos, así como, el calentar los alimentos en el horno de microondas en envases plásticos, los cuales se encuentran en contacto permanente ya sea en medio ácido o básico, pueden provocar su alteración química, degradación y migración desde la pared del envase. (Brotons y col,

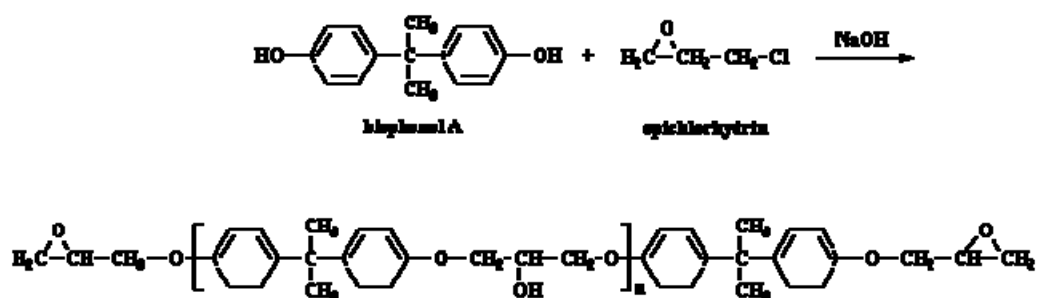
1995; Mungia y col., 2001; Yoshida y col., 2001; Goodson y col., 2002; Thomson y col., 2005)

## 1.1.-POLICARBONATOS Y EPOXI-RESINAS.-

### 1.1.1. Bisfenol- A y derivados

Las primeras epoxiresinas se obtuvieron por condensación entre epíclorhidrinas y BFA. Esta reacción conduce al BADGE y dependiente de la relación molar de los reactantes, así como, de las condiciones de reacción se obtiene productos de diferente peso molecular y grado de condensación. Una epoxi-resina líquida y de bajo peso molecular, se obtiene con dos moléculas de epíclorhidrina y una de BFA. A mayor peso molecular se aumenta la viscosidad. Sin embargo, estos productos son solubles, fácilmente fundibles y sin marcadas propiedades mecánicas o químicas. Para convertirlo en un producto insoluble o termoestable, la epoxi-resina requiere la reacción con otros componentes químicos llamados agentes de curación, los derivados aminados son los más empleados.

La mezcla precondensada de una resina epoxi, con una resina fenólica da lugar a una resina epoxifenólica:



A pesar de que existen numerosos bisfenoles con distinta estructura química, todos tienen en común la misma base, la tabla siguiente recoge los radicales mas frecuente:

PRODUCTO	R1	R2	R3
BFA	-OH	-CH3	-CH3
BFF	-OH	-H	-H
Bis-GMA	-OCHHH2CHHCCCCCCHOH- CH2OOC-C(CH3)=CH2	-CH3	-CH3
Bis-DMA	-OOC-C(CH3)=CH2	-CH3	-CH3
BADGE	-OCH2-CH-CH2 O	-CH3	-CH3

Tabla 1. Estructura de bisfenoles

#### 1.1.2. Usos de BFA y derivados.-

La producción europea de bisfenol-A (BFA), Producción de bisfenol-A: 100.000 – 500.000 t/a. (Estrucplan On Line, 2000). Se emplea en la elaboración de bolsas esterilizables, para el recubrimiento de latas de conserva, en albañilería, equipamientos eléctricos y electrónicos, automóviles, protectores para deportes, barnices, en materiales ortopédicos, en tintes y como base del composite dental. También, se utiliza como aditivo de otros materiales plásticos, como resinas vinílicas y acrílicas, en gomas naturales y sintéticas. Se ha demostrado, asimismo, la presencia de BFA en alimentos, productos manufacturados (Brotos y col, 1995) y productos farmacéuticos (Olea y col, 1996; Pulgar y col, 2000), por lo que el riesgo de exposición humana es considerable. El bisfenol A es un ingrediente del plástico policarbonato y de las resinas epoxi. El policarbonato pesa poco es duro y claro, resiste muy bien el calor y la electricidad. EL Bisfenol A y sus derivados, se encuentran fundamentalmente como componentes de materiales poliméricos de elevada calidad comercial, resistentes a temperaturas elevadas. Sus oligómeros más frecuentes son: Bis-fenol A de glicidil eter (BADGE), metacrilato de bisfenol A diglicidil eter (Bis-GMA), dimetacrilato de bisfenol A (BisDMA), y algunos etoxilatos y propoxilatos de bisfenol A. Estos materiales se usan con gran frecuencia, como barnices protectores de latas, de conserva de alimentos. (R. A, R., U.E., 2003).

#### 1.1.3 .Exposición alimentaria.-

Como se viene comentando, los alimentos pueden ser vehículo de sustancias indeseables en este caso los monómeros de los materiales que constituyen los envases y

que por diversos motivos migran hasta el alimento. Las resinas utilizadas para recubrimientos en las latas de conserva son una fuente constante de exposición.

En los años 90 nuestro grupo de investigación analizó muestras de alimentos vegetales en conserva, de diferentes países (Brasil, Francia, España, Turquía y los Estados Unidos) y se encontraron niveles de BFA entre los 29,9 y los 80  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , (Brotons y col., 1995). Posteriormente, se analizaron en Italia, un total de 382 muestras de pescado enlatado en aceite, demostrándose así, que cerca del 3% de las muestras contenían BADGE a concentración media de 1 mg/kg, excediendo los niveles permitidos por la Unión Europea. (Simoneau y col., 1999). De igual manera en Suecia, se analizaron 50 muestras de latas de atún europeas, para medir niveles de migración de BADGE y se determinaron niveles de 20 $\mu\text{g}/\text{gr}$  en atún y 43  $\mu\text{g}/\text{gr}$  en aceite Existen otros estudios realizados en Japón, en donde se analizaron muestras de alimentos enlatados, encontrándose niveles de BFA de 5 ng/ml en la porción líquida; sin embargo, fue principalmente detectado en un nivel máximo de hasta 11  $\mu\text{g}/\text{lata}$  en la porción sólida. (Yoshida y cols., 2001). Investigaciones hechas en Reino Unido, en diferentes tipos de alimentos enlatados: vegetales, sopas, frutas, formulas infantiles, bebidas y postres, se detectaron niveles de BFA entre 0,007 mg/kg hasta 0,07mg/kg (Goodson y col. 2002). En estudios realizados en Suiza, se ha encontrado que el BADGE, migra hacia los alimentos enlatados, conservas de pescado en aceite y salsa de tomate a niveles de 5,1 mg/kg y de 8,3 mg/kg respectivamente. (Hammarling y col., 2002).

Algunos estudios más, se han efectuado en latas de alimentos para perros y para gatos, en las que se han encontrado niveles de BFA en concentraciones de 11 a 206 ng/g y de 13 a 136 ng/g de BFA respectivamente. (Kang y col., 2002).

En otro estudio efectuado en latas de café, se relacionaron los niveles de cafeína encontrados con los de BFA en latas contenedoras de café entero y descafeinado, se determinaron niveles de 84 y 66,2 ng/mL respectivamente, además, se demostró que la migración de BFA se incrementa paralelamente a la extracción de cafeína cuando se trata con agua caliente. (Kang, y col., 2002). Estudios realizados también en Japón, determinaron la relación entre la migración de BFA de las latas con recubrimiento epóxico al medio y soluciones de glucosa, sal, o aceite vegetal, medidos a temperaturas altas y tiempo determinado. Se encontró que a una temperatura de 121 °C, la presencia de BFA es de 1 a 10% en salmuera y aceites vegetales (maíz, oliva y soja) y en glucosa resultado similar a la registrada en las muestras de agua control. (Kang y col., 2003). Así mismo, en investigaciones realizadas para determinar la presencia de BFA en muestras

de leche y productos lácteos (yogurt, crema, mantequilla, pudines y leche condensada), se encontró en niveles de 21 a 43  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en productos enlatados, valores superiores a los permitidos por la Unión Europea y Japón. (Kang y col., 2003). De nuevo se exceden los límites de migración permitidos, por la Unión Europea, en biberones de plástico, tanto de uso simulado como nuevos, el BFA por degradación de polímeros aparece en el medio con valores entre  $8,4 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{Lt}$ . y de  $0,23 \pm 0,12 \mu\text{g}/\text{Lt}$  respectivamente (Brede y col., 2003). No solo se han realizado estudios de migración para los policarbonatos sino que conjuntamente se han analizado otros monómeros. Así en estudios recientes, se analizaron los siguientes bisfenoles y ftalatos, (DEP, DBP, BBP; DHEP, nonilfenol, BFA y BADGE) en muestras comerciales de leches envasadas, se tomaron muestras de cinco marcas de leche de diferentes lugares. Todas las muestras presentaron migración entre 0,28 y 85,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Estos niveles aumentaron en leches esterilizadas. El nonilfenol, DEP, DBP, DEHP fueron los de mayor contribución. (Casajuana y col., 2004). En un trabajo reciente, efectuado en Nueva Zelanda sobre alimentos enlatados, en todas las muestras excepto en bebidas gaseosas, presentaron niveles de BFA con una media de 10 a 29  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . (Thomson y col., 2005). También, se ha desarrollado la determinación de BFA en muestras de alimentos enlatados de frutas y vegetales, detectándose la presencia en niveles de 0.1 ng/ml para bebidas enlatadas y de 4,3 ng/mL en vegetales en conserva. (Braunrath y col., 2005).

La migración de BFA y BADGE en latas de pescado sometidas al calor en su proceso de elaboración permitieron unos valores de 646,5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de BFA, cuando el polímero es organosol y entre 11,3 y 138,4  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de BFA cuando el polímero es epoxídico. Valores menores se encuentran en envases de vegetales. Así mismo, se sometieron estas latas a almacenaje durante 70 días y se observó que los niveles de migración de BFA y BADGE no variaron. (Mungia y col., 2005).

#### 1.1.4.-Presencia en selladores dentales.-

Los policarbonatos y epoxi-resinas forman parte importante de otros materiales poliméricos, como es el caso de composites y selladores usados en odontología. Nuestro grupo de trabajo, puso de manifiesto los monómeros presentes en los alimentos en los composites y selladores dentales, así como en la saliva de los individuos a los que se aplican estos composites.

El medio en el que habitualmente se encuentran estos oligómeros, son los composites y selladores empleados en odontología. Son los productos que pretenden sustituir a las

amalgamas. El análisis por HPLC Y CG-MS ha demostrado la presencia de BFA, BADGE, BisGMA y BisDMA y otros oligómeros en los composites. Además, la saliva de voluntarios sanos a los que se les ha aplicado sellador, ha resultado positiva a concentraciones de ng/mL. ( Olea, N. y cols. 1995). En un estudio realizado en muestras de saliva humana de pacientes con composites dentales, recolectada en un período de 1 a 24 horas después de ser aplicado el sellador dental (Delton), el BFA fue encontrado en todas las muestras (Arenholt y col. 1999). En ese mismo año, se realizó un trabajo similar, en el cual se observó la presencia de BFA, BADGE, BisGMA y BisDMA en muestras de saliva de individuos a los que se les había aplicado sellador dental, todos los compuestos fueron encontrados en el total de las muestras. (Schmalz y col. 1999). Se probaron diversos composites dentales y se encontraron BFA, BisDMA y BisGMA en el total de las muestras analizadas (Pulgar y col., 2000). En otros trabajos de investigación, en los que se analizó el BFA y el BisDM, en muestras de materiales para odontología, se encontró la presencia de BisDMA en el total de las muestras, se sugiere la descomposición de este derivado del BFA (Schafer y col., 2002).

#### 1.1.5. Exposición ocupacional.-

En febrero de 1995, se presentó un documento de trabajo del Comité de Salud de Holanda, en el que se recopilaban resultados de diferentes grupos de investigación y en referencia al bisfenol A y BADGE, se recogen datos de DL50, calculados por diversos estudios. La conclusión fue que el BFA, es tóxico cuando se inhala en forma de partículas o aerosoles. El BADGE no pudo clasificarse debido a la falta de datos. Posteriormente en 2003, se ha estimado que la exposición humana por trabajar en la manufactura con BFA constituye un riesgo en la salud humana, todos los trabajadores expuestos proceden de industrias que producen: policarbonatos y artículos derivados, industrias manufactureras de resinas epóxicas y resinas modificadas, manufacturación de pinturas líquidas epóxicas, lacas y barnices, envases térmicos, aditivos de recubrimiento metálico utilizado para envasar alimentos y manufactura de retardantes de llama tetrabromados. Se puede inhalar polvo procedente de la materia prima que se presenta en forma de polvo, gránulos y hojuelas, la concentración media ambiental es del orden de  $0,04 \text{ mg/m}^3$  hasta  $0,086 \text{ mg/m}^3$  mientras que la inhalación humana se encontró en un rango de BFA de 0 a  $5 \text{ mg/m}^3$ , para una jornada de trabajo de 8 horas. También, existe riesgo de exposición dérmica en donde se midieron parámetros de resultados de  $1 \times 10^{-5}$  hasta  $1 \times 10^{-4} \text{ mg/cm}^3/\text{dia}$ , tomando como referencia que el BFA



residual contenido en el PC es de 100 ppm. Si se toma como representativo el valor de 300 ppm de BFA, en resinas epóxicas la exposición estimada se encuentra en un nivel medio de 0,2 a 1,09 mg/m<sup>3</sup> para una jornada laboral de 8 horas. (RAR, U.E., 2003)

#### 1.1.6 Exposición al medio ambiente.-

El informe de la U. E., sobre vertidos al medioambiente de BFA por la producción y el uso de materiales plásticos, policarbonatos, epoxi-resinas, PVC y resinas fenoplásticas, se ha estimado a partir de las emisiones de los procesos de elaboración de artículos plásticos, además de los procesos de reciclaje de papel térmico. La información disponible esta basada en datos proporcionados por las industrias. Así, la vía de medida de exposición ambiental es fundamentalmente por el uso de papel térmico y las industrias de PVC. Una vez liberado a la atmósfera se estima que la vida media del BFA es de 0,2 días. La degradación abiótica en el agua es insignificante, porque el BFA es biodegradable. Los resultados de los análisis sugieren que el BFA es clasificado como fácilmente biodegradable, posiblemente seguido de un corto período de adaptación. Experimentalmente, a partir de coeficientes de partición se estima que el BFA se absorbe moderadamente por suelo, lodo y sedimento antes de llegar a la atmósfera. La precipitación del BFA desde la atmósfera es relativamente baja, debido a que la emisión atmosférica es baja y el tiempo de vida es corto. Datos experimentales sugieren que el BFA tiene un bajo potencial por bioacumulación en especies acuáticas. (R. A. R., U.E., 2003).

En cuanto a los efectos en el medio ambiente, se dispone de información sobre toxicidad en agua dulce, peces marinos y algas. Los posibles efectos son sobre el sistema endocrino, el BFA afecta la síntesis de vitelogenina, las características sexuales secundarias y la espermatogénesis. Las concentraciones medias encontradas son de 1µg/L, pero los estudios realizados no parecen suficientes. (R. A.R., U.E., 2003). En los invertebrados, se presenta mayor sensibilidad al BFA y uno de los efectos es un incremento en la producción de huevos, esto se observó en varias especies, por ejemplo en los caracoles, con niveles medios de 1µg/L. Un factor de valoración de 1,6 µg/L en el pescado es el límite establecido por la NOEC (Concentración a la cual No se Observa Efecto). Sin embargo, los valores máximos de exposición para la valoración de riesgo considerados por la PNEC (Plan Nacional de Eliminación de Contaminantes) basados en los posibles efectos de espermatogénesis son de 0,1 µg/l. ( R. A. R., U. E., 2003). No existen resultados para análisis en especies terrestres. En estudios experimentales con

ratas, el envenenamiento secundario por la vía oral aparece a concentraciones superiores a 33 mg/kg PNEC. Los efectos particulares para el BFA sobre plantas debido a la exposición atmosférica son desconocidos.

Por todo lo expuesto anteriormente se puede decir, que son necesarios más trabajos dirigidos a estudiar a invertebrados y espermatogénesis en pescados, en ambos casos, se debe de dejar en claro que ocurren efectos. La necesidad de investigar estos efectos en organismos terrestres debe ser reconsiderada, una vez más, los resultados de los estudios acuáticos y gestión de riesgos medibles se consideran relevantes. ( R. A. R., U.E., 2003).

#### 1.1.7.- Presencia en muestras biológicas.-

Es de resaltar que en numerosos estudios se ha encontrado la presencia de BFA y sus derivados en muestras humanas. Se han encontrado residuos de BFA en muestras de suero de población adulta. Así mismo, en estudios desarrollados en muestras de suero de mujer, con disfunción ovárica y obesidad, el BFA fue detectado en todas las muestras humanas, la concentración de BFA en suero fue significativamente alta ( $p < 0.05$ ) en mujeres no obesas y en mujeres obesas con ovarios poliquísticos, los niveles encontrados fueron de  $1,05 \pm 0,10$  ng/mL y  $1,17 \pm 0,16$  ng/mL respectivamente y en mujeres obesas normales se encontraron concentraciones de  $1,04 \pm 0,09$  ng/mL. Además, existen correlaciones significativamente positivas entre los niveles de BFA encontrados y los niveles de testosterona total lo que comprueba la estrecha relación que hay entre BFA y efectos estrogénicos. (Takeuchi y cols., 2004). Con anterioridad, se analizaron muestras de semen humano, para probar la presencia de BFA. Los resultados obtenidos mostraron concentraciones de entre 0,5 ng/ml y 2,0 ng/mL dependiendo del método utilizado. (Inoue y cols., 2001). Por otro lado, se han realizado pruebas en suero de humanos sanos encontrándose niveles de BFA de 1,6 ng/mL. (Sajiki. y col., 1999). Además, se han encontrado también, BFA y BADGE en muestras de orina humana, presentándose altas concentraciones de estos compuestos por inhalación de aerosoles de epoxiresinas. En este caso, según los autores, el significado clínico de disrupción endocrina del BFA debe ser investigado en más trabajos de exposición a estos compuestos. (Hanoaka y cols., 2002). Se ha determinado la presencia de BFA en muestras de suero humano, y fluido ascítico, así como, en suero de cordón umbilical, en donde se registraron niveles de concentración de 0,1 a 7,0 ppb de BFA en todas las muestras. (Kuroda., y col., 2003). El BFA es un estrógeno que procede de

materiales plásticos, se determinó en mujeres premenopáusicas, y pacientes postmenopáusicas con cáncer endometrial e hiperplasia. Estos descubrimientos sugieren la asociación, entre exposición a BFA y cánceres hormono-dependientes. (Hiroi y col., 2004).

Estudios recientes han demostrado la presencia de BFA, 2,5-DCP y BF-3 en treinta muestras de orina humana, estas fueron recolectadas en individuos de diferentes grupos demográficos y en adultos voluntarios entre los años 2000 - 2004 y se detectó la presencia de estos tres fenoles libres, en pequeñas porcentajes, en las muestras de orina (9,5% de BFA, 3% de 2,5-DCP y BP-3). El porcentaje del conjugado sulfatado fue similar al libre, sin embargo, en el conjugado glucoronado se encontró la mayor concentración de los compuestos analizados, alcanzándose niveles de 69,5% de BFA, 89% de 2,5-DCP Y 84,6 % de BF-3 del total de las muestras excretadas en orina. (Ye y col., 2005). Ultimamente, se ha comprobado la presencia de BFA en muy diversas muestras humanas suero humano y fluido folicular en cantidades aproximadas de 1-2 ng/mL, así mismo, en suero fetal y fluido amniótico, confirmándose su paso a la placenta. El BFA se encontró en niveles altos de 1,05 y 1,17 ng/mL en suero de mujeres no obesas normales y en mujeres con ovarios poliquísticos respectivamente. (Tsutsumi, 2005).

#### 1.1.8. Efectos biológicos.

Su papel como mimetizador estrogénico fue descrito en 1936, por Dodds y Lawson, al observar que la administración de bisfenoles a ratas ooforectomizadas, ocasionaba cornificación vaginal e incremento de peso uterino (Dodds y Lawson, 1936; Reid y col., 1944). Es interesante comentar que los trabajos sobre metabolismo realizados con BADGE (derivado del Bisfenol A), datan de principio de los ochenta (Clime y col., 1981; Hutson y col.; 1981; Stoydinn y col., 1981) en ellos se estudia la degradación del BADGE administrado a ratas, pero respecto al BFA, aún perdura una gran interrogante, al no quedar aclarado el proceso de degradación y excreción de esta molécula, procedente de la hidrólisis del BADGE.

En referencia a algunos ensayos sobre reproducción, la administración en dosis de 85 a 125 mg/kg, muestra una reducción de fetos vivos. La toxicidad fetal fue estadísticamente significativa y se relacionó con la disminución del peso del feto. Además, en la cría aparecen defectos en la osificación, ventrículos cerebrales agrandados o bien hidrocefalia. De acuerdo con este trabajo, puede deberse a un efecto

teratogénico del BFA.. (Hardin y cols. 1981). Sin embargo, en otros estudios en los que se administraron entre los 10 y los 1250 mg/kg/día de BFA, disuelto en aceite de maíz a ratones en períodos de gestación comprendidos entre los días 6 y 15 muestran síntomas como: espalda arqueada, letargia, polierección, alopecia, pérdida de peso, hemorragias vaginales, respiración fatigosa, etc.

Se deja ver una tendencia hacia la reducción de la gravidez del peso uterino, con el aumento de la dosis del BFA. Además, existe una disminución dosis dependiente del peso medio de los fetos, así mismo, tras la administración oral de varias dosis de BFA, se observa, que el número de camadas por pareja disminuyó significativamente y en estos grupos también, el número de crías vivas disminuyó frente a los controles. ( Reed y cols. 1985)

Posteriormente, otros autores han realizado ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*, probando el efecto estrogénico (Krishnan y col, 1993a; Brotons y col, 1995; Sumpter y col, 1995; Olea y col., 1996b; Feldman y cols., 1997; Hashimoto y col., 2000; Lemmen y col., 2004; Satoh y col., 2004).

Hace unos años la estrogénicidad *in vitro* de un amplio grupo de bisfenoles, se estudio por nuestro grupo de trabajo (Pérez y col, 1998 y Rivas y col, 2002). Se determinó, así, las características de la estructura química que favorecen dicha función. Se puede enunciar que: La presencia de grupos cetónicos en el carbono central y de enlace éter y éster en los hidroxilos terminales, se acompaña de una pérdida importante de estrogénicidad y la sustitución de los hidrógenos del carbono central por cadenas hidrocarbonadas, origina un aumento importante de la capacidad hormonal estrogénica

En el año de 1993, el grupo se presentó una comunicación, en un congreso sobre estrogénicidad en Washintong. Durante varios años su grupo venia trabajando con levaduras y encontraba la presencia de una proteína ligante de estrógenos, por lo cual, postularon la presencia de un primitivo receptor hormonal en las levaduras (S. Cerviseae). Tras su estudio para aislar la sustancia que competía con el estradiol, llegaron a la conclusión que el producto es el BFA, liberado por los envases de policarbonato que se utilizaron para esterilizar el medio de cultivo de las levaduras y una vez aislado el BFA, detrminan su actividad estrogénica con diversos ensayos y concluyen que sustancias no esteroideas, en el medio ambiente pueden ser potentes estrógenos, la práctica de autolavado del material de laboratorio, puede incluir en los medios sustancias contaminantes activas y que los policarbonatos tienen muy diversas

aplicaciones, con lo cual pueden ser otra nueva fuente de contaminación estrogénica para humanos y animales, (Krishman y cols. 1993).

#### 1.1.9.-Medidas legislativas.-

No existe un control legislativo específico en cuanto al BFA en el medio ambiente, sin embargo, se especifican límites de migración de BFA para los alimentos enlatados, el cual nos indica que solamente son permitidos 0,6 ng/mL de BFA por Kg de alimento estableciendo así, los niveles de protección para el consumidor en la Unión Europea. (Directiva 2004/19/CE).

La directiva 2004/19/CE de la comisión del 1 de Marzo del 2004, publica en el Diario Oficial de la Unión Europea lo siguiente:

La Comisión establece las normas que deben respetar los materiales plásticos que se destinan a entrar en contacto con productos alimenticios. En el inciso 9 menciona: determinadas sustancias utilizadas para fabricar materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos, dichas sustancia no deben pasar de los materiales a los alimentos en cantidades superiores a los establecidos en la legislación alimentaria vigente o en la presente Directiva, según la que establezca la menor restricción. Aun no se incluyen los aditivos siguientes: revestimientos de superficies obtenidos a partir de productos resinosos o polimerizados en forma líquida, de polvo o de dispersión, tales como: barnices, laca, pinturas, resinas epóxicas, adhesivos, colorantes y disolventes. Para los monómeros de epoxiresinas estima un cantidad máxima permitida de 0,6 mg/kg, concretamente para el 2,2-bis(4-hidroxifenil)propano.

La MERCOSUR/GMC/RES N° 87/93, dentro de la “Lista positiva de polímeros y resinas para envases y equipamientos plásticos en contacto con alimentos” en su artículo primero menciona: para la fabricación de envases y equipamientos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos que se comercialicen entre los estados partes del MERCOSUR, sólo podrán ser usados los polímeros y resinas detallados en el Reglamento Técnico, parte A el cual contiene la lista de todas las resinas y polímeros para la fabricación de envases y equipamientos plásticos descritos en la resolución N° 56/92 párrafo 2, con las restricciones de uso y límites de composición y migración específica indicados. Para el BFA el límite de migración permitido establecido es de 3 mg/kg.

La Secretaría de Economía, a través del Diario Oficial de la Federación fechado el 15 de Marzo del 2004, ha decretado las Normas Oficiales en cuanto al envase y embalaje

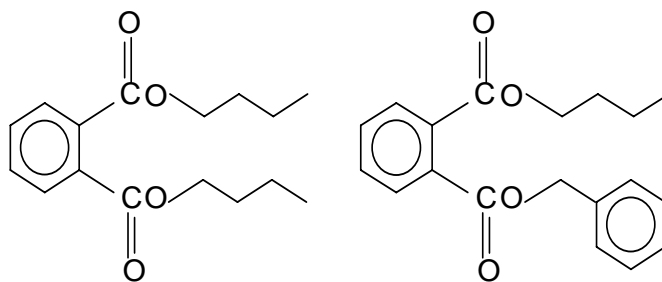
de envases de hojalata, cilíndricos sanitarios para contener alimentos (NMX-EE-010-NORMEX-2004) que dice: el campo de aplicación de esta Norma Mexicana establece con el fin de comprobar la hermeticidad, así también la Norma (NMX-EE-197-NORMEX-2004) establecida para envases de vidrio y plástico contenedores de alimentos, y la Norma (NMX-EE-147\_NORMEX-2004) que determina las condiciones para la capa de barniz y el método de prueba. Sin embargo por ahora solo existe una petición hecha por el Senado Mexicano, la cual fue publicada en el Boletín de Prensa 2005/0347, en el que se expone la condición de los alimentos expuestos a “Calentamiento de plásticos y unicel en hornos de microondas”, el cual fue turnado a la Comisión de Salud y Seguridad Social.

Poco se conoce sobre el efecto para la salud de estos compuestos, aunque cierta preocupación existe desde que se demostró que bisfenol A, tiene actividad hormonal de carácter estrogénico.

## **1.2.- ESTERES DEL ACIDO FTALICO. ( FTALATOS )**

### **1.2.1.- Descripción y fórmula química.-**

Los llamados ftalatos, son esteres del ácido ftálico con varios alcoholes. Los ftalatos, son sintetizados usando anhídrido ftálico y dos moléculas de alcohol correspondiente. El anhídrido ftálico en general, se prepara a través de una oxidación catalítica del naftaleno u orto-xileno a 400-500 °C, usando un catalizador, pentóxido de vanadio. (Salud y Seguridad Ocupacional, 2002). El principal usuario de estos compuestos es la industria plástica, la cual consume alrededor del 87% para producir PVC blando. El 13% restante se usa en la producción de barnices, celulosa, caucho, lubricantes, poliamidas, repelentes de insectos, fijadores para perfumes, agentes congelantes para explosivos y fluidos de arranque para bombas de vacío. (R. A. R., U. E., 2004).



Dibutil ftalato

Butilbencil ftalato

### 1.2.2.- Usos.

Los plastificantes son sustancias que se agregan durante la fabricación del compuesto de PVC, para impartirle blandura y flexibilidad. Debido a su rendimiento y bajo costo, los plastificantes crean productos para el consumidor y la industria que son versátiles, durables y accesibles. Sin embargo, no todos los plastificantes son ftalatos, solo alrededor del 93% son ftalatos, quedando aproximadamente un 7% correspondiente a ésteres o poliésteres basados en adipatos, ácido fosfórico, etc. (R. A. R., U. E., 2004).

Los ftalatos, son sustancias químicas usadas principalmente como plastificantes, especialmente para otorgar flexibilidad a los plásticos. Aplicaciones típicas son el envasado de alimentos, dispositivos médicos, juguetes, artículos de puericultura, cables, películas, laminados, tubos y perfiles, productos revestidos de nitrocelulosa, agentes espumados, tintas, barnices, aditivos para caucho, látex, cementos y selladores, aditivos de aceites lubricantes, el transportador para el catalizador de la fórmula de peróxido en plásticos reforzados con fibra de vidrio, cosméticos, etc. (CMA , 2002)

Los ftalatos principalmente usados como plastificantes son: DEHP (Di-etil-hexil-ftalato), DINP ( Di-iso-nonil-ftalato), DBP (Di-butyl-ftalato), DIDP ( Di-iso-decil-ftalato), BBP ( Butil-bencil-ftalato), DOP (di-octil-ftalato); de estos los mas usados para el envasado de alimentos son: DEHP; DBP y DINP, aunque también se utilizan los adipatos, Los esterres de ftalatos, son plastificantes líquidos- similares en apariencia a los aceites vegetales, que pueden ser agregados a los plásticos duros, como el policloruro de vinilo o PVC. Los esterres de los ftalatos líquidos, actúan como ablandadores haciendo que el plástico se vuelva flexible. Cuando se agregan estos plastificantes se puede crear una amplia gama de productos de PVC flexible, tales como: bolsas de sangre, juguetes, pisos, envainado de cables y alambres y cortinas de baño. Las condiciones de procesamiento que involucran calor y a veces presión, hacen que los polímeros y los líquidos se unan. En el nuevo estado, el líquido actúa como un lubricante interno y este permite que las cadenas de polímeros se unan hacia las otras,

brindando flexibilidad. Entonces, este material puede ser moldeado o formado en una variedad de productos útiles, (CMA, 2002).

Las principales aplicaciones de los ésteres de ftalatos son:

En dispositivos médicos.- Se usan desde hace más de 40 años, el PVC flexible es uno de los materiales de mayor aceptación, para dispositivos médicos debido a su rendimiento y seguridad. Los ésteres de ftalatos, son agregados al PVC rígido durante la fabricación del compuesto para darle forma, como las cánulas intravenosas y bolsas de sangre, los principales ftalatos usados son el DEPH y el DOP. Alrededor del 95% de las aplicaciones médicas de PVC plastificado son contenedores, tubos flexibles y guantes médicos. La mayoría de los envases, están diseñados para llevar soluciones estériles, tales como fluidos nutricionales o sales. Otros se usan como envases estériles vacíos para recolectar sangre u orina. Los contenedores de soluciones, por lo general, llevan fluidos endovenosos y nutricionales, soluciones para irrigar los órganos, drogas para diálisis continua ambulatoria peritoneal o anticoagulantes. Los contenedores de sangre, se usan durante la recolección, la preparación del plasma y almacenamiento de componentes, otros se usan para congelar y almacenar plasma humano o actúan como unidades de drenaje o dispositivos para la recolección de orina. Los tubos de PVC, se usan para conectar bolsas o contenedores con otros dispositivos médicos: tubos endovenosos, equipos de infusión, catéteres, tubos endotraqueales y tubos de circuito de sangre. Los guantes de PVC flexible, son usados por profesionales e investigadores médicos durante los exámenes y procedimientos quirúrgicos. Los ésteres de ftalatos dan la fuerza y durabilidad para resistir a los desgarros.

En Juguetes.- Los juguetes de PVC utilizan plastificantes, que son excelentes ablandadores y al mismo tiempo maximizan la vida y durabilidad del juguete. El DINP, es el más usado, su estudio de toxicidad, incluye resultados de estudios de cáncer y problemas en el desarrollo, así como, investigaciones recientes sobre modulación endocrina. Aunque, aun faltan datos para la validación científica, en Japón, Canadá, U.U.E.E. y la Unión Europea, el uso de estos juguetes es regulado por agencias de seguridad. (Babich y col. 2004).

En Artículos de Puericultura.- Los chupetes de plástico blando, por lo general contienen DINP como plastificante. Grupos ambientalistas han expresado su preocupación por el contacto de niños pequeños con los chupetes conteniendo ftalatos, se estima que a través del contacto oral, los niños pueden estar extrayendo los ftalatos y que una vez en



el organismo pueden producir efectos tóxicos sobre el desarrollo. (Bustamante y col., 2004).

En empaques de alimentos.- Los envasados plásticos para alimentos, son usados por cientos de millones de personas cada día, para proteger a los alimentos de la descomposición y la contaminación, sin embargo, se han realizado recientemente numerosas investigaciones acerca de su composición, tanto en los envases plásticos como en los recubrimientos epóxicos de latas contenedoras de alimentos, el ftalato de mayor uso en estos envases es el DEHP, además de otros derivados del ácido ftálico los cuales se encuentran en contacto con los alimentos. (Tamura y col., 2002; Saito y col., 2002; Freire y col., 2006).

### 1.2.3.- Exposición alimentaria.-

Resulta importante resaltar los estudios realizados acerca de la migración de los ftalatos hacia los alimentos, esto se comprueba en las siguientes investigaciones al respecto.

En estudios experimentales, fueron analizadas cincuenta muestras de alimentos procesados con empaque de película plástica, como son: jamones y salchichas, empanadas fritas, productos de pasta de pescado, croquetas de pescado frito, mantequilla, tallarines y encurtidos, etc. Niveles altos de DBP ( dibutil-ftalato), BBP (butil-benzil-ftalato), DEHP (di-etil hexil-ftalato), DINP (di-isononyl-ftalato), DEHA (di-etil-hexil-adipato), y DINA (di-isonil-adipato), fueron encontrados en concentraciones de 16,6 a 749,0 ppb. (Saito y col. 2002). Por otro lado, fueron analizados diez y seis tipos de envases de alimento para bebe, obtenidos en el mercado japonés en el año 2001, incluyendo ocho tipos de botellas de vidrio, uno de envases plásticos y uno de envases laminados y seis de envases laminados con recubierta de película plástica, encontrándose DBP en siete de las muestras en niveles medios de 1,2-9,1 µg/muestra, y el DEHP se encontró en quince de las muestras en niveles medios de 1,3-18 µg/muestra. ( Ozaki y col., 2002).

También, se han realizado investigaciones acerca de la migración de ftalatos por contacto en juguetes plásticos, envases plásticos para alimentos y en cubiertos de plástico, tres modelos de soluciones han sido utilizadas: agua destilada, alcohol etílico al 10% y ácido acético al 3%, durante un tiempo de exposición de 10 días, comprobándose así, que los niveles de ftalatos más altos se presentan en medio acuoso (54,5 mg/kg), los niveles encontrados en las muestras de juguetes plásticos son de 66,2

mg/kg, seguidos de los alimentos envasados en plástico 37,6 mg/mL y por último, los estimados para los cubiertos de plástico 27,4 mg/kg. (Bosnić y col., 2003).

En estudios más recientes, se analizaron muestras de botellas de plástico conteniendo agua mineral y se sometieron a diversas condiciones de almacenamiento como son: diferentes temperaturas, tipo de iluminación, marcas variadas e intervalos de tiempo y se encontraron niveles de 0,517 µg/mL DBP. Además, se observó que después de cinco meses de almacenamiento se incrementó el porcentaje de DBP en un 20%. (Criado y col. 2005). Se han realizado investigaciones acerca de la migración de monómeros de ftalatos en treinta y seis muestras de leche humana, leche comercial y fórmulas infantiles, los ftalatos analizados fueron: mMP (monometil ftalato), mEP (monoetil-ftalato), mBP (mono-butyl-ftalato), mBzP (mono-benzil-ftalato), mEHP (mono-2-etil-hexil-ftalato), mNP (mono-isononyl-ftalato). (Mortensen y col., 2005). Por otro lado, en muestras de envases de materiales plásticos en contacto con alimentos, fueron analizados en Brasil, los siguientes ftalatos: DEHA, DEHP Y DIDP los cuales se encontraron en niveles medios de concentración de 12 a 19% (w/w), de 15 a 44% (w/w) y de 10 a 11% (w/w) respectivamente, considerándose así, muy por encima de los niveles permitidos por la regulación de ese país, que contempla un máximo de 3% de contenido de ftalatos para empaques de alimentos. (Freire y col. 2006).

#### 1.2.4.- Exposición ocupacional.

La contaminación por exposición en el ambiente laboral, es posiblemente debida a la producción de DBP, por productos que contienen DBP y por el uso de estos productos. Los niveles de exposición ocupacional se estiman usando información proporcionada por la EASE (Asociación Europea de Editores de la Ciencia) con propuestas interesantes. Como la producción de DBP se da en sistemas cerrados, la exposición es principalmente debida a las actividades de mantenimiento en la industria o por inhalación, los niveles de exposición en este caso, son de 2 mg/m<sup>3</sup> y 5 mg/m<sup>3</sup>. Cuando existe exposición durante tiempos cortos de inhalación a temperaturas elevadas, los niveles pueden aumentar hasta por encima de los 10 mg/m<sup>3</sup>. Los riesgos por exposición dérmica son principalmente debidos a la acción de adicionar sustancias y mezclas en la formulación de los procesos de producción de DBP, los cuales, son realizados a temperaturas entre 150°C y 210°C. El nivel mas alto de exposición dérmica que se ha presentado, debido a la adición manual de DBP fué de 420 mg/dia. (R. A. R. U. E., 2004).

Finalmente, la exposición ocupacional por el uso de productos que contienen DBP, ocurren en las industrias donde se fabrican polímeros, pinturas e impresos, estos procesos pueden ser divididos en dos técnicas importantes, la que se realiza debido a la fabricación de aerosoles y su aplicación y la técnica en la que no se producen aerosoles. Por lo tanto, en la exposición por inhalación de DBP, en las técnicas que no usan aerosoles o sea, por la aplicación del producto con brocha, los niveles son limitados. Solo se han llegado a alcanzar niveles estimados de DBP de hasta  $20\text{mg}/\text{m}^3$ .

Sin embargo, en la técnica por aplicación con aerosoles, los riesgos de exposición dérmica durante exposiciones prolongadas de aplicación de aerosoles conteniendo DBP, se estima por encima de  $975\text{ mg}/\text{dia}$ . Otras actividades con productos conteniendo DBP son estudiados y dirigidos a contemplar bajos niveles de exposición dérmica. ( R. A. R., U. E., 2004).

#### 1.2.5.- Exposición al medio ambiente.-

Actualmente, existen amplios márgenes de seguridad en cuanto a la toxicidad producida por la exposición medioambiental a los ftalatos, incluso para poblaciones muy expuestas o muy susceptibles, aunque su efecto en humanos, todavía se desconoce en buena medida. Por esta razón, se han realizado diversos estudios encaminados a demostrar que los ésteres de ftalatos se biodegradan y metabolizan rápidamente. Estas propiedades disminuyen la posibilidad de que estos compuestos persistan en el medio ambiente, o contribuyan a exposiciones humanas de largo plazo. De todas formas, existen investigaciones en marcha para evaluar a los ésteres de ftalatos desde diferentes puntos de vista de tipo medioambiental. ( R. A. R., U. E., 2004).

El DBP, puede encontrarse principalmente en el medio ambiente: en afluentes de aguas de lavado, en el aire y en los sitios en donde se produce. En estudios efectuados por la EUSES (Sistemas de Evaluación de Sustancias de la Unión Europea) y realizados en las orillas de los ríos y en varios sitios propicios para la exposición, el DBP aparece en niveles de  $0,02$  a  $2,4\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Además, el cálculo total estimado por vía aérea en agua para beber y en alimentos para todos los sitios de emisión, encuentra niveles medios de exposición de  $7,86 \times 10^{-4}$  a  $0,0925\ \text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ . El DBP, ha sido identificado en leche humana en concentraciones medias de  $10$  a  $51\ \mu\text{g}/\text{kg}$ . en base a un consumo promedio diario de leche materna de  $120\ \text{gr.}/\text{kg}$  en infantes, los límites de exposición establecidos por este medio varía entre niveles de  $1,2$  y hasta  $6\ \mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  ( R. A. R., U. E., 2004).

En estudios realizados recientemente, se concluye que los riesgos humanos por exposición a ftalatos por productos hechos a base de policarbonatos y otros materiales plásticos son preocupantes, ya que, en un estudio efectuado en materiales a base de policarbonatos, utilizado como recubrimiento de pisos se midieron contenidos de DBP y DEHP, encontrándose niveles medios de  $22 \mu\text{g}/\text{m}^3$  y  $1\mu\text{g}/\text{m}^3$  respectivamente. Estos muestreos fueron realizados en un período de tiempo de 150 días aproximadamente. (Ashari y col., 2004).

#### 1.2.6.- Presencia en muestras biológicas.-

Absorbidos por la piel humana, aunque no se conoce bien el metabolismo de estos compuestos, se encuentran presentes en cantidades de miligramos por día (Sharman y col, 1994), los compuestos comúnmente identificados son dibutilftalato (DBP), dimetilftalato, dietilftalato (DEP), di-*n*-octilftalato (DOP), bencilbutilftalato (BBP), bis-(2-etilhexil)-ftalato (DEHP) y bis-(2-etilhexil)-adipato (DEHA) (Bedding y col., 1982). Se ha puesto atención en la cuestión de que los plastificantes, en este caso, los ésteres de ftalatos usados en dispositivos médicos, presenten un peligro para la salud humana. Las investigaciones realizadas durante épocas recientes, muestran que es probable que el DEHP como principal ftalato presente en los policarbonatos, suponga un riesgo de cáncer para humanos. Además, diversos grupos de investigadores han acusado científicamente, que los ésteres de ftalatos pueden producir efectos adversos sobre la salud humana, cuando se entra en contacto con ellos. Los resultados de los estudios han demostrado que poseen cierta toxicidad aguda, producen irritabilidad en la piel, presentan efectos severos sobre el sistema reproductivo y el desarrollo humano y pueden ser causa de cáncer de mama y de próstata, también, han sido analizados por su habilidad de imitación de estrógeno en el cuerpo y los resultados han sido concluyentes demostrándose que los ésteres de ftalatos tienen efectos estrogénicos sobre el sistema endocrino a niveles realistas de exposición. (Huber y col., 1996).

Algunos de los primeros estudios realizados sobre los esteres de ftalatos, demostraron que la exposición repetida a dosis extremadamente altas de ftalatos, resultaba en efectos adversos para la salud en animales de laboratorio. La investigación entonces, se orientó sobre si esos efectos, ocurrían también en humanos o incluso en otras especies. Los niveles de exposición de los humanos al DEHP son 14 veces inferiores a los niveles que producen alteraciones en ratas. (Convención de Oslo y París para la Prevención de la Polución Marina, 1997).

En general, los ésteres de ftalato, presentan una toxicidad aguda baja y la DL50 en ratones en donde los niveles medios son de 1,5 a 14,2 g/Kg. Se sabe que el DEHP incrementa la producción de tumores hepáticos en roedores (Reddy y col, 1986). Se conoce el efecto antiandrogénico del DEHP, así como, la acción tóxica con efectos reproductivos de muchos ésteres del ácido ftálico (Gray y col, 1986; Siddiqui y col, 1992). Los estudios realizados, indican que los ésteres de ftalatos afectan también a los procesos de desarrollo y reproducción al aumentar las causas de criptorquidia e hipospadia en animales de laboratorio (Imajima y col., 1997). También, se ha comprobado cómo la exposición temprana produce inactividad sexual en los machos, lo cual sugiere efectos en el sistema nervioso central (Moore y col, 2001).

Posteriormente, en estudios de toxicidad realizados con DEHP (di-etil-hexil-ftalato), se comprueba que 4 µg/mL, son suficientes para destruir el 98% de células en cultivo. Esta concentración, puede obtenerse cuando se almacena sangre para transfusión en bolsas de polivinilo por un período de uno a dos días (Pérez y col., 2001). Además, se determinó que la actividad estrogénica, del DNBP (di-n-butil-ftalato) bloquea la acción androgénica (Mylchreest y col., 1998).

En estudios efectuados recientemente, se ha demostrado que en los recubrimientos de cápsulas medicinales hechos a base de resinas plásticas, existen trazas de ftalatos y sus metabolitos. Así, se analizaron muestras de orina humana, en individuos que consumen azacol, un medicamento cuyo ingrediente activo es la mesalamina, el cual se suministra en el tratamiento para la colitis ulcerosa. Las muestras fueron recolectadas durante un período de tres meses después de la medicación, obteniéndose concentraciones de mBP (monobutil ftalato) un metabolito de DBP de 16,868 ng/mL, valores muy por encima de los tolerados por el organismo humano según el NHANES (National Health and Nutrition Examination Survey). Además, se encontraron 443,7 ng/mL de mEP (mono-etil-ftalato), 3 ng/mL de mDEHP (mono- 2-etilhexil-ftalato) y 9,3 ng/mL de mBzP (mono-benzil-ftalato).(Hauser y col., 2004). Por otro lado, en una investigación hecha en la ciudad de Toluca (México) se analizaron muestras de productos manufacturados con cloruro de polivinilo y ftalatos de uso oral en niños de 18 meses de edad y los resultados de exposición indican niveles de 13,94 µg/kg/día, (Bustamante y col., 2004). Además, se han analizado muestras de orina humana, en donde se encontró la presencia de ftalatos, como son el DEP, DEHP, DBP, BBP y el metabolito MEHP, comprobándose que producen efectos teratogénicos y de disrupción endocrina en niños y mujeres, en donde se determinó que la exposición diaria llegó hasta un nivel de 12,4

$\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{peso-corporal}/\text{día}$  y  $41,7 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{cuerpo-peso}/\text{día}$  respectivamente, excediendo los niveles diarios (TDI  $37 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{cuerpo-peso}/\text{día}$ ), establecidos por el Comité Científico para Toxicidad Ecotoxicidad y el Medio Ambiente de la Unión Europea. (Koo y col., 2005).

En resumen, estas sustancias han demostrado, ser tóxicas en animales de laboratorio y en ecosistemas naturales principalmente por su acción carcinogénica y su capacidad de producir disrupción endocrina debida a su acción directa sobre el sistema reproductor. (Bustamante y col., 2004).

#### 1.2.8.- Medidas legislativas.

Datos de la EPA indican que los niveles de DEHP en el agua van de los 0,04 a 30 ppb y que la concentración aérea promedio es muy baja, menor a 0,002 ppb en áreas urbanas. Por otra parte se establece que la ruta de exposición más probable a los esteres de ftalatos es a través de los alimentos. (CSTEE U. E., 1998).

Las estimaciones del máximo diario tomado de varios artículos plásticos calculado en la ingesta basada en la dieta inglesa, establece niveles medios de DBP de  $1,9 \text{ mg}/\text{día}$ , con un cálculo promedio de  $0,23 \text{ mg}/\text{día}$  según la MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food of Japan, 1987 ). En Holanda se revisó un promedio diario de 0,5-1,5 mg/persona /día, referido a ácido ftálico y todos los esteres de ftalatos presentes (RIVM, 1991). La exposición vía leche materna varía entre 1,2 y  $6 \mu\text{gDBP}/\text{kg peso}/\text{día}$ . (R. A. R., U. E., 2003).

En juguetes infantiles, el límite de detección considera dosis de  $0,81 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ , acordado según los resultados de datos a partir de estudios en voluntarios, proporcionado por CSTEE (Comité Científico de Toxicidad, Ecotoxicidad y Medio Ambiente de la Unión Europea). (R. A. R., U. E., 2003).

La MERCOSUR/GMC/RES N° 87/93, dentro de la “Lista positiva de polímeros y resinas para envases y equipamientos plásticos en contacto con alimentos”, en su artículo primero menciona: para la fabricación de envases y equipamientos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos que se comercialicen entre los estados partes del MERCOSUR, sólo podrán ser usados los polímeros y resinas detallados en el Reglamento Técnico, parte B, el que contiene la lista de las sustancias que fueron retiradas en la lista positiva de la Directiva 93/9 de la CEE del 15/3/93. el cual incluye entre otros, al ácido ftálico. Sin embargo, por ahora solo existe una petición hecha por el Senado Mexicano, la cual fue publicada en el Boletín de Prensa 2005/0347, en el que se

expone la condición de los alimentos expuestos a “Calentamiento de plásticos y unicel en hornos de microondas”, el cual fue turnado a la Comisión de Salud y Seguridad Social.

### 1.3.- Antecedentes en el Uso de Técnicas Cromatográficas.-

Hemos descrito hasta el momento, diferentes materiales poliméricos empleados en la manufactura de envases plásticos. Además, se ha revisado la información disponible sobre la eficacia de la reacción de polimerización y la evidencia de migración de componentes no polimerizados. Como entre nuestros objetivos se encuentra el profundizar en el conocimiento de la exposición a través de materiales poliméricos de uso diario basado en los derivados del BFA y los Ftalatos, se hace necesario actualizar la información técnica disponible, sobre las metodologías cromatográficas aplicables a estos compuestos químicos.

Una breve revisión de técnicas de métodos de preparación, extracción y determinación de los monómeros, nos permitirá comprobar que generalmente los métodos de extracción se basan en el empleo de disolventes orgánicos debido a la afinidad de estas moléculas por los mismos, en tanto que, los métodos de cuantificación son cromatográficos, ya sea cromatografía de gases (CG) o bien, en los últimos años y adquiriendo cada vez mayor auge, métodos de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Estos últimos presentan, por una parte la ventaja de que en algunos tipos de moléculas como fenoles, bifenoles y derivados, se alcanza un alto grado de resolución y sensibilidad.

#### 1.3.1 Extracción de monómeros.-

Los derivados fenólicos de bajo peso molecular, son las unidades estructurales de gran cantidad de polímeros con funciones plásticas, ampliamente utilizadas por la industria en innumerables procesos. Las determinaciones analíticas de alguno de estos monómeros como son el BFA, BisDMA, BADGE, etc., así como, de los derivados del ácido ftálico, se resuelven generalmente por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Esta determinación, viene precedida de una extracción y purificación previa de las muestras en la que intervienen disolventes orgánicos. En este sentido, Henricks-Eckerman y Ljajjoki (1988), determinaron mediante HPLC, la epoxi-resina del diglicileter del BFA (BADGE), tras la extracción de los monómeros libres, con acetona en períodos de tiempo en uno a varios días y a la temperatura ambiente. El rendimiento

de extracción de estos monómeros se sitúa por término medio en el 90%, observación confirmada en una revisión muy amplia de la solubilidad de estos polímeros en disolventes orgánicos, tomando como referencia bisfenol A policarbonato (Beck y col., 1992). Así, de un total de 103 disolventes orgánicos ensayados, el que consigue el más alto grado de solubilidad es el cloroformo, frente a la poca capacidad de solubilización de los monómeros en hexano, metanol y tolueno entre otros.

Una de las experiencias más completas sobre la extracción y determinación de monómeros en resinas epoxi, es la presentada en numerosas publicaciones por el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela. en el cual, se estudió la degradación que pueden sufrir estas epoxiresinas cuyo monómero principal es el BFA. Como simulantes para la comprobación de la migración de estos monómeros, se utilizaron los recomendados por la Legislación Alimentaria Española (RD 211/1992), ácido acético al 4% (v/v) H<sub>2</sub>O destilada y etanol al 15% (v/v). Los trabajos se realizaron en períodos de tiempo controlados y temperaturas medias de 40°C. La optimización del proceso les ha llevado al estudio de otros agentes de extracción como es el empleo de mezclas de cloroformo: metanol 25:75 (v/v), manteniendo la muestra en reflujo durante 10 hrs. Con este procedimiento junto con el BADGE, logran también la extracción del m-xilenodiamina (m-XDA), (Paseiro y col. 1991)

Nuestro grupo de trabajo ha desarrollado un método de extracción de BFA, mediante el empleo de cloroformo como solvente de extracción. El mayor rendimiento se obtuvo con la adición de metanol para la precipitación de las proteínas contenidas en muestras orgánicas, aunque en ocasiones una simple filtración fue suficiente para eliminar los componentes del líquido de cobertura de los alimentos, antes de proceder a la extracción líquido-líquido (Brotons y col., 1995).

En un estudio realizado en Japón, se analizaron 11 ftalatos en guantes para uso culinario, utilizando un método en donde cada una de las muestra se homogeneizaron y posteriormente se extrajeron con acetonitrilo y n-hexano, solo el DBP no fue detectado en ninguna de las muestras. (Tsumura y col., 2001) En otro estudio se usaron mezclas de solventes para obtener por extracción el DBP y el DINP, fueron seleccionados para este estudio envases de cartón con recubierta plástica para pizzas, las muestras se sometieron a diferentes pruebas de almacenaje, los valores de migración obtenidos llegaron a presentarse hasta en un 49%. (Summerfield y col., 2001). Se efectuaron estudios para determinar la presencia de ftalatos en muestras de bebidas envasadas en



botellas de plástico, (agua, cerveza, bebidas alcohólicas, jugos, etc.) por un método de extracción con solventes utilizando una mezcla de hexano y clorometano en relación (10:1), encontrándose resultados positivos en el total de las muestras. (Yano y col., 2002).

En análisis recientes se utilizó un método basado en la extracción de solventes con acetonitrilo y extracción en fase sólida, los porcentajes de recuperación fueron, en todos los casos superiores al 90 % en las muestras marcadas. El método se desarrolló para detectar la presencia de BFA, en muestras de alimentos, el resultado mostró buenos niveles de recuperación (77-102%). (Kang y col., 2003).

Así mismo, en estudios recientes realizados para determinación de seis de los monoésteres de ftalatos en muestras de leche humana, comercial y fórmulas infantiles, se desarrolló una técnica de extracción líquida, usando una mezcla de solventes acetato de etilo y ciclohexano en relación de (95:5), en todas las muestras se encontraron estos compuestos en diferentes niveles de concentración. (Mortensen y cols., 2005).

### 1.3.2.- Determinación por cromatografía líquida.-

Esta es la técnica más ampliamente utilizada en la actualidad, consigue una separación óptima de los compuestos. La detección más extendida es la que se hace por HPLC con detector de fluorescencia, debido a la capacidad fluorescente que caracteriza al BFA. Se realiza con una longitud de onda de excitación en torno a los 275 nm, y una longitud de onda de emisión de alrededor de 300 nm. En ocasiones ha sido utilizado el detector de masas (MS) para la comprobación en la determinación de BFA. En lo que se refiere a la utilización de columnas, el más usado es el de fase reversa, generalmente del tipo C<sub>18</sub>, El empleo de estas columnas, permite la utilización de fases móviles mixtas, compuestas en parte por el solvente orgánico, que normalmente es acetonitrilo o metanol y parte por el agua.

El desarrollo de técnicas de cromatografía líquida se justifica ampliamente, debido a la estructura química de los bisfenoles para su análisis cuantitativo, porque, presentan absorbancia en la región ultravioleta del espectro y además, porque en ocasiones resultan ser fluorescentes, con lo cual se puede adaptar un detector muy sensible al cromatógrafo de líquido de alta resolución.

También, se han efectuado estudios en los que se determinó BFA, Bisfenol-F y el diglicidileter mediante cromatografía en fase reversa con detector de fluorescencia, (Paseiro y col. 1992; Simal y col.; 1992, 1993). Por otro lado, se analizó el diglicidileter

del BFA, el método utilizado fue mediante cromatografía líquida en fase reversa, con detector UV a 280nm, a partir de epoxiresinas tratadas con acetona. (Henviks y col., 1988), en estudios experimentales sobre la misma línea, se desarrolló un método analítico por HPLC, para la detección de ftalatos: DBP, BBP Y DEHP, para comprobar la migración de estos compuestos hacia los alimentos envasados en aluminio con recubierta de película plástica, encontrándose resultados positivos en el total de las muestras analizadas. (Page y col., 1992).

Nuestro grupo de trabajo ha desarrollado un método de separación y cuantificación de BFA, que utiliza una columna de sílice y un detector ultravioleta; como eluyentes se emplearon dos fases: una de hexano y otra de hexano-metanol/isopropanol. Los resultados son adecuados y en estas condiciones de trabajo, el tiempo de retención del BFA es de 19,2 min. La técnica es fácil de realizar reproducible y puede ser aplicada en cualquier protocolo experimental en el que sea necesaria la determinación del BFA. (Brotons y col., 1995).

Por otro lado, se efectuaron estudios para determinar la presencia de ftalatos en muestras de bebidas envasadas en botellas de plástico, (agua, cerveza, bebidas alcohólicas, jugos, etc.) por el método de extracción con solventes utilizando una mezcla de hexano y clorometano en relación (10:1), las medidas se efectuaron por HPLC con detector de UV/V. (Yano y col., 2002). En otra investigación se analizó BFA en muestras de leche, y productos lácteos como son: yogurt, nata, mantequilla, pudines y leche condensada, basado en extracción de solventes con acetonitrilo, seguido de detección por HPLC con fluorescencia, este método mostró buenos resultados de rendimiento de (77-102). (Kang. y col., 2003). En estudios similares, se utilizó el método de medición por HPLC con detector de U/V, para la determinación de algunos ftalatos en muestras de orina humana, estos compuestos fueron encontrados en el 100% de las muestras (Hauser y col., 2004). Mas recientemente, utilizando un método de medición por HPLC con detector de fluorescencia, se determinó BFA en muestras de alimentos enlatados, los límites de detección se fijaron en valores de 0,1 ng/mL para bebidas y 4,3 ng/mL para vegetales en conserva. (Braunrath y col., 2005 ).

También, se desarrollo un método analítico para la determinación de BFA en aguas marinas, usando HPLC y espectrometría de masas, los análisis mostraron la presencia de estos compuestos en el 90% de las muestras. (Beck y col., 2005). En una reciente investigación, se comprobó la presencia de los siguientes ftalatos: DEHP; DBP; DEP BBP Y MEHP, por HPLC con detector de UV/V en muestras de orina en humanos,

encontrándose niveles elevados de DEHP en mujeres 41,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , los cuales exceden los límites establecidos por la Unión Europea. (Koo y col., 2005). Así mismo, se ha comprobado la sensibilidad del detector HPLC con UV/V, en el trabajo realizado para medir algunos monoésteres de ftalatos en muestras de leche humana, leche comercial y en fórmulas infantiles. la presencia de estos compuestos se detectó en el total de las muestras. (Mortensen y col., 2005).

De este modo, hemos visto que el método de detección de bisfenoles y ftalatos por HPLC, con detectores de UV/V y fluorescencia (en caso de ser fluorescentes) parecen ser los más prácticos, de mejor respuesta y sensitivos en la actualidad.

#### 1.4. ¿Por que se plantea este estudio?

Experimentalmente hace unos años se demostró el efecto hormonal de los alquilfenoles, unas sustancias utilizadas masivamente como componentes de plásticos y detergentes, y del bisfenol-A, componente básico de un plástico, el policarbonato. Se empezaron a descubrir nuevas sustancias con actividad hormonal, como los ftalatos y parabenes y la lista de sustancias que se conoce o sospecha que pueden tener actividad hormonal superan hoy las 550, añadiéndose cada día nuevas.

Estas 550 sustancias constituyen la lista de sustancias objeto de evaluación de la estrategia comunitaria sobre disruptores endocrinos COM(2001)262 final. De ellas, la Comisión Europea considera que está suficientemente probada la capacidad de disrupción endocrina de 118 y se necesita más información de 435, que son objeto de estudio en la actualidad

La tabla.1.4.1.-. Recoge los grupos químicos que incluyen sustancias objeto de evaluación de la estrategia europea

<b>Plaguicidas</b>	<b>Sustancias químicas industriales</b>
Benzamidazoles	Alquilbencenos y estirenos
Carbamatos	Clorofenoles y bencenos
Ciclodienos clorados	Alquilfenoles y derivados
Compuestos clorofenoxi	Parafinas cloradas
DDT, derivados y metabolitos	<b>Ftalatos</b>
Dicarboximidias	Fenilsiloxanos
Dinitroanilidas	Fenilhidroxifenilmetanos
Ditiocarbamatos	<b>Bisfenoles</b>
Hexaclorociclohexano e isómeros	Trifenilmetano – derivados
Hidroxibenzonitrilos	Difenilpropano-derivados
Linuron, diuron y derivados – metabolitos	Bifenilos
Motoxiclor y derivados	Bifenilos policlorados PCBs
Organofosforados	Bifenilos bromados y polibromados Pbs.
Piretrinas	Bifeniléteres bromados y polibromados PBDEs
Piretroides	Terfenilos policlorados PCT
Pirimidinas y piridinas	Naftalenos y derivados
Triazinas y triazoles	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH)
Subproductos de procesos industriales	<u>Metales</u>
Dioxinas	Otras sustancias
Furanos	

La identificación del efecto hormonal es bastante complejo debido a que no existe un criterio único para establecer el efecto y que las estructuras químicas y usos de las sustancias con estos efectos son muy variadas Cabe suponer que la lista de sustancias se irá ampliando cuando se disponga a los tests adecuados para analizar las 100.000 sustancias químicas sintéticas comercializadas en la actualidad en Europa.

Los disruptores endocrinos (DE) son sustancias químicas capaces de alterar el sistema hormonal y ocasionar diferentes efectos sobre la salud. La exposición a DE se presenta en los lugares de trabajo, en los hogares por la contaminación de alimentos con

plaguicidas, la exposición a productos plásticos y a plastificantes, el uso de algunos detergentes y por la contaminación del medio ambiente.

Estos efectos aparecen a dosis muy bajas, en general muy por debajo de los límites de exposición legalmente establecidos. Ejemplos de disruptores que pueden estar presentes en cualquier ámbito de vida son: Plaguicidas y herbicidas, alquilfenoles, Bisfenol-A, dioxinas, disolventes, estireno, ftalatos, PBBs, PCBs, Tributilestano (TBT), etc

Desde mediados del siglo pasado, biólogos y naturalistas han ido documentando extraños y desconcertantes problemas que sufrían los animales en distintas partes del mundo, que parecían no tener ninguna conexión. Estos problemas incluían la pérdida de la capacidad reproductora, mortandades masivas, deformaciones en órganos reproductores, comportamientos sexuales anormales y disminución del sistema inmunológico de especies afectadas por sustancias químicas muy variadas.

Desde los años 30, se conocía la actividad estrogénica de algunos compuestos sintéticos, como el DDT, y a lo largo del siglo XX se estudió en profundidad una familia diversa de compuestos con una característica estructural común, contener en su estructura molecular uno o más átomos de cloro. Esta familia de compuestos clorados (PCBs, DDT, lindano, dioxinas, etc.) estaba ya en el punto de mira de toxicólogos y ambientalistas por su toxicidad y ecotoxicidad, capacidad de bioacumularse y persistencia. No es de extrañar, por ello, que formaran parte de la primera lista de sustancias a eliminar globalmente bajo el reciente Convenio de Estocolmo sobre Compuestos Orgánicos Persistentes

De las sustancias identificadas hasta el momento, sólo existen regulaciones en Europa por ocasionar además otros efectos sobre la salud o el medio ambiente. Por lo tanto, sustancias que se consideraban seguras hasta la fecha pueden no serlo. Además, debemos tener en cuenta que, según la Agencia Europea de Medio Ambiente, no se tienen datos de toxicidad del 75% de las 100.000 sustancias que se comercializan y los datos de toxicidad se refieren en su amplia mayoría a efectos tóxicos estudiados tradicionalmente, no a disrupción endocrina.

Es imposible, en la práctica, determinar con fiabilidad la extensión de los efectos sobre la salud ocasionados por los disruptores endocrinos dada la gran cantidad de sustancias implicadas y la complejidad, número e importancia de las funciones reguladas por el sistema endocrino.

Los disruptores endocrinos tienen la particularidad de que ocasionan efectos a niveles extremadamente bajos, en el límite de la capacidad de análisis. Las hormonas y los

disruptores endocrinos pueden ocasionar efecto a dosis de ppb (partes por billón). La medición de estos niveles exige equipos de análisis muy sensibles y debido a exposiciones inadvertidas las concentraciones corporales de algunos de estos tóxicos supera en poblaciones industrializadas las ppm. La evaluación de riesgo se basa en la asunción de que a mayor dosis de exposición mayor riesgo, suponiendo una respuesta tóxica en forma de curva monotonica (sin puntos de inflexión) y que existe un límite por debajo del cual no existe riesgo, pero los disruptores endocrinos presentan las siguientes particularidades: 1) Un mismo DE puede provocar efectos diferentes sobre la salud. Un compuesto que imite a los estrógenos puede provocar efectos sobre órganos reproductores, el feto en desarrollo o cualquier órgano hormono- dependiente. 2) Muchas sustancias DE diferentes pueden causar el mismo efecto. 3) Los periodos entre la exposición y la aparición de efectos son muy largos, incluso de décadas en el caso de exposición fetal. Los DE no presentan por tanto una relación unívoca dosis-respuesta, por el contrario pueden presentar varias respuestas a una misma causa o una causa puede provocar varias respuestas y además estas pueden ocurrir tras periodos de latencia de varios años

Las evaluaciones de riesgo no tienen en cuenta los efectos aditivos y sinérgicos de las mezclas, ni la presencia previa de contaminantes en el organismo que pueden potenciar el efecto de la exposición a una nueva sustancia. Las evaluaciones de riesgo contemplan los riesgos de la exposición a una sola sustancia, sin embargo las sustancias químicas pueden interactuar entre sí, ya sea inhibiendo efectos, sumando efectos o potenciando efectos. Experimentalmente se ha demostrado cómo el potencial estrogénico del estradiol, DDT y bisfenol A se sumaba cuando se mezclaban. (Olea y col., 2001).

Debido a sus mecanismos de acción el momento de exposición a los DE es crucial. La acción hormonal depende de la presencia de la cantidad adecuada de hormonas en el momento justo, variando los efectos según la edad y el sexo. La capacidad de los contaminantes de ser transportados por el aire, el agua o los alimentos y de depositarse en zonas frías localizadas a miles de kilómetros de sus lugares de origen ha convertido el problema de contaminación en problema de exposición global.

Dadas las incertidumbres y variabilidades que rodean a las fases anteriores de la evaluación de riesgo de disruptores endocrinos, no parece posible obtener, con la fiabilidad deseable, una magnitud del riesgo que cabe esperar de la exposición a estas sustancias.

Para proteger la salud pública y el medio ambiente es necesario eliminar estas sustancias, ya sea sustituyéndoles por otras menos tóxicas, cambiando los procesos que las utilizan o incluso replanteándonos la necesidad de algunos de los productos que se fabrican con ellas.

Se debe aplicar el principio de precaución de forma que las incertidumbres que rodean los riesgos ocasionados por estas sustancias nos animen a buscar activamente alternativas más seguras

Una política adecuada para reducir la amenaza de las sustancias químicas que alteran el sistema hormonal requiere la prohibición inmediata de plaguicidas como el endosulfán y el metoxicloro, fungicidas como la vinclozolina, herbicidas como la atrazina, los alquilfenoles, los ftalatos y el bisfenol-A. Para evitar la generación de dioxinas se requiere la eliminación progresiva del PVC, el percloroetileno, todos los plaguicidas clorados, el blanqueo de la pasta de papel con cloro y la incineración de residuos

Entre las sustancias químicas de efectos disruptores sobre el sistema endocrino figuran numerosas moléculas organocloradas con o sin actividad plaguicida y además los ftalatos, utilizados en la fabricación de PVC. El 95 por ciento del DEHP (di(2etilhexil)ftalato) se emplea en la fabricación del PVC. Los alquilfenoles, antioxidantes presentes en el poliestireno modificado y en el PVC, y como productos de la degradación de los detergentes. El p-nonilfenol pertenece a la familia de sustancias químicas sintéticas llamadas alquilfenoles. Los fabricantes añaden nonilfenoles al poliestireno y al cloruro de polivinilo (PVC), como antioxidante para que estos plásticos sean más estables y menos frágiles. La industria de procesamiento y envasado de alimentos utiliza PVC que contenían alquilfenoles. La descomposición de sustancias químicas presentes en detergentes industriales, plaguicidas y productos para el cuidado personal pueden dar origen asimismo a nonilfenol. Sin olvidar el bisfenol-A, de amplio uso en la industria agroalimentaria (recubrimiento interior de los envases metálicos de estaño) y por parte de los dentistas (empastes dentarios), como ya se ha comentado anteriormente ( Center for Bioenvironmental Research).

La problemática sobre la exposición a productos químicos ha llevado al Parlamento Europeo un paquete legislativo REACH sobre el registro, evaluación y autorización de estos productos, un paquete de medidas que viene discutiéndose y debatiéndose desde hace varios años y que persigue una mayor protección de la salud y del medio ambiente. REACH (Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals).

Esta iniciativa se sitúa en medio de dos frentes. Por un lado, el de la industria, que estará obligada a demostrar que las sustancias que comercializa son seguras y que promueve la sustitución de las más peligrosas. Por otro lado, el de los grupos ecologistas, que piden que unas 30.000 sustancias se sometan a estrictos controles para que puedan continuar en el mercado.

A pesar de que el Consejo Europeo de la Industria Química (CEFIC) no considera que la situación actual con las sustancias químicas en el organismo sea alarmante, ya que se encuentran en cantidades pequeñas, algunos expertos aseguran que es necesario estudiar el efecto nocivo de la exposición no sólo a un agente químico sino a la exposición a cientos o miles de sustancias químicas y la exposición durante décadas. De ser aprobado, REACH podría acabar sustituyendo unas 40 leyes existentes en la UE, y se convertiría en legislación armonizada y común para todos los estados miembros europeos. La necesidad de armonizar estas leyes responde a varios motivos, como la cada vez más demostrada dispersión de algunos de los contaminantes, como el caso de los osos polares, en los que se ha detectado la presencia de restos de DDT en su tejido adiposo.

Pese al avance de las técnicas de análisis químicos, actualmente no existe ningún consenso científico internacional sobre cuál es el enfoque más idóneo para evaluar los riesgos de las sustancias genotóxicas y cancerígenas en la salud humana a través de la exposición a los productos alimenticios.

En la mayoría de los países se utiliza el método ALARA (as low as reasonable achievable, tan bajo como sea posible), que consiste en reducir la exposición a este tipo de sustancias hasta niveles mínimos. La mayoría de los expertos advierte, sin embargo, que este enfoque no permite hacer una distinción entre los distintos niveles de riesgos.

Por este motivo, el Comité Científico de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, en sus siglas inglesas) acaba de presentar una propuesta para armonizar la metodología de la evaluación de los riesgos, resultado de un examen exhaustivo profundo de las metodologías utilizadas actualmente. Los expertos recomiendan ahora aplicar el método denominado «margen de exposición» (ME), con capacidad para distinguir los distintos niveles de riesgo.

El Comité recomienda que el enfoque ME se utilice para evaluar los riesgos posibles asociados a las sustancias genotóxicas y cancerígenas presentes en la alimentación tanto humana como animal, independientemente de su origen. Puede aplicarse por tanto a las



sustancias presentes en los alimentos, como los contaminantes medioambientales, o a las resultantes de preparaciones alimentarias o métodos de fabricación.

Una primera propuesta fue discutida y publicada por el Parlamento Europeo en Noviembre del 2005. En una segunda lectura se tomó la decisión final para la creación e implementación la Nueva Política Química en un futuro próximo, posiblemente en el 2007

Si bien en esta memoria no se presentan nuevos datos sobre la estrogénicidad de bisfenoles y Ftalatos. El grupo de trabajo en que se integra, ha demostrado en anteriores investigaciones el efecto estrogénico del Bisfenol A y sus derivados así como de varios ftalatos (Olea y col., 1995; Olea. y col., 1996). En este trabajo se pretenden identificar vías de exposición a Bisfenol y ftalatos no solo en productos españoles sino en otros países caso de México. Mientras que en Europa se están tomando medidas bastantes estrictas para controlar el límite máximo permitido de BFA y Ftalatos, todavía en países integrados en MERCOSUR aun no se ha procedido a estimar el riesgo que supone la exposición a sustancias con efecto hormonal. Es de desear que este trabajo sea una llamada de atención y el inicio del control de esta exposición como lo fue en los años noventa los primeros trabajos publicados por nosotros sobre las concentraciones de Bisfenol A en conservas de alimentos y posteriormente como compoenetes de selladores y composites dentales

# **OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

La hipótesis de trabajo deducida a partir de los antecedentes descritos se centra en el riesgo de exposición humana a bisfenoles y ftalatos partir de materiales poliméricos en contacto con los alimentos

Se plantean por tanto, los siguientes hechos. En primer lugar la migración de monómeros y aditivos de materiales plásticos es una constante en el uso de estos materiales. En segundo lugar existen dudas razonables del potencial riesgo para el medioambiente y la salud animal y humana derivados de esta exposición. En tercer lugar determinados países están iniciando un control sobre la migración de estos productos desde los materiales poliméricos. En cuarto lugar quedan aun dudas sobre el riesgo de exposición y quizá este sea el motivo de que la mayoría de los países industrializados y en vías de desarrollo no hayan tomado medidas de control más estrictas

Considerando los antecedentes bibliográficos estudiados junto con los resultados obtenidos previamente por el grupo de investigación en el que se integra esta Memoria, cabe plantear los siguientes objetivos:

1.- Puesta a punto de los métodos analíticos para la determinación de BFA, BADGE; BisDMA, Acido Ftálico, DBP, DEP y DOP

2.- Identificación y cuantificación de BFA, BADGE; BisDMA, Acido Ftálico, DBP, DEP y DOP en latas de conserva de alimentos y en envases plásticos para microondas de España y Méjico.

3. Comparación de la presencia de BFA, BADGE; BisDMA, Acido Ftálico, DBP, DEP y DOP en envases alimentarios de España y Méjico.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3. MATERIAL Y METODOS**

#### **3. 1. MATERIAL Y REACTIVOS**

##### **3.1.1. Cromatógrafos**

Para el análisis de los contaminantes químicos presentes en las muestras hemos utilizado un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC). El que se ha empleado para la realización del presente trabajo ha sido un aparato marca Waters, modelo 600 Controller, unido a detectores de fluorescencia (Waters 2475 multi  $\lambda$  fluorescente) y de ultravioleta/visible (Waters 2487 dual  $\lambda$  absorvencia), así como, una bomba Waters 600 con inyector automático, además de un degasificador integrado marca Degasys Populaire.

Hemos utilizado, asimismo un cromatografo de gases con espectrometria de masas (CG/MS) marca Saturn 2000 Varian Instrument (Walnut Creek, CA) con inyector automatico 8200, SPI/1078; a DB5-MS con una columna capilar empleada de dimensiones 30 m x 0.25 mm.

##### **3.1.2. Columnas para cromatografía**

Para las diferentes técnicas cromatográficas se han empleado diversas columnas:

- \* Columna C-18 de Merck para HPLC de dimensiones 4,6x150 mm y con un tamaño de partícula de 5  $\mu$  de ODS (Octadecilsilicato).
- \* Columna capilar DB5-MS de Varian para CG/MS (30 m x 0.25 mm).

### **3.1.3 Equipo de filtración para HPLC**

Los solventes utilizados en HPLC, fueron previamente puestos a punto mediante tratamiento con un equipo de filtración aplicado sobre un matraz kitasato con capacidad de 1000 ml, y un equipo de filtración con Millipore marca SEV conectado a una bomba de vacío del tipo gast, modelo nOA-p704-AA con una potencia de 115 Volts, 4,2 Amp y 60 Hz.

### **3.1.5. Microjeringas**

Las microjeringas utilizadas para HPLC son del modelo SGE Syringe 100R-GT-LC SS, con un volumen de 25  $\mu$ l de capacidad. La utilizada para CG/MS es Scharlab con un volumen de 2  $\mu$ l de capacidad.

### **3.1.4. Campana de extracción**

Para la extracción de los solventes, se utilizó una campana de extracción de humos de la marca Fisher Alder de la línea 2000, modelo CS.

### **3.1.6. Equipo de Ultrasonido**

Para la eliminación de burbujas en los solventes antes de usarse en el HPLC, se utilizó un ultrasonido marca Branson 2510.

### **3.1.7 Autoclave**

Para la preparación de las muestras se manejó una autoclave marca Yamato Sterilizer SE 510.

### **3.1.8. Horno de microondas**

La preparación de las muestras, se utilizó un horno de microondas marca Samsung MS1666WE.

### **3.1.9. Centrifuga**

Para el proceso de extracción de las muestras se usó una centrifuga marca Hermle modelo Z 200-A y otra marca Hamilton Bell, modelo Vanguard V 6-500.

### **3.1.10. Rotavapor**

Para la desecación de las muestras a presión reducida y temperatura controlada se ha empleado un rotavapor Buchi R-300 (Buchi, Italia).

### **3.1.11. Balanza de precisión**

Se ha utilizado una balanzas de precisión AND GR-120 con capacidad máxima de 120 mg, mínima de 10mg y  $e = 1\text{mg}$  y  $d = 0,1\text{mg}$ .

### **3.1.13. Aparato de destilación**

La separación y recuperación de solventes se realizo en un aparato de destilación, con una parrilla integrada del tipo electrothermal, matraz balón de fondo plano de vidrio con capacidad de 1000 ml integrado a un refrigerante marca SEV.

### **3.1.14. Cámara frigorífica y congeladores**

Para el almacenamiento de reactivos así como para la realización de experimentos a baja temperatura se han utilizado una cámara frigorífica (Pedro y López, S.A.) con temperatura regulada a 4° C, además de frigoríficos y congeladores convencionales.

Para el almacenamiento de muestras se ha utilizado un congelador, marca TOR-REY, tipo arcón, con temperatura fijada a -20° C. TOR-REY.

### **3.3.15. Pipetas automáticas**

Para la medición de los reactivos se han utilizado pipetas graduadas de 10, 5 y 1 ml, con pipeteador de succión y expulsión automática del fluido de la marca Kimax-Si. También, se emplearon pipetas de volumétricas de vidrio de 1 ml (Kimax-Si), para la preparación de las muestras patrón.

### **3.3.16. Tratamiento de textos. Representaciones gráficas**

La confección y edición del presente trabajo se ha hecho mediante el uso del procesador de textos MICROSOFT WORD versión 2000. El programa de gráficos utilizado ha sido el MICROSOFT EXCEL versión 2000.

### **3.3.17. Tratamiento estadístico de los datos**



El tratamiento estadístico de los datos se realizó utilizando el programa SPSS versión 12.0 para Windows.

Se han utilizado los siguientes métodos:

1. Descriptivos: Media Aritmética, desviación estándar y porcentajes
2. Analíticos: Test de Student para muestras independientes, Análisis de la varianza

### **3.2.1 Compuestos químicos patrones**

Todos los compuestos químicos patrones que hemos utilizado fueron obtenidos de Sigma-Aldrich: Bisfenol A (BFA) (CAS n°: 3253-39-2), Dietil ftalato (DEP ;CAS n° 84-66-2), Bisfenol A diglicidil eter (BADGE; CAS n° 1675-54-3), Bisfenol A dimetacrilato (BisDMA; CAS n° 3253-39-2), Dibutil ftalato (DBP; CAS n°: 84-74-2), Dioctil ftalato (DOP; CAS n° 117-81-7). Ácido Ftálico (Ácido 1,2-Bencendicarboxílico; CAS 88-99-3)

### **3.2.2 Reactivos para la extracción**

En la primera fase de la extracción se uso metanol de la marca Sigma-Aldrich, grado reactivo. Para la extracción de las muestras se utilizó el cloroformo como solvente elaborado por Sigma-Aldrich, grado reactivo. Para la disolución de la materia orgánica en la muestra, se utilizó el ácido suministrado por el fabricante en la presentación comercial J. T. Baker grado reactivo.

### **3.2.2 Reactivos para Cromatografía**

Se han utilizado acetonitrilo, y metanol específicos para HPLC (Sigma-Aldrich). También se utilizó agua desionizada, bidestilada y filtrada en los ensayos que así lo requirieron.

## **3.2 METODOS CROMATOGRÁFICOS**

### 3.2.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Se ha trabajado con U/V y Fluorescencia, según material descrito previamente.

Las condiciones de trabajo se especifican a continuación:

Columna: C-18

Flujo: 1 ml/min.

Detector UV:  $\lambda$  280 nm y 270 nm.

Detector de fluorescencia:  $\lambda$  excitación 275 nm;  $\lambda$  emisión 300nm

Solventes: Fase A: Acetonitrilo/Agua 1/1 (v/v)

Fase B: Acetonitrilo

Gas desgasificador: Helio

Temperatura: Ambiente (25° C)

Volumen de inyección: 20  $\mu$ l

El programa de gradiente utilizado se recoge en la tabla 3.1

**Tabla 3.1.** Programa de gradiente HPLC

Tiempo	Fase A (%)	Fase B(%)	Flujo (mL/min.)
0	100	0	1
20	0	100	1
2	100	0	1

Tiempo total del cromatograma 22 minutos.

### 3.2.1.1 ANÁLISIS CUALITATIVO DE BISFENOLES Y FTALATOS

Bajo las condiciones de trabajo descritas, se han analizado disoluciones en metanol a partir de concentraciones desde 100ug/mL a 10 ng/mL de los siguientes productos:

- \* Acido Ftálico
- \* BFA: Bisfenol A
- \* BisDMA: Dimetacrilato de Bisfenol A
- \* BADGE: diglicidil eter de Bisfenol A
- \* DOP: Dioctil ftalato
- \* DEP :Dietil ftalato
- \* DBP : Dibutil ftalato

Los tiempos de retención medios relativos de dichos productos quedan recogidos en la tabla 3.2

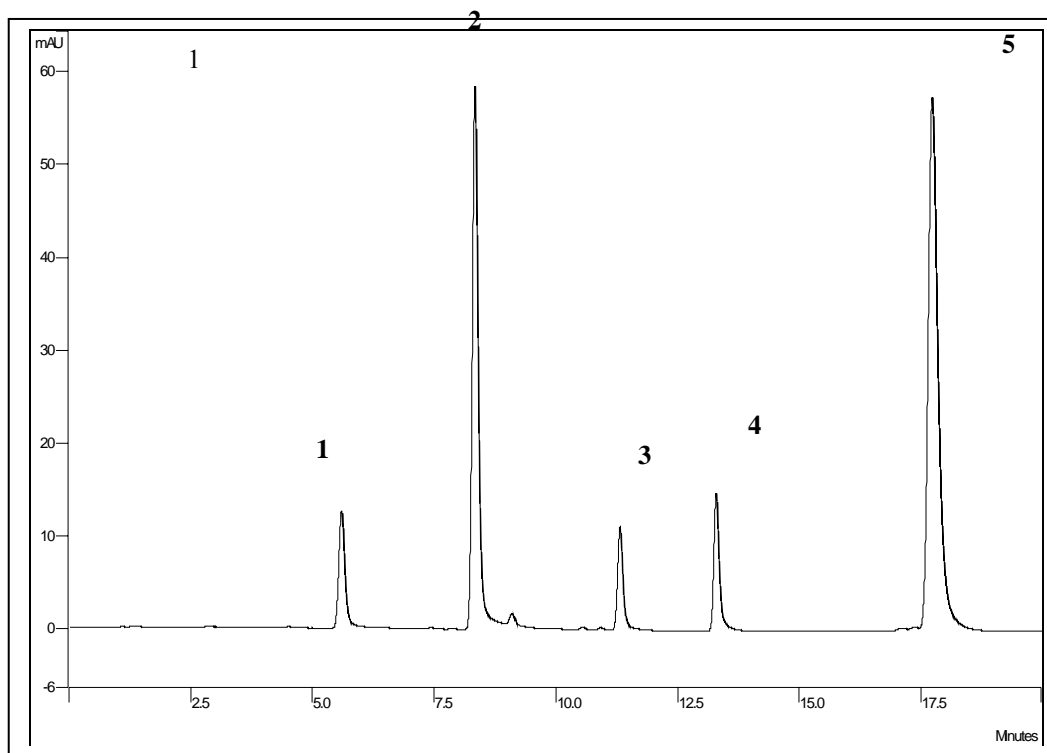
**Tabla 3.2.** Tiempos de retención relativos en HPLC, U/V y Fluorescencia.

Productos	Tr ± SD
Acido Ftálico	1,60 ± 0.2
BFA*	3,20 ± 0.01
DEP	5,61 ± 0.05
BADGE	10,70 ± .004
BisDMA	11,70 ± 0.05
DBP	12,70 ± 0.01
DOP	16,50 ± 0.6

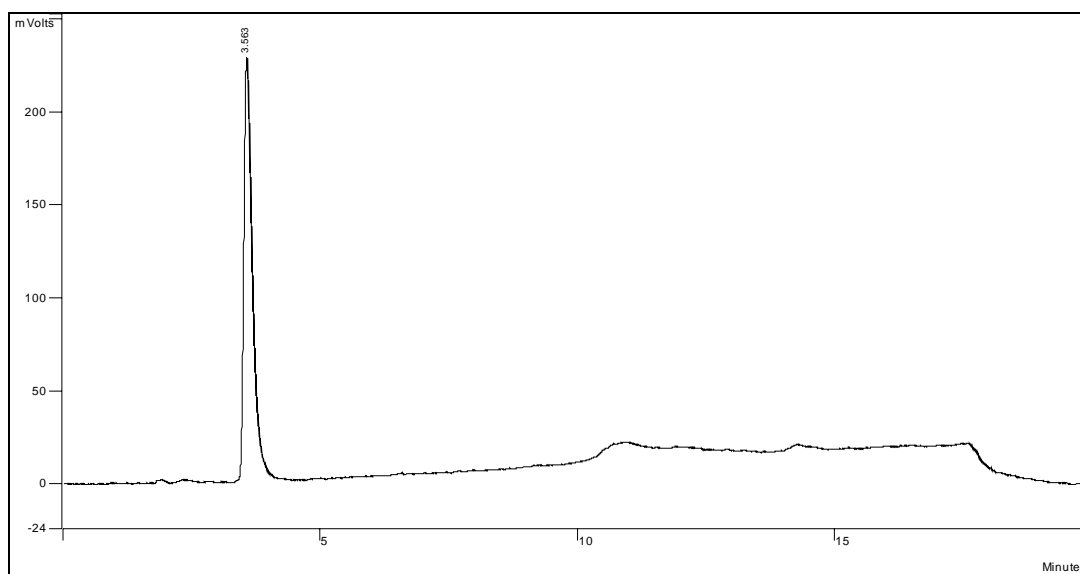
Valores medios de 10 cromatogramas obtenidos en disolución patrón en metanol

\* BFA se ha analizado con detector de fluorescencia

La figura 3.1 muestra un cromatograma de HPLC de una disolución patrón mezcla de DEP, BADGE, BisDMA, DBP y DOP en ultravioleta. La figura 3.2 muestra un cromatograma de HPLC correspondiente a una disolución patrón de BFA en fluorescencia.

**Figura 3.1** Cromatograma en HPLC con detector de uv de una disolución patrón mezcla de

DEP (1), BADGE (2), BisDMA (3), DBP (4) y DOP (5)

**Figura 3.2** Cromatograma en HPLC con detector de fluorescencia de una disolución patrón de BFA (1)

### 3.2.1.2 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Se ha desarrollado los ensayos de validación característicos que demuestran que el método es válido para el objetivo propuesto. Estos ensayos son: selectividad/especificidad, linealidad, rango, exactitud, precisión, recuperación, límite de detección y cuantificación y robustez.

#### **3.2.1.2.1 Selectividad**

La capacidad del método analítico para medir inequívocamente bisfenoles y ftalatos en las muestras se ha demostrado comprobando que el pico obtenido en el análisis de muestras con presencia del analito y muestras a las que se les ha añadido una concentración conocida del analito coincide en tiempo de retención y no presenta en ningún caso aparición de hombros, colas o interferencias.

La figura 3.3 muestra un cromatograma en HPLC de una muestra analizada en el presente trabajo que contiene DOP y marcada con una disolución patrón de DOP, el pico 1 corresponde a la muestra analizada y a la misma muestra marcada. De forma similar se han realizado ensayos con el resto de los analitos objeto de estudio

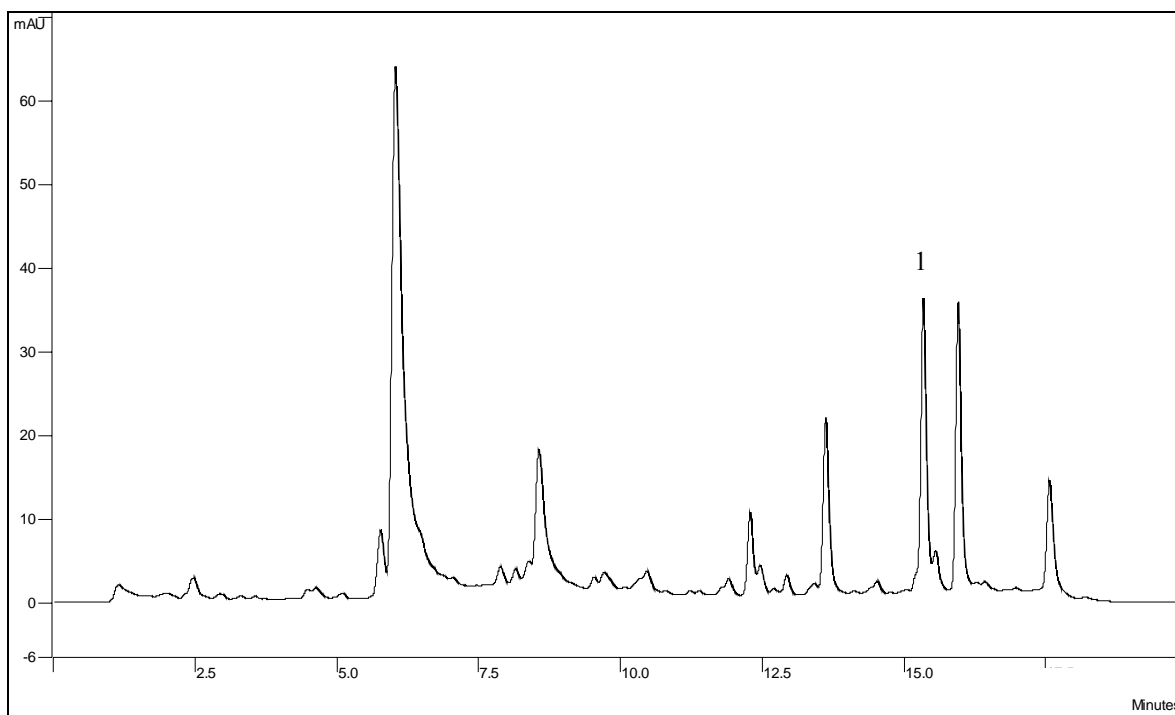
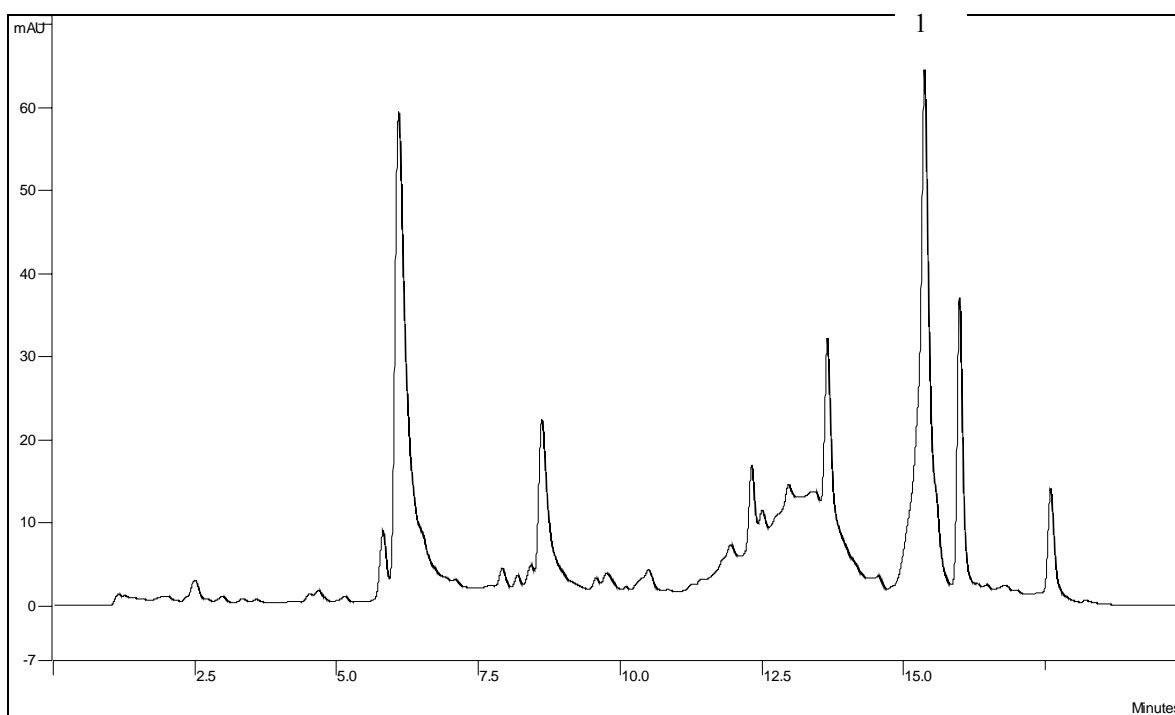


Figura 3.3 el pico 1 corresponde al analito dioctilftalato (DOP)



### **3.2.1.2.2 Reproducibilidad del método cromatográfico**

A partir de la disolución patrón 100 ug/mL en metanol de cada uno de los productos, se prepararon disoluciones de diferentes concentraciones dependiendo del producto y se inyectaron 20  $\mu$ L, en las condiciones de trabajo establecidas, para determinar el área correspondiente a cada uno de estos análisis.

Los derivados del Bisfenol A y los ftalatos se analizan con detector UV/V a una longitud de onda de 280nm; el BFA se analiza con detector de fluorescencia a 275/300 nm

La tabla 3.3 recoge los valores correspondientes a los 10 ensayos concordantes, así como el tratamiento estadístico realizado a los datos.

**Tabla 3.3.**

Productos	Concentración	Área media	Desviación Estándar
Ácido Ftálico	10,0 ug/mL	986889,0	48348,31
BFA	22,80 ng/mL	374480,67	70105,22
DEP	10,00 ug/mL	317633,30	16766,90
BADGE	3,40 ug/mL	14198,00	114,31
BFADM	36,40 ug/mL	34109,00	669,40
DBP	10,0 ug/mL	246341,70	3080,32
DOP	10,0 ug/mL	190749,30	9437,00

### **3.2.1.2.3. Limite de Detección y Cuantificación**

El límite de cuantificación (LC) de un método analítico, para un analito en particular es la cantidad menor del analito presente en una muestra que puede ser analizada con precisión y exactitud.

El límite de detección (LD) de un método analítico para un analito en particular es la menor cantidad del analito que puede ser detectada pero no cuantificada con precisión y exactitud.

Existen varios métodos para determinar estos límites: En este trabajo se han considerado dos métodos

### 1.- Método basado en la relación señal /ruido.

Se considera límite de detección a la concentración de analito que proporciona una señal 3 veces superior al ruido de fondo obtenido tras el análisis de una muestra blanco (que no contenga analito).

Se considera límite de cuantificación a la concentración de analito que proporcione una señal 10 veces superior al ruido de fondo. (Mac Dougall y col. 1980; Long y col. 1983)

Mac Dougall y col. (1980), propusieron una serie de normas para la adquisición y evaluación de datos analíticos y definieron dos conceptos analíticos diferenciados, como son: límite de detección y límite de cuantificación.

**Límite de detección:** se define como un número expresado en unidades de concentración (o cantidad), que describe el más bajo nivel de concentración (o cantidad) de un elemento que un analista puede determinar, estableciendo diferencias estadísticas respecto al ensayo en blanco, realizado en las mismas condiciones (Long y col., 1983). Para establecer el límite de detección, normalmente hay que realizar unas medidas en blanco. La media del valor de la respuesta del blanco,  $X_B$ , se puede calcular y la desviación estándar

$$S_B^2 = \frac{\sum (X_{Bj} - X_B)^2}{(n_B - 1)}$$

La IUPAC y los autores anteriormente citados consideran que un valor de  $n_B$  igual a 0, es adecuado para establecer la desviación estándar. De otra parte, para definir el límite de detección en concentraciones ( $C_L$ ), la IUPAC establece:

$$X_L = X_B + K S_B$$

Si  $K=3$ , el nivel de confianza establecido estadísticamente es del orden del 99,86%. Por tanto un valor  $K$  de 3, será el que utilizemos para el cálculo de los límites de detección en este capítulo.

**Límite de cuantificación:** el criterio que se debe seguir para establecer el límite de cuantificación, nos lleva a situar la región de cuantificación, claramente por encima del



límite de detección. Siguiendo las definiciones, el límite de cuantificación, está localizado por encima de la media del blanco de acuerdo con la expresión.

$$St - Sb = Kq \cdot$$

Se recomienda que  $Kq$  sea igual a 10. Donde  $St$  (o se al apreciable) será:

$$St = (Sb + 10 \cdot )$$

Todo lo dicho hasta el momento, se puede expresar gráficamente en la figura 3.4

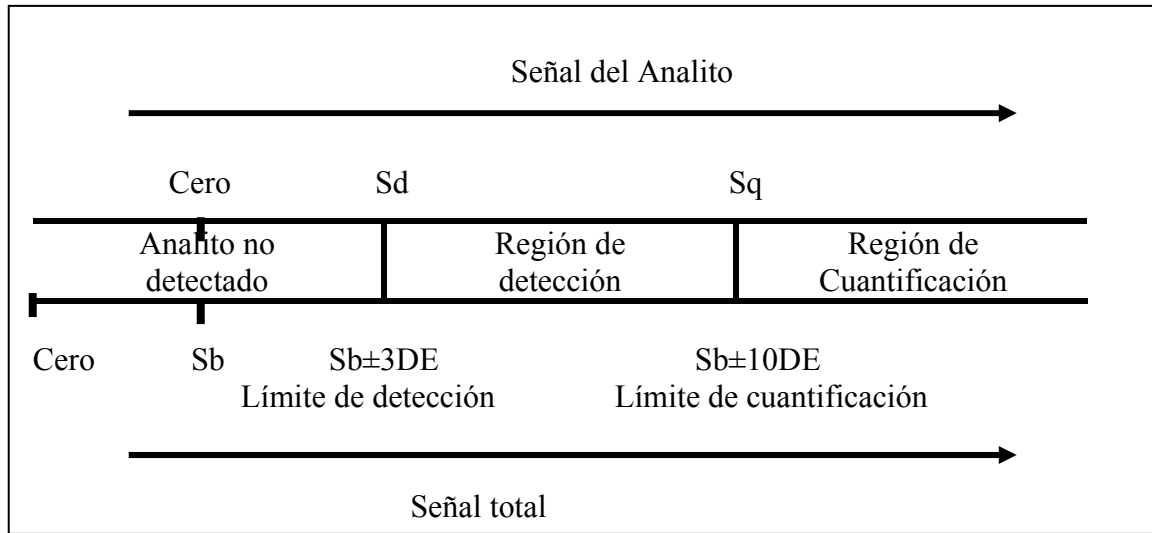


Figura: 3.4 El límite de detección está localizado 3DE sobre la medida del blanco. El límite de cuantificación es de 10DE sobre el blanco. Estos son los criterios mínimos que recomiendan los autores citados.

En resumen este esquema corresponde a los criterios que se han seguido para establecer los límites de detección y cuantificación.

Regiones de las medidas del analito:

Señal del analito ( $S_x$ )

< 3DE	analito no detectado
3DE a 10DE	región de detección
> 10 DE	región de cuantificación

La aplicación de estos criterios al análisis de los oligómeros y aditivos, constituyentes de los envases de alimentos, por HPLC-Detector ultravioleta y de fluorescencia, han permitido determinar para cada uno de ellos, los límites de detección y cuantificación en las condiciones de trabajo ya definidas y de acuerdo con la realización de diez medidas concordantes, para cada uno de los productos analizados.

Las áreas que se han tomado para definir los límites de detección de los monómeros corresponden al valor 3DE .

**Límite de cuantificación:** siguiendo el criterio antes enunciado, para establecer el límite de cuantificación y de nuevo considerando que el área mínima debe corresponder a 10 veces la desviación estándar del blanco, después de realizar 10 medidas concordantes

La tabla.3.4 corresponde a los límites de detección y cuantificación, deduciéndose a partir del área la concentración correspondiente.

$$X_B + 3DE = X_L$$

$$X_B + 10DE = X_L$$

**Tabla 3.4.** Límites de detección y cuantificación

Producto	Limite detección	Limite cuantificación
ACIDO FTALICO		
BFA (ng/mL)	1,00	2,30
DEP (ug/mL)	100	600
DBP (ug/mL)	50	200
BADGE (ng/mL)	30	80
DOP (ug/mL)	150	400
BisDMA (ng/mL)	30	90

**2.- Método basado en la desviación estándar de la respuesta y de la pendiente.**

Se construye una recta de calibrado cercana al límite de cuantificación. Se obtiene la pendiente (b en la ecuación), el área media y la desviación estándar para cada uno de los niveles de concentración. Se hace una nueva recta de regresión en las que las ordenadas son las desviaciones estándar y las abscisas las concentraciones de analito. La intersección de esta recta es el valor S de la ecuación:

$$C = K \times S / b \times \sqrt{n}$$

en donde: C = concentración del analito en el límite de detección o cuantificación

K = constante igual a 10 para LC e igual a 3 para LD

S = desviación estándar de la respuesta

b = pendiente de la recta de calibrado

n = número de análisis

La tabla 3.5 recoge los límites de detección y cuantificación de todos los analitos estudiados en este trabajo calculados siguiendo el método basado en la desviación estándar de la respuesta y de la pendiente.

**Tabla 3.5** Límites de detección y cuantificación

<b>BFA (ng/mL)</b>	<b>LD(ng/mL)</b>	<b>LQ(ng/mL)</b>
Área = 8539,703 [BFA] + 301540,174 R=0.999 SD área = 16,497 [BFA ] +73140,983 R= 0.279	0,80	2,7
<b>BADGE (ng/mL)</b>		
Área= 3,893[BADGE] +763,959 R= 1,000 SD área= 0,062[BADGE] + 92,277 R= 0.988	22,5	75,0
<b>BisDMA (ng/mL)</b>		
Área= 8,99 [BisDMA] +1084,961 R=1,000 SD área=0,060[BisDMA] – 782,827 R= 0,998	82,5	270,5
<b>DEP (µg/ml)</b>		
Área= 32827,476 [DEP] –9950,726 R= 1,000 SD área= 324,273[DEP] + 7127,801 R=0,945	200	700
<b>DBP (µg/mL)</b>		
Área= 24865,373 [DBP] –2724,459 R= 1,000 SD área= 526,991[DBP] - 1113,371 R=0,999	50	150
<b>DOP (µg/mL)</b>		
Área= 20557,668 [DOP] –7651,852 R= 1,000 SD área= 220,557[DOP] + 3621,972 R=0,961	170	500

#### **3.2.1.2.4. Linealidad y curvas de calibrado**

La mayor parte de las medidas tomadas a partir de métodos analíticos, no corresponden propiamente al parámetro que interesa, sino que este es obtenido por la transformación matemática del dato medido. De hecho en cromatografía se obtiene como medida el área del pico, que debe de ser convertida en la concentración del analito u otra medida derivada de esta (ej: porcentaje).

La linealidad es el procedimiento que describe la relación existente entre ambas variables, esto es describe la capacidad del método para obtener resultados analíticos proporcionales a la concentración del analito en la muestra dentro de un rango establecido.

El rango, se define como un intervalo entre la menor y mayor concentración del analito en el que se ha demostrado que el método es lineal, preciso y exacto (Jenke y cols., 1996).

La medida cromatográfica área de pico es, generalmente directamente proporcional a la variable de concentración del analito, por lo que la relación entre ambas variables puede expresarse matemáticamente como una recta de regresión del tipo:

$$y = a x + b,$$

Donde: **y** es la variable dependiente y representa a la respuesta (área del pico),

**x** es la variable independiente o concentración de analito,

**b** la pendiente

**a** la ordenada en el origen.

Esta ecuación se obtiene por un método de ajuste (habitualmente por mínimos cuadrados), El estudio de linealidad consiste en la construcción de esta recta de regresión, denominada mas habitualmente recta de calibrado, a partir del análisis de un mínimo de cinco concentraciones crecientes de analito (Thompson y cols., 2002), dentro del rango de interés y analizadas preferentemente por triplicado. El rango no debe exceder los diez órdenes de magnitud entre el nivel inferior y el superior.

El análisis de la varianza en un estudio de regresión, permite comprobar la hipótesis de que las diferencias observadas entre los distintos niveles de las variables en estudio, no ocurren

al azar, sino que son debidas a la dependencia lineal existente entre ellas. Sin embargo, el modelo de análisis de la varianza (ANOVA) supone el cumplimiento de los siguientes supuestos: homogeneidad de varianzas y normalidades de residuales.

La normalidad de los residuales puede ser comprobada mediante representaciones graficas de normalidad (gráficos de dispersión y gráficos P-P de residuo normal tipificado) o aplicando test de normalidad ( Shapiro Wilkes ).

Los resultados obtenidos para los patrones de los productos en estudio se recogen a continuación

### **Estudio de la linealidad del detector**

#### **Curva calibrado del ácido ftálico**

Variable predictora: concentración de acido Ftálico,

Variable dependiente: áreas cromatográficas

R	R <sup>2</sup>	SD de residuales
0.995	0.989	343549.95

#### **ANOVA**

	Varianzas	F	Sig.*
Regresión	3.262 E +13	276.337	0.000
Residual	1.180 E +11		

\*Existe una asociación estadísticamente significativa entre las dos variables de la regresión

#### **Coefficientes**

	B	Error típ.	Test de Wald	p
Ordenada en origen	516166.839	268798.147	1.920	0.151
Coefficiente de regresión	9120.566	548.659	16.623	0.000

#### **Estadísticos sobre los residuos**

	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típ.	N
Valor pronosticado	607372.50	7812619.5	4182634.4	2855480.1335	5
Residuo bruto	-366577.1	379516.50	0.0000	297522.99	5
Valor pronosticado tip.	-1.252	1.271	0.000	1.000	5

Residuo tip.	-1.067	1.105	0.000	0.866	5
--------------	--------	-------	-------	-------	---

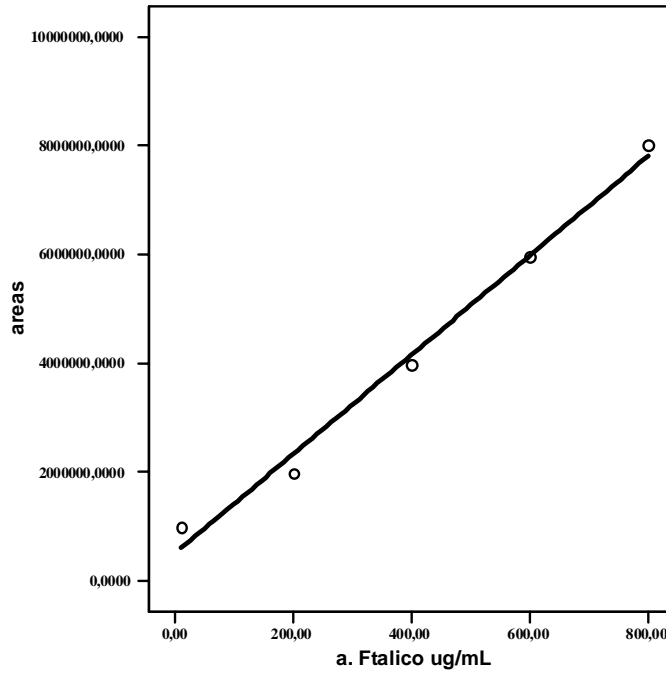
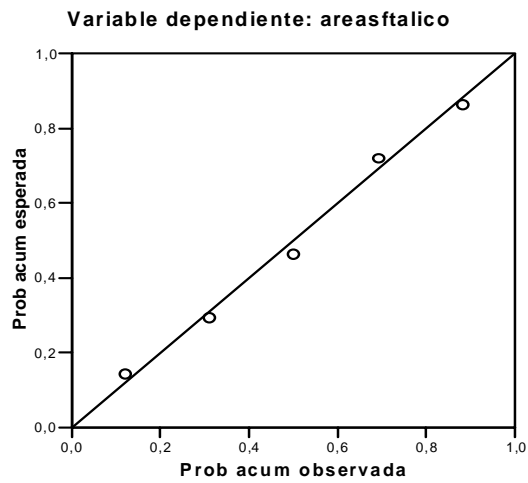


Gráfico P-P normal de regresión Residuo tipificado



Puede asumirse que los residuales siguen una distribución normal, el grafico P-P de probabilidad normal

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Residuo no estandarizado	0.151	5	0.200(*)	0.980	5	0.936

Este es un límite inferior de la significación verdadera. a Corrección de la significación de Lilliefors

### **Curva calibrado del BFA**

Variable predictora: concentración de bisfenol A

Variable dependiente: áreas cromatogramas

R	R <sup>2</sup>	SD de residuales
0.999	0.998	53548.126

#### **ANOVA**

	Varianzas	F	Sig.
Regresión	4.215 E +12	1469.852	0.000*
Residual	8.602 E + 09		

\*Existe una asociación estadísticamente significativa entre las dos variables de la regresión

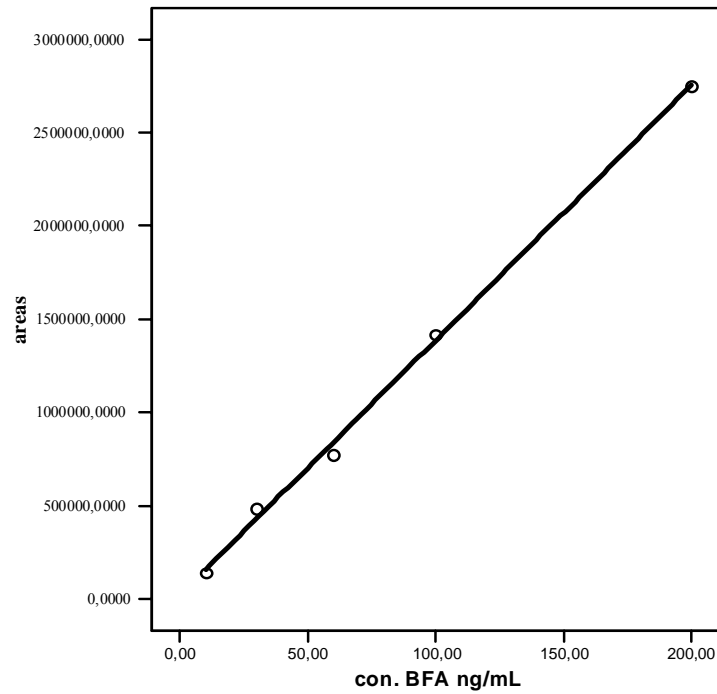
#### **Coeficientes**

	B	Error típ.	Test de Wald	p
Ordenada en el origen	21287.104	37222.144	0.572	0.607
Coefficiente de regresión	13656.106	356.197	38.339	0.000

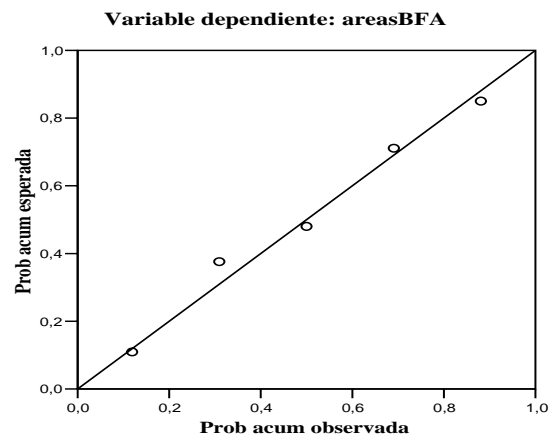
#### **Estadísticos sobre los residuos**

	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típ.	N
Valor pronosticado	157848.17	2752508.2	1113775.6	1026481.46	5
Residuo bruto	-65828.45	55558.71	.0000000	46374.03	5
Valor pronosticado tip.	-0.931	1.596	0.000	1.000	5
Residuo tip.	-1.229	1.038	0.000	0.866	5





**Gráfico P-P normal de regresión Residuo tipificado**



Puede asumirse que los residuales siguen una distribución normal, el gráfico P-P de probabilidad normal

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Residuo no estandarizado	0.158	5	0.200(*)	0.983	5	0.950

\* Este es un límite inferior de la significación verdadera. a Corrección de la significación de Lilliefors

**Curva calibrado del Dietil ftalato(DEP)**

Variable predictora: concentración de Dietil ftalato(DEP)

Variable dependiente: áreas cromatográficas

R	R <sup>2</sup>	SD de residuales
0.995	0.991	266.202

**ANOVA**

	Varianzas	F	Sig.*
Regresión	2.30 E +07	325.220	0.000
Residual	70863.700		

\*Existe una asociación estadísticamente significativa entre las dos variables de la regresión

**Coefficientes**

	B	Error típ.	Test de Wald	p
Ordenada en origen	3634.100	279.195	13.016	0.001
Coefficiente de regresión	7590.500	420.903	18.034	0.000

**Estadísticos sobre los residuos**

	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típ.	N
Valor pronosticado	5152.20	11224.59	8188.40	2400.326	5
Residuo bruto	-254.300	262.799	0.0000	230.538	5
Valor pronosticado tip.	-1.265	1.265	0.000	1.000	5
Residuo tip.	-0.955	0.987	0.000	0.866	5

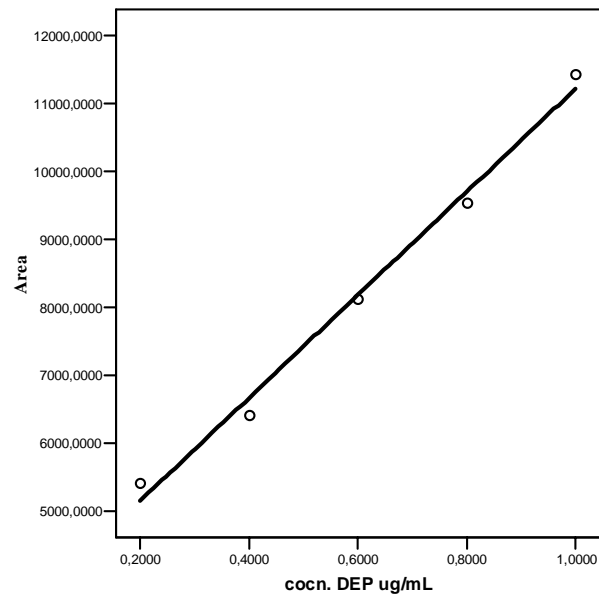
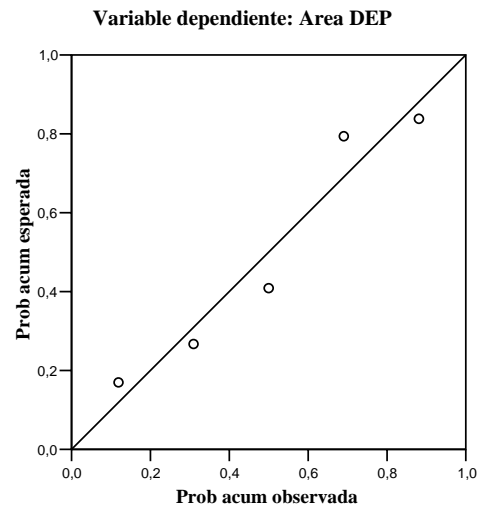


Gráfico P-P normal de regresión Residuo tipificado



Puede asumirse que los residuales siguen una distribución normal, el grafico P-P de probabilidad normal

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Unstandardized Residual	0.228	5	0.200(*)	0.896	5	0.386

\* Este es un límite inferior de la significación verdadera. a Corrección de la significación de Lilliefors

**Curva calibrado del BADGE**

Variable predictora: concentración de BADGE

Variable dependiente: áreas cromatográficas

R	R <sup>2</sup>	SD de residuales
1.000	1.000	856.84

**ANOVA**

	Varianzas	F	Sig*
Regresión	1.549 E+10	21094.476	0.000
Residual	734188.113		

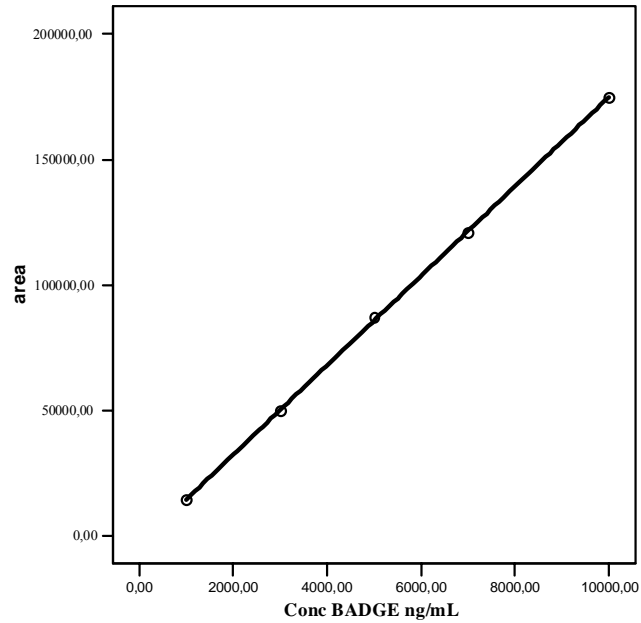
\* Existe una asociación estadísticamente significativa entre las dos variables de la regresión

**Coefficientes**

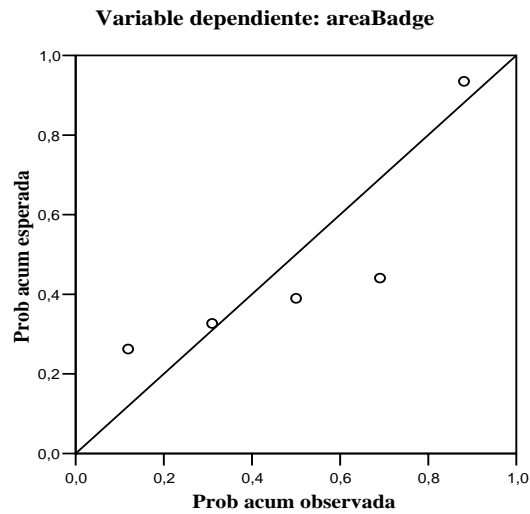
	B	Error típ.	Test de Wald	p
Ordenada en origen	-3189.959	744.077	-4.287	0.023
Coefficiente de regresión	17.815	0.123	145.239	0.000

**Estadísticos sobre los residuos**

	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típ.	N
Valor pronosticado	14624.725	174956.89	89446.400	62224.017	5
Residuo bruto	-544.83	1297.536	0.0000	742.051	5
Valor pronosticado tip.	-1.202	1.374	0.000	1.000	5
Residuo tip.	-.636	1.514	0.000	0.866	5



**Gráfico P-P normal de regresión Residuo tipificado**



No puede asumirse que los residuales siguen una distribución normal, el gráfico P-P de probabilidad normal

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Unstandardized Residual	.368	5	0.025	0.752	5	0.031

a Corrección de la significación de Lilliefors

**Curva calibrado del Dimetacrilato de BFA**

Variable predictora: concentración de Dimetacrilato de BFA

Variable dependiente: áreas cromatográficas

R	R <sup>2</sup>	SD residuales
0.994	0.988	1088.436

**ANOVA**

	Varianzas	F	P*
Regresión	2.900E+ 07	244.861	0.001
Residual	1.184 E+06		

\*Existe una asociación estadísticamente significativa entre las dos variables de la regresión

**Coefficientes**

	B	Error típ.	Test de Wald	p
Ordenada en origen	9081.835	934.918	9.714	0.002
Coefficiente de regresión	2.974	.190	15.648	0.001

**Estadísticos sobre los residuos**

	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típ.	N
Valor pronosticado	12055.73	32873.007	21572.200	8515.943	5
Residuo bruto	-1003.730	1058.780	0.000000	942.613	5
Valor pronosticado tip.	-1.117	1.327	0.000	1.000	5
Residuo tip.	-0.922	0.973	0.000	0.866	5

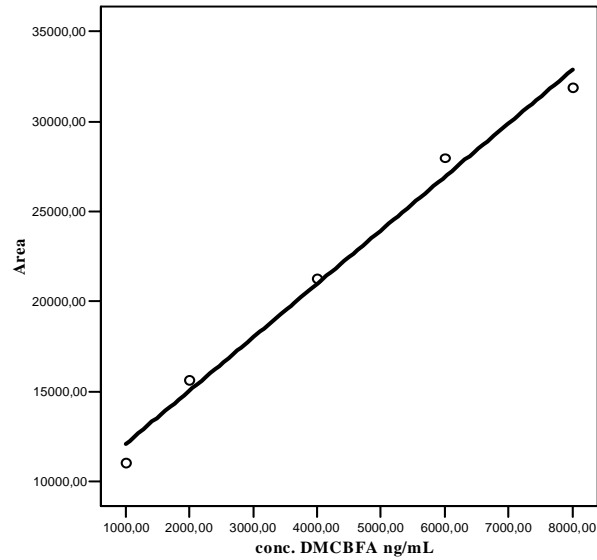
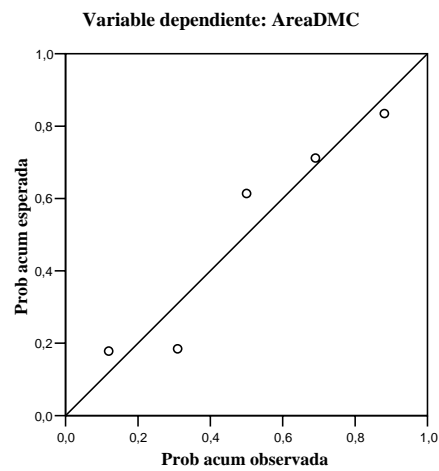


Gráfico P-P normal de regresión Residuo tipificado



Puede asumirse que los residuales siguen una distribución normal, el grafico P-P de probabilidad normal

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Unstandardized Residual	0.250	5	0.200(*)	0.865	5	0.248

\* Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a Corrección de la significación de Lilliefors

**Curva calibrado del Dibutil ftalato (DBP)**

Variable predictora: concentración de Dibutil ftalato (DBP)

Variable dependiente: áreas cromatográficas

R	R <sup>2</sup>	SD de residuales
0.999(a)	0.998	246.518

**ANOVA**

	Varianzas	F	P*
Regresión	1.003E+08	1651.421	0.000
Residual	60771.530		

Existe una asociación estadísticamente significativa entre las dos variables de la regresión

**Coefficientes**

	B	Error típ.	Test de Wald	p
Ordenada en origen	7118.820	232.480	30.621	0.000
Coefficiente de regresión	14340.656	352.891	40.638	0.000

## Estadístico sobre residuos

	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típ.	N
Valor pronosticado	8552.884	21459.47	15436.40	5008.975	5
Residuo bruto	-344.344	195.524	0.000	213.491	5
Valor pronosticado tip.	-1.374	1.202	0.000	1.000	5
Residuo tip.	-1.397	.793	0.000	0.866	5



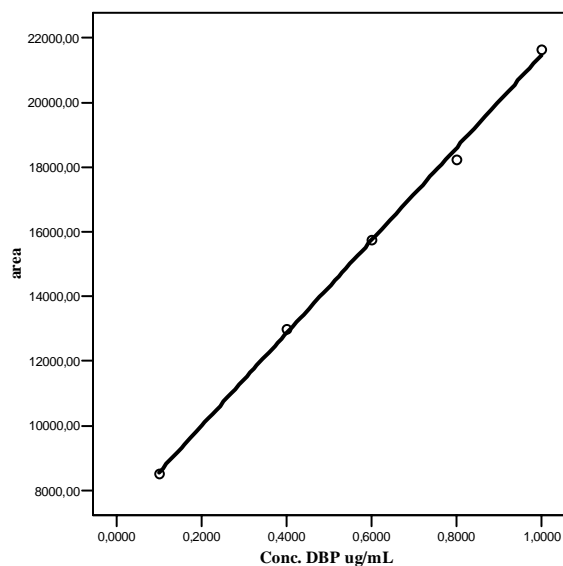
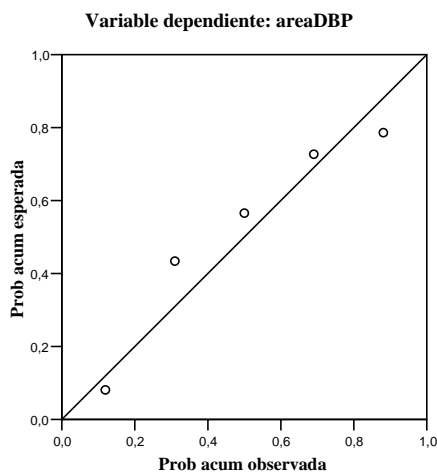


Gráfico P-P normal de regresión Residuo tipificado



Puede asumirse que los residuales siguen una distribución normal, el grafico P-P de probabilidad normal

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Unstandardized Residual	0.224	5	0.200(*)	0.898	5	0.399

\* Este es un límite inferior de la significación verdadera.

a Corrección de la significación de Lilliefors

**Curva calibrado del Dioctil ftalato (DOP)**

Variable predictora: concentración de Dioctil ftalato (DOP)

Variable dependiente: áreas cromatogramas

a

R	R <sup>2</sup>	Sd de residuales
0.998	0.995	583.475

**ANOVA**

	Varianza	F	Sig.*
Regresión	2.097E*08	616.021	0.000
Residual	340443.687		

\*Existe una asociación estadísticamente significativa entre las dos variables de la regresión

**Coefficientes**

	B	Error típ.	Test de Wald	p
Ordenada en origen	536.291	550.247	0.975	0.402
Coefficiente de regresión	2073.053	83.524	24.820	0.000

**Estadísticos sobre los residuos**

	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típ.	N
Valor pronosticado	2609.344	21266.824	12560.000	7240.8630	5
Residuo bruto	-722.504	527.282	0.000	505.3040	5
Valor pronosticado tip.	-1.374	1.202	0.000	1.000	5
Residuo tip.	-1.238	0.904	0.000	0.866	5

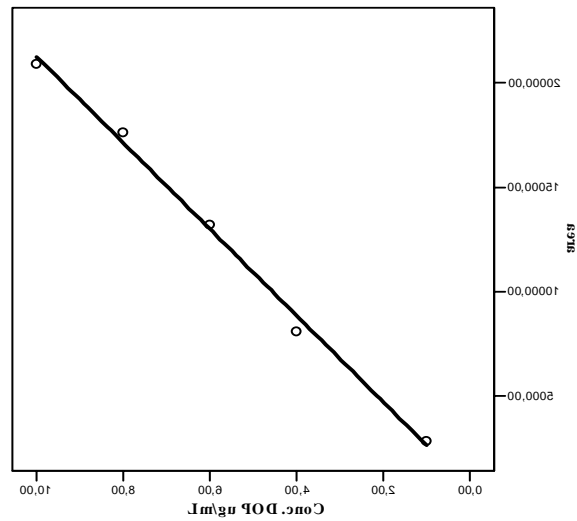
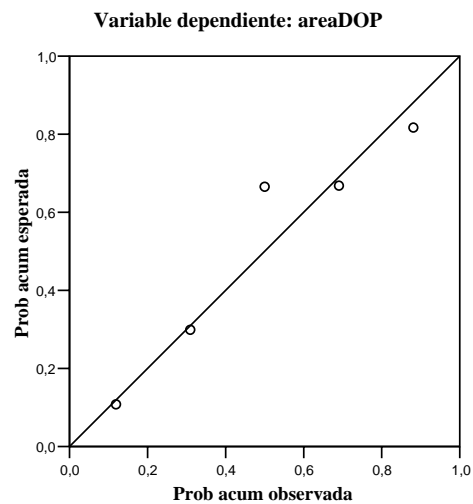


Gráfico P-P normal de regresión Residuo tipificado



Puede asumirse que los residuales siguen una distribución normal, el gráfico P-P de probabilidad normal

	Kolmogorov-Smirnov(a)			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Unstandardized Residual	0.289	5	0.199	0.914	5	0.492

a Corrección de la significación de Lilliefors

La tabla 3. Recoge los valores de las ecuaciones de las rectas deducidas para cada uno de los productos objeto de estudio

**Tabla 3.5 Ecuaciones de la recta**

<b>Producto</b>	<b>Ecuación de la recta</b>	<b>R</b>
Acido Ftálico	$Y = 9120,56 X + 516166,83$	0,995
BFA	$Y = 13656,10X + 21287,10$	0,999
DEP	$Y = 7590,50 X + 3634,10$	0,995
BADGE	$Y = 17,81 X - 3189,95$	1,000
BisDMA	$Y = 2,974 X + 9081,83$	0,994
DBP	$Y = 14340,65 X + 7118,82$	0,999
DOP	$Y = 2073,05 X + 536,20$	0,998

### 3.2.3. CROMATOGRAFÍA DE GASES ESPECTROMETRÍA DE MASAS

La confirmación de los análisis realizados a muestras comerciales se realiza mediante cromatografía de gases/ espectrometría de masas.

Las condiciones de trabajo son las siguientes:

T<sup>a</sup> del inyector 250° *split of* un min. C

T<sup>a</sup> del horno:

T<sup>a</sup> inicial: 50° C mantener 3 min.

Alcanzar 200°C con rampa 30°C/min, mantener 5 min

Alcanzar 270°C con rampa de 30°C/min mantener 8 min

Alcanzar 310°C con rampa de 30°C/min mantener 2 min.

Se programa el espectrómetro de masas en modo SIS.

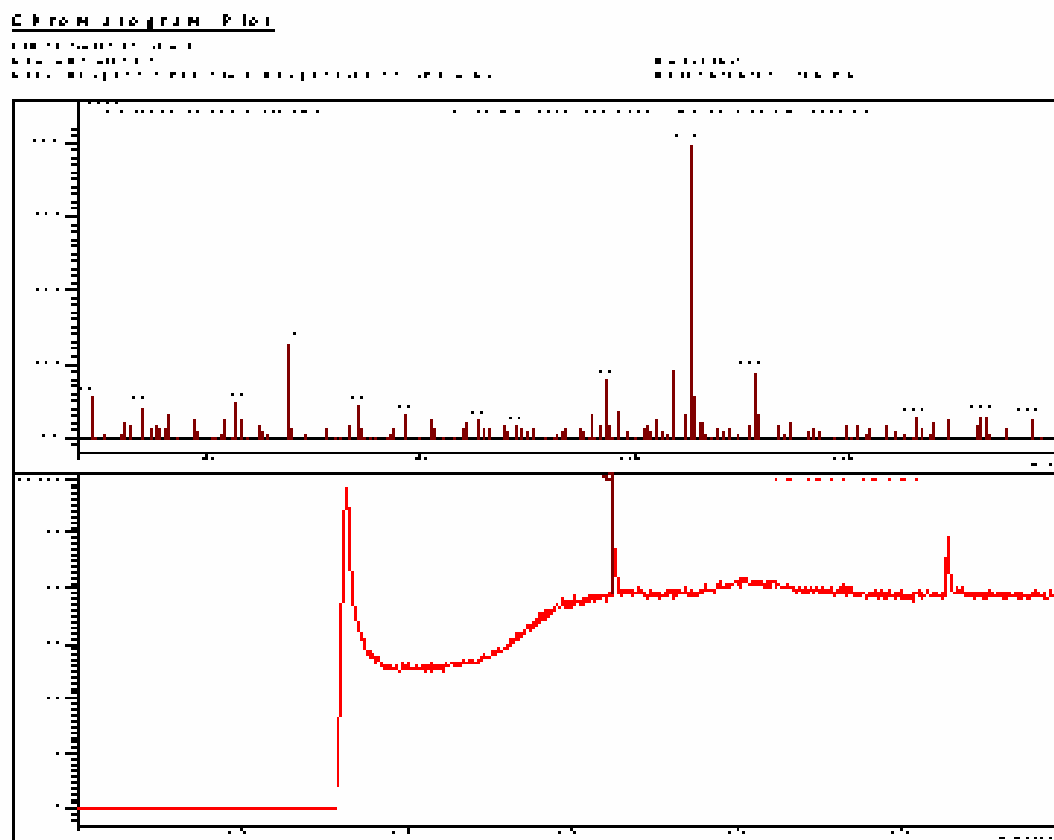
Las masa seleccionadas para los patrones entre 100 y 250

Los tiempos de retención de los patrones analizados y las masas de identificación se recogen en la tabla 3. 6

**Tabla 3.6. Tiempos de retención y masas de los patrones analizados**

PRODUCTOS	Tr ± SD	PM	Masas para identificación
Ácido Ftálico	7,60 ± 0.20	166,1	149; 166
BFA	8,16 ± 0.10	228,0	213; 228
DEP	9,61 ± 0.15	222,24	149;177;222
DBP	7,10 ± 0.07	278,0	149; 223
DOP	10.106 ± 0.06	390,0	149; 279

## Espectros de masas



### 3.2.4 ANÁLISIS DE BISFENOLES Y FTALATOS

#### **METODOS DE EXTRACCION DE LOS PRODUCTOS OBJETO DE ESTUDIO**

Las muestras de las que se van a aislar BFA, BADGE, Bis DMA, DEP, DBP y DOP son potencialmente complejas ya que proceden de envases que contendrán alimentos naturales de origen vegetal (hortalizas y verduras) o bien de origen animal, caso de los envases para alimentos infantiles.

Para disponer de una técnica de extracción adecuada, se han realizado estudios previos, de forma que se prepararon disoluciones hidroalcohólicas de concentración conocida de cada uno de estos productos, monómeros del material plástico y ftalatos. Se han ensayado distintos disolventes de extracción considerando el carácter ligeramente lipofílico de estas moléculas.

Los distintos productos se han extraído con los disolventes hexano, hexano:éter etílico (v:v) y cloroformo. Se ha trabajado a distintas concentraciones y se ha seguido la metodología descrita a continuación

Se toma una alícuota de 75 mL de agua destilada milipore marcada con concentraciones conocidas de los analitos a determinar (BFA, BADGE, Bis DMA, DEP, DBP y DOP) y se le añaden 20 mL de metanol. Se agita vigorosamente en una ampolla de decantación durante 10 minutos. Se le añade tres veces:

- A) Hexano (40 mL)
- B) Hexano:éter etílico (v:v) (40 mL)
- C) Cloroformo (40 mL)

En todos los casos, se agita de nuevo 10 minutos y se centrifuga 15 minutos a 3000 rpm. Se toma la fase orgánica, donde deben estar las sustancias con las que se marcó el agua, y se concentra en un rotavapor a 40°C y presión reducida hasta un volumen final de 10 mL aproximadamente.

Este volumen se concentra de nuevo ahora en corriente de nitrógeno hasta un volumen final de 1 mL. Se le añaden 0,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se agita vigorosamente, y se lleva a centrifugar durante 10 minutos a 3000 rpm.

Se aspira la fase orgánica y se concentra en corriente de nitrógeno hasta sequedad. Cuando se obtiene el residuo seco correspondiente, se solubiliza en 1 mL de metanol grado HPLC.

Se analizan 20µl de los extractos disueltos en metanol, por HPLC para la cuantificación de los productos extraídos.

: Los resultados se recogen en la tabla ....

PRODUCTO	CANTIDAD AÑADIDA (ng)	RECUP. CON HEXANO (%)	RECUP. CON HEX:ETER ETILICO 1:1 (V/V)	RECUP. CON CLOROFORMO (%)
Acidi ftálico ug/mL	200,00	12±3,4	45±5,0	85±7,9
	400,00	20±2,9	65±6,4	88±8,7
	600,00	24±2,9	66±7,9	75±8,8
BFA ng/mL	30,00	N.D.	63,1±4,1	88,4±6,4
	60,00	N.D.	60,2±5,6	88,1±4,1
	100,00	N.D.	62,8±2,1	89,2±4,5
BADGE ug/mL	3,0	N.D.	54±6,6	90±2,3
	5,0	N.D.	69±7,3	90±5,3
	7,0	N.D.	64±2,9	92,5±3,2
BisDMA ug/mL	2,00	N.D.	67,3±4,6	88±5,3
	4,00	N.D.	62,2±5,2	80±5,5
	6,00	N.D.	60,7±4,5	82±3,8
DOP ug/mL	4,00	22,3±1,8	31,4±2,2	87,5±7,6
	6,00	24,5±2,2	33,2±4,1	83,9±6,5
	8,00	21,7±3,1	30,2±2,9	84,7±5,3
DBP ug/mL	0,400	45±4,9	58,2±4,1	90±7,3
	0,600	50±4,9	55,2±3,3	95±5,4
	0,800	40±3,9	52,2±4,2	88±5,7
DEP ug/mL	0,400	33,2±3,1	43,2±2,5	92±5,4
	0,600	31,4±3,3	40,8±3,8	92±5,3
	0,800	30,4±2,8	40,5±5,2	90±5,6



### **Metodología analítica**

Una vez comprobado cual es el disolvente de extracción mas adecuado se establece la metodología analítica a seguir en el trabajo en realización

Se toma una alícuota de 75 mL de agua destilada milipore marcada con concentraciones conocidas de los analitos a determinar (BFA, BADGE, Bis DMA, DEP, DBP y DOP) y se le añaden 20 mL de metanol. Se agita vigorosamente en una ampolla de decantación durante 10 minutos. Se le añade tres veces, 40 mL de cloroformo, se agita de nuevo 10 minutos y se centrifuga 15 minutos a 3000 rpm. Se toma la fase clorofórmica, donde deben estar las sustancias con las que se marco el agua, y se concentra en un rotavapor a 40°C y presión reducida hasta un volumen final de 10 mL aproximadamente.

Este volumen se concentra de nuevo ahora en corriente de nitrógeno hasta un volumen final de 1 mL. Se le añaden 0,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se agita vigorosamente, y se lleva a centrifugar durante 10 minutos a 3000 rpm. Se aspira la fase orgánica y se concentra en corriente de nitrógeno hasta sequedad. Cuando se obtiene el residuo seco correspondiente, se solubiliza en 1 mL de metanol grado HPLC. Se analizan 20µl de los extractos disueltos en metanol, por HPLC para la cuantificación de los productos extraídos.

La comprobación de los resultados llevo a se realizar por triplicado, la recuperación (%) se muestra marcada con los diferentes componentes. En la tabla 3.7 se recogen en resumen los resultados para una muestra. Paralelamente, se ha realizado un ensayo en blanco utilizando agua destilada sin marcar de acuerdo con la metodología anteriormente descrita. .La tabla ..... recoge estos resultados finales

La figura... muestra los cromatogramas de una muestra de agua destilada marcada con y de su respectivo ensayo en blanco.

**Tabla. 3.7.** Recuperación de los analitos en soluciones marcadas

<b>Producto</b>	<b>Concentración añadida (ng/mL)</b>	<b>Concentración encontrada (ng/mL)</b>	<b>Recuperación (%)</b>
<b>Ac. Ftálico</b>	200000	170000	85
<b>BFA</b>	60	54	90
<b>DEP</b>	400	368	92
<b>BADGE</b>	1000	93500	92.5
<b>BFADM</b>	2000	1600	80
<b>DBP</b>	400	360	90
<b>DOP</b>	4000	3500	87.5

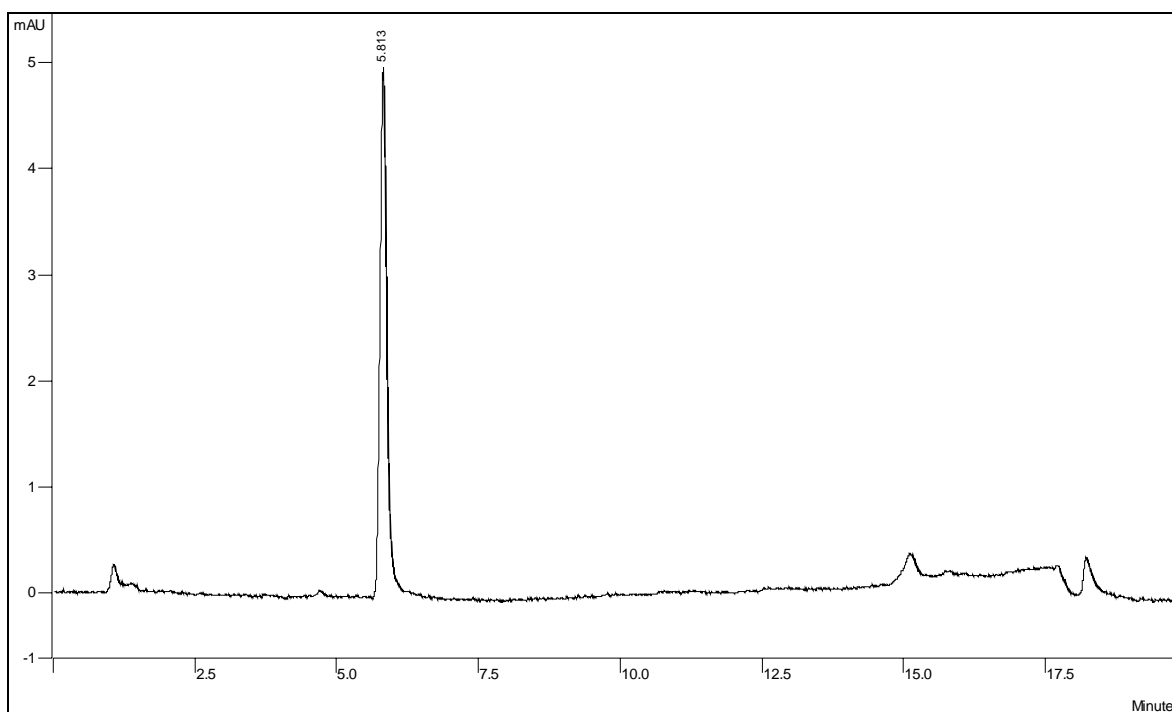


Figura ..... Corresponde a DBP extraído de una disolución marcada

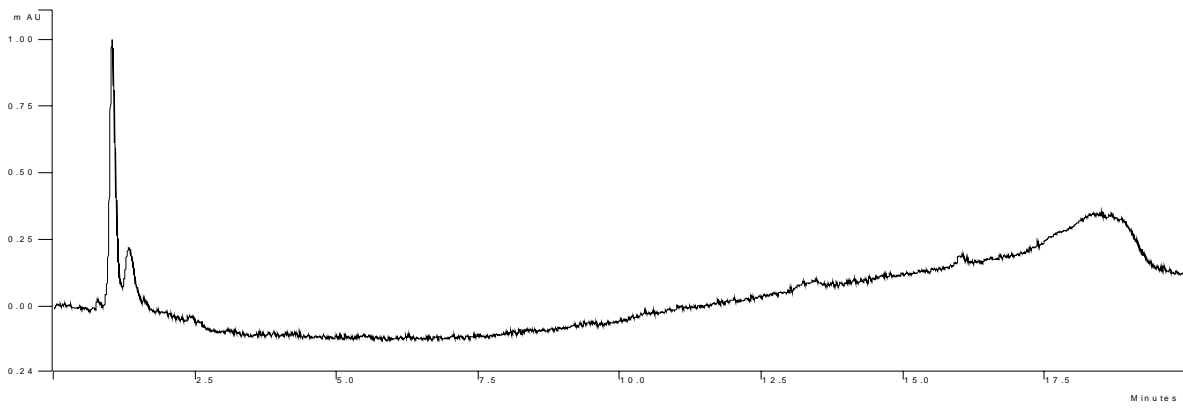


Figura..... cromatograma correspondiente a una extracción de agua milipore (ensayo en blanco)

# **RESULTADOS**

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 ANÁLISIS DE BISFENOLES Y FTALATOS EN LATAS DE CONSERVA**

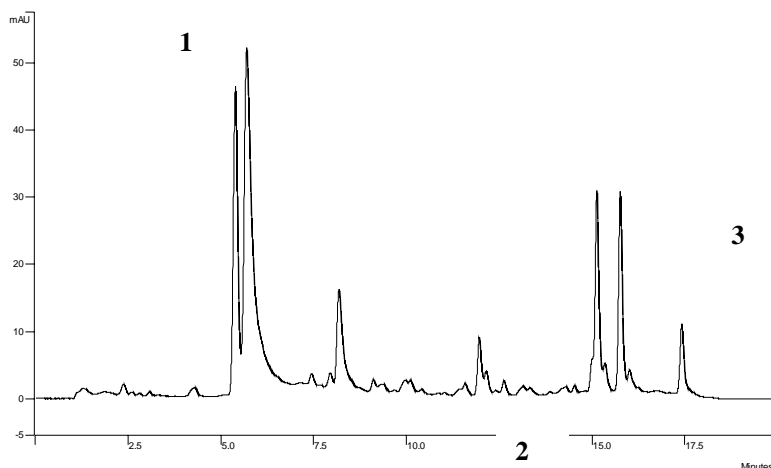
#### **4.1.1 Metodología analítica**

Para el procesado del envase, lo primero que se debe hacer es limpiar correctamente su interior con agua, asegurándonos que no quede ningún resto de alimento que pueda interferir el posterior análisis. Una vez que esto se ha realizado, se le añaden 300 mL de agua destilada y se lleva a un autoclave (121 °C/30 minutos). Posteriormente se toma una alícuota de 75 mL y se le añaden 20 mL de metanol. Se agita vigorosamente en una ampolla de decantación durante 10 minutos. Se le añade tres veces, 40 mL de cloroformo, se agita de nuevo 10 minutos y se centrifuga 15 minutos a 3000 rpm. Se toma la fase clorofórmica, donde debe estar el bisfenol-A, y se concentra en un rotavapor a 40°C y presión reducida hasta un volumen final de 10 mL aproximadamente.

Este volumen se concentra de nuevo ahora en corriente de nitrógeno hasta un volumen final de 1 mL. Se le añaden 0,5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se agita vigorosamente, y se lleva a centrifugar durante 10 minutos a 3000 rpm. Se aspira la fase orgánica y se concentra en corriente de nitrógeno hasta sequedad. Cuando se obtiene el residuo seco correspondiente, se solubiliza en 1 ml de metanol grado HPLC. Se analizan 20µl de los

extractos disueltos en metanol, por HPLC para la cuantificación de los posibles productos extraídos.

La figura 4.1 muestra el cromatograma de HPLC con detector de uv de una muestra de lata de conserva



**Figura 4.1** Cromatograma de HPLC con detector de uv de una muestra de lata de conserva con DEP (1), DBP (2), DOP (3)

### **Reproducibilidad de los resultados**

Se han analizado siguiendo la metodología descrita 10 veces consecutivas el agua procedente de la esterilización de tres muestras españolas (latas de conserva) los valores encontrados se recogen en la tabla 4.1

Tabla 4.1 Reproducibilidad de los análisis en muestras comerciales

Muestra	N	Rango	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
Area DEP	9	151.00	1706.00	1857.00	1791.00	66.919
ug /mL DEP	9	0.015	0.173	0.188	0.181	0.007
<b>Muestra 2</b>						
Area DOP	9	32422.000	175160.00	207582.00	194246.33	14686.70
ug /mL DOP	9	0.2902	1.5677	1.8579	1.738533	0.131
<b>Muestra 3</b>						
Area BFA	9	303481.00	1457824.0	1761305.0	1640986.0	139607.78
ug/mL BFA	9	0.037	0.154	0.190	0.169	0.016

## ANÁLISIS DE MUESTRAS COMERCIALES

### 4.1.2 Análisis de bisfenoles y ftalatos en latas de conserva mejicanas

Hemos procedido a la identificación de los contaminantes químicos presentes en el agua destilada procedente de la esterilización de latas de conserva mejicanas, mediante el análisis cualitativo y cuantitativo por HPLC con detector de UV/V y fluorescencia, siguiendo la metodología cromatográfica desarrollada en el apartado de material y métodos. Todas las muestras han sido analizadas simultáneamente por espectrometría de masas para confirmar la presencia o ausencia de bisfenoles y ftalatos.

#### 4.1.2.1 Características de la muestra

A continuación se describen las características de las latas de conserva mejicanas analizadas en este trabajo:

1 Conserva de chiles jalapeños: (Muestras: 3, 4, 10,12, 15 y 20)

Ingredientes: chiles jalapeños, agua sal y acidulante.

Contenido neto: 250 g. (M :3, 4 y 10)

Contenido neto:100g (M: 12,15)

Contenido neto:215 g (M:20)

País de origen: México.

2.- Conserva de granos de maíz: (Muestras: 1, 2, 17, 19, 22 y 23 )

Ingredientes: maíz en granos, agua y sal

Contenido neto: 220 g (M:1, 2, 23)

Contenido neto:300 g (M: 17,19, 22)

País de origen: México

3.- Conserva de champiñones: ( Muestras: 11 y 25)

Ingredientes: champiñones, agua, sal, acidulante y antioxidante.

Contenido neto: 230 g

País de origen: México

4.- Conserva de guisantes: ( Muestras: 6, 13, 14, 16 y 18)

Ingredientes: guisantes, agua y sal,

Contenido neto; 220 g (M: 6,13,14).

Contenido neto: 410g (M:16,18)

País de origen: México.

5.- Conserva de macedonia de verduras: ( Muestras: 5, 7, 9, 21 y 24)

Ingredientes: guisantes, zanahorias, patatas, agua y sal.

Contenido neto: 250 gr

País de origen: México.

#### 4.1.2.2 Residuos de bisfenoles y ftalatos en las latas de conserva mejicanas

En las tabla 4.2 se recogen los datos correspondientes a la concentraciones de bisfenoles y ftalatos en las latas mejicanas analizadas.

#### 4.1.2.3 Estadisticos descriptivos de la presencia de bisfenoles y ftalatos en las latas de conserva mejicanas

En las tablas siguientes se recogen los valores medios del analisis de muestras de procedencia mejicana

**Tabla 4.2. Muestras mejicanas: producto envasado: Chiles jalapeños**

<b>Producto (ug/mL)</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>10</b>	<b>12</b>	<b>15</b>	<b>20</b>
Ac. Ftálico	9549.571	97.613	4868.240	16.377	2715.665	34.063
BFA	15.868	--	--	0.386	21.322	--
DEP	--	--	--	--	--	32.319
BADGE	--	2.7096	--	--	--	--
BFADM	--	126.196	--	--	--	--
DBP	--	23.061	18.032	--	--	--
DOP	663.857	--	--	29.194	60.183	70.780

**Tabla 4.3 Muestras mejicanas: producto envasado: maiz dulce**

<b>Producto (ug/mL)</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>17</b>	<b>19</b>	<b>22</b>	<b>23</b>
Ac. Ftálico	1.375	398.359	339.513	16.094	2187.492	99.178
BFA	3.359	10.019	--	--	--	--
DEP	23.579	--	30.168	42.528	--	35.186
BADGE	--	--	--	--	--	--
BFADM	--	--	--	--	--	--
DBP	5.941	0.011	2.323	--	8.333	6.232
DOP	81.914	262.642	--	38.247	60.533	80.409



**Tabla 4.4 Muestras mejicanas producto envasado champiñones**

<b>Producto</b> <b>(ug/mL)</b>	<b>11</b>	<b>25</b>
Ac. Ftálico	17.96730	1697.014
BFA	2.30	1.25
DEP	--	--
BADGE	--	--
BFADM	--	--
DBP	--	--
DOP	31.352	70.576

**Tabla 4.5. Muestras mejicanas producto envasado: guisantes**

<b>Producto</b> <b>(ug/mL)</b>	<b>6</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>16</b>	<b>18</b>
Ac. Ftálico	55.985	164.399	601.405	--	721.356
BFA	--	--	2.51	4.661	2.12
DEP	22.151	--	--	33.154	18.124
BADGE	--	--	--	--	--
BFADM	--	--	--	--	--
DBP	8.556	5.946	7.315	--	--
DOP	--	90.558	100.015	86.016	76.116

**Tabla 4.6. Muestras mejicanas: producto envasado macedonia de verduras**

<b>Producto</b> <b>(ug/mL)</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>9</b>	<b>21</b>	<b>24</b>
Ac. Ftálico	29.124	5896.545	1851129'40	13.683	4025.203
BFA	--	1.68	--	0.439	--
DEP	--	--	--	0.009	13.115
BADGE	--	--	--	--	--
BFADM	--	--	--	--	--
DBP	--	--	--	--	--
DOP	24.183	34.167	510298'30	70.780	59.475

En las tablas 4.7 y 4.8 se muestran los parámetros de tendencia central y la distribución respectivamente de las determinaciones de bisfenoles y ftalatos en las latas de conserva mejicanas.

**Tabla 4.7.** Parametros de tendencia central de las determinaciones de analitos en las latas de conserva mejicanas

Producto (ug/mL)	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
A Ftalico	24	1.375	9549.571	1537.384	2391.101
BFA	11	0.386	15.868	4.054	4.745
DEP	11	0.009	42.528	24.696	11.804
BADGE	1	2.709	2.709	2.709	--.
BiSDMA	1	126.196	126.196	126.196	--.
DBP	10	2.323	70.576	15.631	20.291
DOP	20	24.183	663.857	124.288	167.786

**Tabla 4.8.** Distribución de los analitos en las latas de conserva mejicanas

Producto(ug/mL)	N		Mediana	Moda	Asimetría	Error típ. de asimetría
	Válidos	Perdidos				
A Ftalico	24	1	368.936	1.375	2.115	0.472
BFA	11	14	2.300	0.387	1.959	0.661
DEP	11	14	23.580	0.009	-0.661	0.661
BADGE	1	24	2.710	2.710	--	--
BiSDMA	1	24	126.197	126.197		
DBP	10	15	7.824	2.323	2.659	0.687
DOP	20	5	73.448	24.184	2.617	0.512

### **4.1.3 Análisis de bisfenoles y ftalatos en latas de conserva españolas**

Hemos procedido a la identificación de los contaminantes químicos presentes en el agua destilada procedente de la esterilización de latas de conserva españolas. mediante el analisis cualitativo y cuantitativo por HPLC con detector de UV/V y fluorescencia. siguiendo la metodología cromatográfica desarrollada en el apartado de material y métodos. Todas las muestras han sido analizadas simultáneamente por espectrometría de masas para confirmar la presencia o ausencia de bisfenoles y ftalatos.

#### *4.1.3.1 Características de la muestra*

A continuación se describen las características de las latas de conserva mejicanas analizadas en este trabajo: El contenido ha sido: aceitunas. pimientos. mandarinas y naranjas y uvas. españolas procedentes del mercado mejicano y corresponden a diferentes marcas comerciales

1.- Conserva de aceitunas: ( Muestras: 1. 2. 3. 4. 7. 8. 9. 10. 11. 22. 23)

Ingredientes: aceitunas manzanilla. agua. relleno (anchoa. estabilizante. olignato sódico) potenciador del sabor. glutamato sódico. sal. acidulante: acido cítrico, pasteurizado.

Contenido neto: 352g (M: 1. 2. 3); 349g (M: 4. 7. 8); 301g (M: 9. 10);

347g (M: 11. 22. 23)

País de origen: España

2.- Conserva de pimientos: (Muestras: 12. 13. 18. 19. 20 y 21)

Ingredientes: pimiento entero asado. agua. sal y acidulante (acido cítrico).

Contenido neto: 185g (M: 12. 13. 18); 210g (M: 19. 20 y 21)

País de origen: España.

3.- Conserva de mandarinas y naranjas: ( Muestras: 14. 15. 16. y 17)

Ingredientes: gajos de mandarina y naranja. agua y azucar.

Contenido neto: 312g

País de origen: España.

4.- Conserva de uvas: ( Muestras: 5 y 6 )

Ingredientes: uvas. agua y azucar.

Contenido neto: 120g

País de origen: España.

5.- Conserva de Guisantes

Ingredientes: Guisantes, agua, sal y azúcar.

Contenido neto: 425g

País de origen: España.

6.- Conservas de espárragos: Tallos de espárragos blancos pelados

Ingredientes: Espárragos tallos, agua y sal.

Contenido neto: 390 g

País de origen: España.

7.- Conservas de Alcachofas

Ingredientes: Alcachofas cuarteadas, agua, sal y acidulante (Ácido cítrico) .

Contenido neto: 390 g

País de origen: España.

8.- Conservas de Espárragos trigueros

Ingredientes: Tallos y yemas de espárragos verdes sin pelar, agua y sal.

Contenido neto: 300 g

País de origen: España.

9.- Conservas de Champiñones

Ingredientes: Champiñones, agua y sal, Antioxidante(Ácido ascórbico) .

Contenido neto: 355g

País de origen: España.

10.- Conservas de Setas (rovellons enteros)

Ingredientes: Rovellons, agua y sal, Acidulante E-330.

Contenido neto: 390g

País de origen: España.

#### 4.1.3.2 Residuos de bisfenoles y ftalatos en las latas de conserva españolas

En la tabla 4.9 se recogen los datos correspondientes a las concentraciones de bisfenoles y ftalatos en las latas españolas analizadas

**Tabla 4.9 Muestras españolas: producto envasado latas de aceitunas**

Producto (ug/mL)	1	2	3	4	7	8	9	10	11	22	23
Ac. Ftálico	1693.204	50.361	380.126	955.195	17.096	10.400	657.000	--	195.938	666.140	29.378
BFA	3.08	--	--	2.33	15.08	--	1.68	--	--	--	3.15
DEP	--	18.152	--	--	16.114	--	15.326	--	--	17.675	--
BADGE	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
BFADM	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
DBP	--	--	8.162	--	--	7.323	6.115	--	8.726	--	3.718
DOP	218.799	57.554	185.198	126.386	154.618	--	--	126.696	856.115	78.297	245.769

**Tabla 4.10 Muestras españolas: productos envasados vegetales**

Producto (ug/mL)	Guisantes (24,25,26)	Alcachofas (27,28)	Espárragos (29,30)	Espárragos Trigueros (31)	Champiñones (32,33,34)	Setas (35,36)
Ac. Ftálico	500.134	28.362	325.165	286.333	168.126	391.51
BFA	2.41	16.99	2.80	16.07	54.37	6.38
DEP	-----	15.56	20.328	---	12.425	----
BADGE	----	----	0.56	--	0.326	----
BFADM	0.222	0.18	0.088	--	0.09	0.12
DBP	3.02	11.33	-----	--	----	15.862
DOP	133.512	223.561	351.283	869.332	515.128	900.332

**Tabla 4.11. Muestras españolas: conservas de pimientos**

Producto (ug/mL)	12	13	18	19	20	21
Ac. Ftálico	35.181	29.095	14.731	591786'40	34.512	2378.187
BFA	0.406	--	1.321	--	2.128	1.928
DEP	--	18.323	--	15.182	12.115	--
BADGE	--	--	--	--	--	--
BFADM	--	--	--	--	--	--
DBP	--	6.582	5.158	3.215	--	6.115
DOP	238.836	592.107	263.156	184235'50	1.6248	161.589

**Tabla 4.12. Muestras españolas: naranjas y mandarinas**

<b>Producto (ug/mL)</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>	<b>17</b>
Ac. Ftálico	27.770	393.544	307.541	307.541
BFA	--	0.353	0.528	0.224
DEP	--	--	--	--
BADGE	--	--	--	--
BFADM	0.981	--	--	--
DBP	--	--	--	--
DOP	516.546	598.814	522.042	522.042

**Tabla 4.13 Muestras españolas: uvas**

<b>Producto (ug/mL)</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
Ac. Ftálico	756.851	281.230
BFA	0.995	--
DEP	--	--
BADGE	--	--
BFADM	0.567	--
DBP	--	1.414
DOP	29.273	126.371

#### *4.1.3.3 Estadísticos descriptivos de la presencia de bisfenoles y ftalatos en las latas de conserva españolas*

En las tablas 4.14 y 4.15 se muestran los parámetros de tendencia central y la distribución respectivamente de las determinaciones de bisfenoles y ftalatos en las latas de conserva mejicanas.

Se muestra a continuación los parámetros de tendencia central de las determinaciones de bisfenoles y ftalatos en las latas de conserva españolas

**Tabla 4.14.** Parametros de tendencia central de las determinaciones de analitos en las latas de conserva españolas

<b>Producto (ug/mL)</b>	<b>N</b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>	<b>Media</b>	<b>Desv. típ.</b>
A Ftalico	28	10.400	2378.187	448.300	563.119
BFA (ug/mL)	17	0.406	54.370	7.743	13.239
DEP (ug/mL)	11	8.162	20.328	15.396	3.437
BADGE (ug/mL)	2	0.326	0.560	0.443	0.165
BiSDMA (ug/mL)	6	0.088	0.567	0.211	0.182
DBP (ug/mL)	12	1.414	15.862	6.548	3.990
DOP (ug/mL)	29	16.248	900.332	311.975	252.669

**Tabla 4.15.** Distribución de los analitos en las latas de conserva españolas

Producto (ug/mL)	N		Mediana	Moda	Asimetría	Error típ. de asimetría
	Válidos	Perdidos				
A Ftalico	28	1	296.937	10.400	2.061	0.441
BFA	17	12	2.410	0.406	3.069	0.550
DEP	11	18	15.560	8.162	-0.788	0.661
BADGE	2	27	0.443	0.326		
BiSDMA	6	23	0.150	0.088	2.017	0.845
DBP	12	17	6.115	6.115	1.178	0.637
DOP	29	0	223.561	16.249	1.170	0.434

## 4.2 ANÁLISIS DE BISFENOLES Y FTALATOS EN ENVASES PLÁSTICOS

### 4.2.1 Metodología analítica

Para el procesado del envase, lo primero se limpia correctamente su interior con agua. Una vez que esto se ha realizado, se le añade agua millipore hasta completar su capacidad. Se lleva a microondas durante 1 minuto. Posteriormente se toma una alícuota de 75 mL y se le añaden 20 mL de metanol. Se agita vigorosamente en una ampolla de decantación durante 10 minutos. Se le añade tres veces, 40 mL de cloroformo, se agita de nuevo 10 minutos y se centrifuga 15 minutos a 3000 rpm. Se toma la fase clorofórmica, donde debe estar el bisfenol-A, y se concentra en un rotavaporo a 40°C y presión reducida hasta un volumen final de 10 mL aproximadamente.

Este volumen se concentra de nuevo ahora en corriente de nitrógeno hasta un volumen final de 1 mL. Se le añaden 0.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se agita vigorosamente, y se lleva a centrifugar durante 10 minutos a 3000 rpm. Se aspira la fase orgánica y se concentra en corriente de nitrógeno hasta sequedad. Cuando se obtiene el residuo seco correspondiente, se solubiliza en 1 ml de metanol grado HPLC. Se analizan 20 µl de los extractos disueltos en metanol, por HPLC para la cuantificación de los posibles productos extraídos. La figura 4.2 muestra el cromatograma de un envase plástico con DEP y DOP.

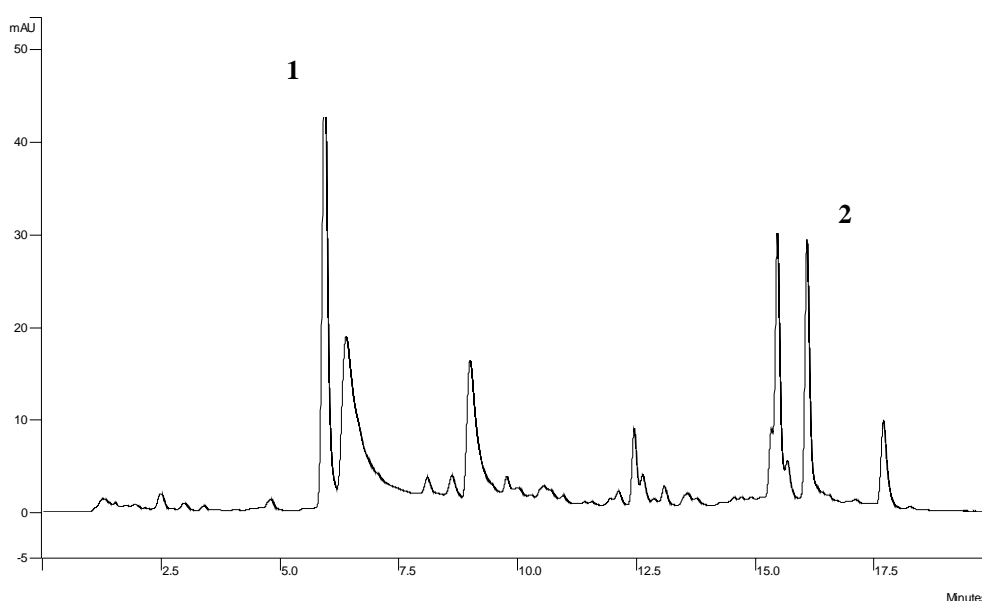


Figura 4.2. Cromatograma de HPLC con detector de uv de un envase plástico con DEP (1) y DOP. (2)



#### 4.2.2 Análisis de bisfenoles y ftalatos en envases plásticos mejicanos

Hemos procedido a la identificación de los contaminantes químicos presentes en el agua destilada procedente de los envases plásticos mejicanos, mediante el análisis cualitativo y cuantitativo por HPLC con detector de VU/V y fluorescencia, siguiendo la metodología cromatográfica desarrollada en el apartado de material y métodos. Todas las muestras han sido analizadas simultáneamente por espectrometría de masas para confirmar la presencia o ausencia de bisfenoles y ftalatos.

##### 4.2.2.1 Características de la muestra

Se adquirieron envases plásticos mejicanos utilizables en microondas, de acuerdo con las especificaciones indicadas en cada envase. También se adquirieron biberones esterilizables en el microondas según instrucciones del fabricante.

##### 4.2.2.2 Residuos de bisfenoles y ftalatos en los envases plásticos mejicanos, para microondas

En la tabla 4.16 se recogen los datos correspondientes a las concentraciones de bisfenoles y ftalatos en los envases plásticos mejicanos.

**Tabla 4.16.** Bisfenoles y ftalatos en envases plásticos mejicanos

<b>Producto (ug/mL)</b>	<b>1</b>	<b>12</b>	<b>17</b>	<b>18</b>
Ac. Ftálico	--	23.285	577.032	3251.425
BFA	1.453	2.156	--	1.923
DEP	--	--	--	--
BADGE	--	--	--	--
BFADM	24.210	--	--	--
DBP	1.186	--	3.128	--
DOP	--	75.819	--	57.024

##### 4.2.2.3 Estadísticos descriptivos de la presencia de bisfenoles y ftalatos en los envases plásticos, para microondas, mejicanos

En las tablas 4.8 y 4.9 se muestran los parámetros de tendencia central y la distribución respectivamente de las determinaciones de bisfenoles y ftalatos en las latas de conserva mejicanas.

**Tabla 4.17.** Parametros de tendencia central de las determinaciones de analitos en los envases plásticos mejicanos

Producto (ug/mL)	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
A Ftalico	3	23.285	3251.425	1283.914	1726.262
BFA	3	1.453	2.156	1.844	.358
DEP	0				
BADGE	0				
BiSDMA	1	24.210	24.210	24.210	.
DBP	2	1.186	3.128	2.157	1.373
DOP	2	57.024	75.819	66.421	13.290

**Tabla 4.18.** Distribución de los analitos en envases plásticos mejicanos

Producto(ug/mL)	N		Mediana	Moda	Asimetría
	Válidos	Perdidos			
A Ftalico	3	1	577.033	23.285	1.53
BFA	3	1	1.923	1.453	-0.94
DEP	0	4			
BADGE	0	4			
BiSDMA	1	3	24.210	24.210	
DBP	2	2	2.157	1.186	
DOP	2	2	66.422	57.024	

#### 4.2.2.4 Residuos de bisfenoles y ftalatos en los envases de yogur/nata mejicanos

En la tabla 4.19 se recogen los datos correspondientes a la concentraciones de bisfenoles y ftalatos en los envases de yogur/nata mejicanos

**Tabla 4.19a.** Bisfenoles y ftalatos en envases de yogur

Producto (ug/mL)	2	3	8	9	13	16	19
Ac. Ftálico	11507.32	--	4324.133	250.776	2894.973	491.164	89.140
BFA	1.2356	--	--	--	2.296	--	1.329
DEP	--	--	12.329	--	--	11.512	--
BADGE	1.9643	--	--	--	--	--	--
BFADM	147.3873	1.837	--	--	--	--	--
DBP	--	--	--	--	--	--	--
DOP	--	78.297	63.151	215.83	107251'30	40.8281	227.882

Tabla 19 b. Muestras mejicanas envases de nata

Producto (ug/mL)	10	11	14	15	20
Ac. Ftálico	1036.719	997.140	18.964	1330.809	3866.094
BFA	--	--	--	--	--
DEP	11.581	--	15.168	12.115	96.248
BADGE	--	--	--	--	--
BFADM	--	--	--	--	--
DBP	--	--	--	--	--
DOP	200.31	115.230	77.567	4.0125	--

#### 4.2.2.5. Estadísticos descriptivos de la presencia de bisfenoles y ftalatos en los envases de yogur/nata mejicanos

En las tablas 4.20 y 4.21 se muestran los parámetros de tendencia central y la distribución respectivamente de las determinaciones de bisfenoles y ftalatos en envases plásticos de alimentos lácteos mejicanos

**Tabla 4.20.** Parámetros de tendencia central de las determinaciones de analitos en los envases plásticos yogur/nata mejicanos

Producto (ug/mL)	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
A Ftalico	11	18.9643	11507.315	2420.657	3358.299
BFA	3	1.2356	2.296	1.620	.587
DEP	6	11.5120	96.248	26.492	34.200
BADGE	1	1.9643	1.964	1.964	.
BiSDMA	2	1.8377	147.387	74.612	102.919
DBP	0				
DOP	10	4.0125	227.882	113.035	77.074

**Tabla 4.21.** Distribución de los analitos en los envases de yogur/nata mejicanos

Producto (ug/mL)	N		Mediana	Moda	Asimetría	Error típ. de asimetría
	Válidos	Perdidos				
A Ftalico	11	1	1036.719	18.964	2.286	0.661
BFA	3	9	1.329	1.236	1.683	1.225
DEP	6	6	12.222	11.512	2.441	0.845
BADGE	1	11	1.964	1.964		
BiSDMA	2	10	74.613	1.838		
DBP	0	12				
DOP	10	2	92.774	4.013	0.419	0.687

#### 4.2.2.6. Residuos de bisfenoles y ftalatos en biberones mejicanos

En la tabla 4.22 se recogen los datos correspondientes a la concentraciones de bisfenoles y ftalatos en los biberones mejicanos

**Tabla 4.22** Bisfenoles y ftalatos en biberones mejicanos

Producto (ug/mL)	4	5	6	7	21	22
Ac. Ftálico	12.613	1.452	1773.305	22.054	914.863	3.062
BFA	1.569	0.548	--	--	1.032	--
DEP	--	--	--	--	--	--
BADGE	1.114	1.064	--	--	--	--
BFADM	3.573	0.741	--	--	--	--
DBP	--	8.817	--	--	--	--
DOP	--	859.823	--	37.754	63.575	78.125

#### 4.2.2.6. Estadísticos descriptivos de la presencia de biberones mejicanos

En las tablas 4.23 y 4.24 se muestran los parámetros de tendencia central y la distribución respectivamente de las determinaciones de bisfenoles y ftalatos en biberones mejicanos.

**Tabla. 4.23.** Parametros de tendencia central de las determinaciones de analitos en los biberones mejicano

Producto (ug/mL)	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
A Ftalico	6	1.452	1773.305	454.558	740.608
BFA	3	0.548	1.569	1.049	0.5107
DEP	0				
BADGE	2	1.064	1.114	1.089	0.035
BiSDMA	2	0.741	3.573	2.157	2.002
DBP	1	8.817	8.817	8.817	
DOP	4	37.754	859.823	259.819	400.350

**Tabla 4.24.** Distribución de los analitos en los biberones mejicanos

Producto (ug/mL)	N		Mediana	Moda	Asimetría	Error típ. de asimetría
	Válidos	Perdidos				
A Ftalico	6	0	17.334	1.453	1.506	0.845
BFA	3	3	1.032	0.548	0.155	1.225
DEP	0	6				
BADGE	2	4	1.090	1.065		
BiSDMA	2	4	2.157	0.742		
DBP	1	5	8.818	8.818		
DOP	4	2	70.850	37.755	1.990	1.014

#### 4.2.3 Residuos de bisfenoles y ftalatos en envases plásticos españoles

Se han identificado de los contaminantes químicos presentes en el agua destilada procedente de los envases plásticos españoles. mediante el analisis cualitativo y cuantitativo por HPLC con detector de uv/vis y fluorescencia. siguiendo la metodología cromatográfica desarrollada en el apartado de material y métodos. Todas las muestras han sido analizadas simultáneamente por espectrometría de masas para confirmar la presencia o ausencia de bisfenoles y ftalatos.

##### 4.2.3.1 Características de la muestra

Se adquirieron envases plásticos españoles utilizables en microondas. de acuerdo con las especificaciones indicadas en cada envase. También se adquirieron biberones esterilizables en el microondas según instrucciones del fabricante.

#### 4.2.3.2 Residuos de bisfenoles y ftalatos en los envases plásticos españoles. para microondas

En la tabla 4.25 se recogen los datos correspondientes a las concentraciones de bisfenoles y ftalatos en los envases plásticos españoles

**Tabla 4.25** Bisfenoles y ftalatos en envases plásticos españoles

Producto (ug/mL)	1	3	4	5	8	9
Ac. Ftálico	--	--	--	--	--	--
BFA	LD	--	L. D.	--	0.130	0.034
DEP	0.438	--	0.172	1.707	76.947	59.625
BADGE	--	--	--	--	--	--
BFADM	--	--	--	--	--	--
DBP	--	--	--	4.057	19.249	17.088
DOP	--	--	--	--	0.012	1.567

#### 4.2.3.3 Estadísticos descriptivos de la presencia de envases plásticos españoles

En las tablas 4.26 y 4.27 se muestran los parámetros de tendencia central y la distribución respectivamente de las determinaciones de bisfenoles y ftalatos en envases plásticos para microondas españoles.

**Tabla. 4.26.** Parametros de tendencia central de las determinaciones de analitos en los envases plásticos españoles

Producto (ug/mL)	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
A Ftalico	0				
BFA	4	0.010	0.130	0.046	0.057
DEP	5	0.172	76.947	27.778	37.487
BADGE	0				
BiSDMA	0				
DBP	3	4.057	19.249	13.464	8.218
DOP	2	0.012	1.567	0.790	1.099

**Tabla 4.27.** Distribución de los analitos en los envases plásticos españoles

Producto (ug/mL)	N		Mediana	Moda	Asimetría	Error típ. de asimetría
	Válidos	Perdidos				
A Ftalico	0	6				
BFA	4	2	0.022	0.010	1.779	1.014
DEP	5	1	1.708	0.173	0.728	0.913
BADGE	0	6				
BiSDMA	0	6				
DBP	3	3	17.088	4.057	-1.598	1.225
DOP	2	4	0.790	0.013		

#### 4.2.3.4 Residuos de bisfenoles y ftalatos en biberones españoles

En la tabla 4.28 se recogen los datos correspondientes a las concentraciones de bisfenoles y ftalatos en los biberones españoles

**Tabla 4.28** Bisfenoles y ftalatos en biberones españoles

Producto (ug/mL)	2	6	7	10	11	12	13	14	15
Ac. Ftálico	75.140	19.435	25.285	-	--	--	--	--	--
BFA	LD	0.150	0.230	0.110	1.63	1.80	1.17	1.25	1.268
DEP	0.365	134.222	58.918	1.32	0.709	6.20	8.96	11.25	--
BADGE	--	--	--	--	--	--	--	--	--
BFADM	--	--	--	0.677	1.09	0.53	0.537	0.56	0.642
DBP	0.556	--	16.305	6.11	6.62	4.67	6.19	2.753	0.380
DOP	--	0.212	0.304	-	0560	--	--	3.890	--

#### 4.2.3.5 Estadísticos descriptivos de la presencia de biberones españoles

En las tablas 4.29 y 4.30 se muestran los parámetros de tendencia central y la distribución respectivamente de las determinaciones de bisfenoles y ftalatos en biberones españoles

**Tabla. 4.29.** Parametros de tendencia central de las determinaciones de analitos en los biberones españoles

Producto(ug/mL)	N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. típ.
A Ftalico	3	19.435	75.140	39.953	30.612
BFA	8	0.110	1.800	0.951	0.685
DEP	8	0.365	134.222	27.743	47.173
BADGE	0	--	--	--	--
BiSDMA	6	0.530	1.090	0.672	0.212
DBP	8	0.380	16.305	5.448	5.038
DOP	4	0.212	3.890	1.241	1.771

**Tabla 4.30.** Distribución de los analitos en los biberones españoles

Producto(ug/mL)	N		Mediana	Moda	Asimetría	Error típ. de asimetría
	Válidos	Perdidos				
A Ftalico	3	7	25.286	19.435	1.661	1.225
BFA	8	2	1.210	0.110	-0.290	0.752
DEP	8	2	7.580	0.365	2.101	0.752
BADGE	0	10	--	--	--	--
BiSDMA	6	4	0.600	0.530	2.052	0.845
DBP	8	2	5.390	0.380	1.511	0.752
DOP	4	6	0.432	0.212	1.959	1.014

### 4.3. COMPARACION DE LA MIGRACION DE COMPONENTES DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS

Uno de los objetivos de trabajo planteado es conocer si existen diferencias en la migración de monómeros y aditivos, según la procedencia de los envases y según el uso a que se dedican los mismos.

El tratamiento estadístico inferencial que se ha estado oportuno ha consistido en la aplicación de los test de comparación de medias

#### 4.3.1 COMPARACIONES LATAS MEJICANAS VS LATAS ESPAÑOLAS

Tabla 4.31. Comparación de valores medios entre muestras mejicanas y españolas

Producto (ug/mL)	Tipo de muestra	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A Ftalico	Latas mejicanas	24	1537.384	2391.101	488.081
	Latas españolas	28	448.301	563.119	106.420
BFA	Latas mejicanas	11	4.054	4.746	1.431
	Latas españolas	17	7.744	13.239	3.211
DEP	Latas mejicanas	11	24.696	11.804	3.559
	Latas españolas	11	15.397	3.438	1.037
BADGE	Latas mejicanas	1	2.710	.	.
	Latas españolas	2	0.443	0.165	0.117
BiSDMA	Latas mejicanas	1	126.197	.	.
	Latas españolas	6	0.211	0.182	0.074
DBP	Latas mejicanas	10	15.632	20.291	6.417
	Latas españolas	12	6.548	3.991	1.152
DOP	Latas mejicanas	20	124.288	167.787	37.518
	Latas españolas	29	311.976	252.669	46.919

Tabla 32 .Test de Comparación de medias. Prueba T para muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas				
		F	Sig.	t	Gl	Sig. (bilateral)
A Ftalico (ug/mL)	Se han asumido varianzas iguales	17.404	0.000	2.339	50	0.023
	No se han asumido varianzas iguales			2.180	25.190	0.039
BFA (ug/mL)	Se han asumido varianzas iguales	2.624	0.117	-.883	26	0.385
	No se han asumido varianzas iguales			-1.050	21.622	0.305
DEP (ug/mL)	Se han asumido varianzas iguales	8.808	0.008	2.509	20	0.021
	No se han asumido varianzas iguales			2.509	11.684	0.028
BADGE (ug/mL)	Se han asumido varianzas iguales	.	.	11.185	1	0.057
	No se han asumido varianzas iguales			.	.	.
BiSDMA (ug/mL)	Se han asumido varianzas iguales	.	.	640.397	5	0.000
	No se han asumido varianzas iguales			.	.	.
DBP (ug/mL)	Se han asumido varianzas iguales	5.295	0.032	1.523	20	0.143
	No se han asumido varianzas iguales			1.393	9.581	0.195
DOP (ug/mL)	Se han asumido varianzas iguales	5.379	0.025	-2.905	47	0.006
	No se han asumido varianzas iguales			-3.124	46.961	0.003



### 4.3.2 COMPARACION BIBERONES ESPAÑOLES VS BIBERONES MEJICANOS

**Tabla 33.** Comparación de medias muestras biberones españoles vs mejicanos

	Tipo de muestra	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A Ftalico (ug/mL)	Biberón Mejico	6	454.559	740.608	302.352
	Biberón español	3	39.954	30.613	17.674
BFA (ug/mL)	Biberón Mejico	3	1.050	0.511	0.295
	Biberón español	8	0.951	0.685	0.242
DEP (ug/mL)	Biberón Mejico	0	.	.	.
	Biberón español	8	27.743	47.173	16.678
BADGE (ug/mL)	Biberón Mejico	2	1.090	0.035	0.025
	Biberón español	0	.	.	.
BiSDMA (ug/mL)	Biberón Mejico	2	2.157	2.002	1.416
	Biberón español	6	0.672	0.213	0.087
DBP (ug/mL)	Biberón Mejico	1	8.818	.	.
	Biberón español	8	5.448	5.039	1.782
DOP (ug/mL)	Biberón Mejico	4	259.820	400.351	200.175
	Biberón español	4	1.242	1.772	0.886

**Tabla 34.** Test de Comparación de medias. Prueba T para muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas				Sig. (bilateral)
		F	Sig.	t	Gl	
A Ftalico (ug/mL)	Se han asumido varianzas iguales	7.178	0.032	0.936	7	0.380
	No se han asumido varianzas iguales			1.369	5.034	0.229
BFA (ug/mL)	Se han asumido varianzas iguales	1.783	0.215	0.224	9	0.828
	No se han asumido varianzas iguales			0.259	4.966	0.806
BiSDMA (ug/mL)	Se han asumido varianzas iguales	135.719	0.000	2.165	6	0.074
	No se han asumido varianzas iguales			1.047	1.008	0.484
DBP (ug/mL)	Se han asumido varianzas iguales	.	.	0.630	7	0.548
	No se han asumido varianzas iguales			.	.	.
DOP (ug/mL)	Se han asumido varianzas iguales	8.859	0.025	1.292	6	0.244
	No se han asumido varianzas iguales			1.292	3.000	0.287

### 4.3.3 COMPARACIÓN ENVASES PLÁSTICOS ESPAÑOLES VS MEJICANOS

**Tabla 35.** Comparación envases plásticos españoles vs mejicanos

Producto	Tipo de muestra	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
A Ftálico (ug/mL)	EPM	3	1283.914	1726.263	996.658
	EPE	0	.	.	.
BFA (ug/mL)	EPM	3	1.844	0.358	0.207
	EPE	4	0.046	0.057	0.029
DEP (ug/mL)	EPM	0	.	.	.
	EPE	5	27.778	37.487	16.765
BADGE (ug/mL)	EPM	0	.	.	.
	EPE	0	.	.	.
BiSDMA (ug/mL)	EPM	1	24.210	.	.
	EPE	0	.	.	.
DBP (ug/mL)	EPM	2	2.157	1.373	0.971
	EPE	3	13.465	8.219	4.745
DOP (ug/mL)	EPM	2	66.422	13.290	9.398
	EPE	2	0.790	1.100	0.778

EPM: envase plástico Mejicano; EPE: envase plástico español

**Tabla 36.** Test de Comparación de medias. Prueba T para muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas F		t	gl	Sig. (bilateral)
		Sig.				
BFA (ug/mL)	Se han asumido varianzas iguales	7.403	0.042	10.202	5	0.000
	No se han asumido varianzas iguales			8.615	2.077	0.012
DBP (ug/mL)	Se han asumido varianzas iguales	5.920	0.093	-1.833	3	0.164
	No se han asumido varianzas iguales			-2.335	2.163	0.135
DOP (ug/mL)	Se han asumido varianzas iguales	1.2+ E16	0.000	6.960	2	0.020
	No se han asumido varianzas iguales			6.960	1.014	0.089

# **DISCUSIÓN**

## **5. DISCUSIÓN**

Para dar respuesta a los objetivos planteados en el contenido del presente trabajo, se han desarrollado estudios de carácter experimental, mediante los cuales definiremos, la capacidad contaminante de los compuestos a analizar, realizando una serie de pasos importantes, para llegar a la conclusión final.

Para ello se eligió como primer punto, las técnicas de laboratorio efectuadas, que tienen como base la puesta a punto del método, con el cual se trabajó en este contexto. Lo cual requiere una estandarización de una serie de parámetros cruciales para su reproducibilidad.

El presente trabajo tiene entre sus objetivos, la detección y determinación de contaminantes que migran de los envases contenedores a los alimentos. Por ello, para confirmar la presencia de un contaminante se ha considerado importante disponer de una técnica de espectrometría de masas, que permita la identificación del producto. El análisis de los mismos requirió la preparación de las disoluciones estándar de cada producto en metanol, las cuales fueron utilizadas en la optimización de las condiciones de trabajo, para la detección de estas moléculas, obteniéndose de este modo los espectros correspondientes.

El método de cromatografía desarrollado en este estudio, presenta unos resultados de alta reproducibilidad para los productos analizados. Para la realización de estos ensayos, se tomaron valores medios de concentración según la sensibilidad del detector para cada una de las moléculas observadas. Para el caso particular de los compuestos que se analizan en el presente trabajo, se comenzó determinando las curvas de calibrado para cada uno de los productos, en las cuales se obtuvieron valores de coeficiente de calibración lineal ( $r^2$ ) en el total de las gráficas de 0.98, lo que da la idea de la exactitud de las mismas. Estos parámetros nos permiten la deducción de las ecuaciones matemáticas, aplicables al análisis cuantitativo de muestras en la que se haya detectado la presencia de estas moléculas.

La reproducibilidad de los datos para los bisfenoles y ésteres de ftalatos es buena, con desviaciones estándar no superiores al 0.5 %: para todos los productos estudiados.

El factor de respuesta, deducido para las condiciones de trabajo, permite simplificar el análisis cuantitativo se a utilizado para el cálculo de la concentración de cualquiera de estas moléculas en muestras contaminadas. El resto del tratamiento estadístico, aplicado al análisis cromatográfico para cada producto, muestra la exactitud y coherencia de dicho método.

Por otro lado, el estudio de puesta a punto del método de cromatografía líquida, se ha deducido el límite de detección experimental para cada una de las sustancias (tablas 3.4 y 3.5) oscilando entre los 0.8 y 200 ng/mL. Este margen es debido a la distinta sensibilidad del detector, y en función a la estructura química de las moléculas que se están estudiando. Es importante resaltar, que tanto las curvas de calibrado como los límites de detección se han realizado para cada uno de los productos estudiados, a aquella longitud de onda para la cual el detector presentó mayor sensibilidad, es decir a 270 y 280 nm.

Una vez establecidas las condiciones de trabajo para la determinación de los compuestos a analizar, se pasó a la definición de un método eficiente para la extracción de los monómeros de interés. Se seleccionaron los disolventes orgánicos el que se consideraron más adecuados para el trabajo que nos ocupa estos fueron: alcohol metílico y cloroformo. En base a los trabajos de investigación revisados. Tras la estandarización del método de extracción líquido-líquido, se realizaron las extracciones necesarias. Los datos numéricos en cuento a los resultados de recuperación se muestran en torno al 80-90% para las muestras ensayadas. Estos valores de rendimiento son

concordantes con los resultados presentados por varios autores (Tann y col., 1992; Seidel y col., 1993; Thompson y col., 1999)

Así mismo, la metodología anteriormente descrita, resulta útil para la extracción de este tipo de monómeros de muestras sencillas. Se plantea dificultad cuando las muestras a analizar sean de naturaleza más compleja. Para todos estos casos y según la muestra de partida, se habrá de desarrollar un método que consiga una homogenización de la misma y posterior extracción de los productos, que garantice una mayor recuperación.

Para el aislamiento y determinación de las moléculas de los bisfenoles y ésteres de ftalatos, que pudieran estar presentes en los recubrimientos de las latas y en los envases plásticos, resultado de la migración de los mismos hacia el líquido de cobertura del alimento, se procedió a su análisis según el apartado de material y métodos en este caso, dado que las muestras no presentaron una naturaleza que pudiera producir excesivas interferencias, el proceso de purificación quedó reducido simplemente a la adición de ácido sulfúrico, para la eliminación de la materia orgánica.

Independientemente de la naturaleza de la muestra, las técnicas de extracción y purificación, y el posterior tratamiento cromatográfico, resulta un en forma global un buen tratamiento para las muestras.

Todo el trabajo de investigación desarrollado hasta este punto, tiene como finalidad comprobar que la hipótesis enunciada como base de este estudio, tiene un sustento real. Si se puede comprobar la presencia de contaminantes disruptores endocrinos en distintos medios naturales relacionados con el ser vivo, como es el caso de los alimentos en conserva y los recipientes contenedores de los mismos. Es de suponer, una vez revisada la bibliografía que antecede al trabajo y ante la elevada información sobre la ubicuidad de estos productos, que un gran número de muestras naturaleza nuestro alcance, podrían estar contaminadas con uno o varios de estos compuestos. En consecuencia y como primer paso, se han analizado muestras de conservas vegetales enlatadas, de diferentes tipos, marcas comerciales, calidades y sitios de procedencia, con el fin de determinar la estrogenicidad de las mismas.

Para la determinación de bisfenoles y esterres de ftalatos en latas de conserva, se analizaron 24 latas de diversos alimentos en conserva de México y 36 de España, según la técnica descrita en el apartado de métodos. Una vez que fueron extraídas y purificadas las muestras, fueron inyectadas en el cromatógrafo HPLC, tras la medición por triplicado de la totalidad de las muestras, se efectuaron los cálculos de las

concentraciones de los compuestos presentes en cada una de las muestras, resultando del orden de ug/mL de muestra.

Una vez que se hubo identificado y determinado la presencia de estos compuestos en las latas y envases plásticos para conserva de alimentos, la incógnita a resolver era encontrar el origen, así como, las razones de su presencia en las muestras.

Se pudo demostrar que tanto los bisfenoles como los ésteres de ftalatos provienen tanto de los barnices que recubren el interior de las latas de conserva de alimentos, como del material con el que están hechos los envases de uso culinario. Como ya se comentó en la bibliografía que nos precede, los bisfenoles y los ésteres de ftalatos son los monómeros principales que utilizan en la elaboración de estos envases ya sea para dar dureza en el caso de los bisfenoles o flexibilidad en el caso de los ésteres de ftalatos, como compuestos presentes en las epoxiresinas y en los plásticos. Hoy en día, estos materiales son de uso muy generalizado en un gran número de envases para productos alimenticios. La polimerización de estos compuestos para la obtención final de estos productos no ocurre con un 100% de efectividad, quedando en la mayoría de los casos un porcentaje del monómero libre. Por lo expuesto anteriormente, es lógico pensar que tanto los bisfenoles como los ftalatos migren y sea posible localizarlos en el líquido de cobertura de éstos alimentos. Más aun, se ha estudiado la migración por efecto de la temperatura, incluso a temperaturas relativamente bajas de 40-60 °C desde hace tiempo y se pueden determinar. (Paseiro y col., 1993). En el caso de los alimentos enlatados, la mayoría de los métodos de elaboración, utilizan el proceso de pasteurización o bien esterilización que en la mayoría de los casos resulta imprescindible, para el buen tratamiento tecnológico, alcanzándose temperaturas superiores a los 100 °C. Por otro lado, la mayoría de los envases plásticos que se usan para el envasado de diferentes alimentos (yogurt, nata, etc.) son reutilizados por las amas de casa para el almacenaje, refrigerado y posteriormente para el recalentado de alimentos dentro del horno de microondas, por lo que son sometidos a temperaturas elevadas.

Es de suponer que la polimerización incompleta de estos compuestos durante la elaboración de las resinas plásticas, unido a la ruptura de estos polímeros o la liberación del monómero atrapado tras los procesos a altas temperaturas durante el proceso tecnológico del producto, sean dos razones para que se facilite la migración de estos compuestos desde el barniz protector de los enlatados y los envases plásticos hasta el líquido de gobierno y en definitiva hasta el alimento.

Otro hecho que puede confirmar la migración de estos monómeros al interior del líquido de contenido en el envase, ha sido la demostración del fenómeno en envases alimentarios tratados con autoclave, como se indica en el apartado de resultados demostró de este trabajo, la naturaleza de las muestras es muy variada: latas de guisantes, chiles jalapeños, aceitunas, pimientos, etc....Los envases vacíos se sometieron a un proceso de esterilización (121 ° C/30 minutos). En el caso de los envases plásticos, estos fueron llevados al horno de microondas durante 3 minutos aproximadamente o hasta que se produjera la ebullición. Siguiendo con la técnica se analizaron un total de 25 muestras de productos enlatados mexicanos, 23 de alimentos enlatados españoles, así como, 22 envases plásticos de diferentes tamaños y estilos (biberones, fiambreras, envases de nata, etc....) de origen mexicano y 9 de origen español, de aquí se deduce, o que cualquier molécula que parezca tras la extracción, deberá de proceder del barniz de recubrimiento de las latas o del material usado para la elaboración de los envases plásticos.

Por cromatografía líquida se analizaron los extractos y se observó la aparición de los diferentes picos conforme a los tiempos de retención establecidos y comprobados previamente.

La gran ubicuidad de los productos en estudio, así como su marcada estabilidad y persistencia, hacen que la accesibilidad de los mismos a los seres vivos y en particular al hombre, sea un hecho más que aceptado. Si a estas propiedades le añadimos su carácter lipofílico, y la probada estrogenicidad, la cuestión que se plantea es discernir hasta que punto el ser humano soporta una carga estrogénica superior a la que debiera



# **CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

El análisis de los resultados presentados en este trabajo junto con la revisión de las publicaciones científicas referentes a la migración de monómeros y aditivos plásticos de envases alimentarios, nos han permitido enunciar las siguientes conclusiones:

1. Se ha desarrollado un método original de cromatografía líquida de alta resolución, en fase reversa y con detector ultravioleta, que ha permitido la determinación de bisfenoles y ftalatos, componentes habituales de materiales en contacto con los alimentos
2. Las condiciones cromatográficas utilizadas para el análisis de bisfenoles y ftalatos en las muestras de estudio han dado lugar, en todos los casos, a picos de bisfenoles y ftalatos bien separados y resueltos de otros picos de sustancias presentes en dichas muestras
3. Los métodos analíticos utilizados para el análisis de bisfenoles y ftalatos se han validado atendiendo a los aspectos de linealidad, recuperación, precisión, exactitud y estabilidad, límite de detección, límite de cuantificación y selectividad. También se han realizado controles de calidad internos y externos (estudios interlaboratorio). Se han

obtenido en todos los casos resultados aceptables según los objetivos de validación preestablecidos

4. Los métodos de extracción, purificación y detección de bisfenoles y ftalatos utilizados en el presente trabajo han ofrecido buenos resultados de recuperación y bajos límites de detección en todos los envases estudiados

5. El contaminante más frecuentemente encontrado en las latas de conserva de origen mejicano y español ha sido el ácido ftálico, con valores medios de concentración de 1537.3 y 493.3  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente.

6. De las muestras de envases plásticos analizadas, el 8 % presentan concentraciones de bisfenol A superiores al límite de detección. Ninguna de las muestras ha superado el nivel máximo más estricto regulado en la legislación.

# **BIBLIOGRAFÍA**

## 7- BIBLIOGRAFIA

Afshari A.; Gunnarsen L.; Clausen P. A.; Hansen V. "Emission of phthalates from PVC and other materials". *Indoor Air*. 14 (2). 120-8. (2004).

Aranda, M. Página Web "Disruptores Endocrinos". <http://disruptor.ugr.es/>.

Arenholt-Bindslev D.; Breinholt V.; Preiss A; Schalmalz. "Time-related bisphenol A content and estrogenic activity in saliva samples collected in relation to placement of fissure sealants". *Clin Oral Investig*. 3(3): 120-5. (1999).

Ashari A.; Gunnarsen L.; Clausen P. A.; Hansen V. "Emission of phthalates from PVC and other materials". *Indoor Air*. 14 (2). 120-8. 2004.

Asociación de fabricantes químicos (CMA)-Panel de Esteres de Ftalatos, pags en internet.

Aurela B.; Kulmala H.; Soderhjelm L."Phthalates in paper board packaging and migration into Tenax and sugar". *Food Addit Contam*. 16(12): 571-7. (1999).

Babich MA, Chen SB, Greene MA, Kiss CT, Porter WK, Smith TP, Wind ML, Zamula WW. "Risk assessment of oral exposure to diisononyl phthalate from children's products". *Regul Toxicol Pharmacol*. 40(2):151-67. (2004).

Beck H. N.. "Solubility characteristics of tetrabromobisphenol-A polycarbonate in various liquids". *Ind Eng Chem Res* 31: 2628-2631. (1992).

Beck IC, Bruhn R, Gandrass J. "Analysis of estrogenic activity in coastal surface waters of the Baltic Sea using the yeast estrogen screen". *Chemosphere*. 2; [Epub ahead of print] (2005).

Bedding N. D., McIntyre A. E., Perry E., Lester J. N. "Organic contaminants in the aquatic environment". I. Sources and occurrence. *Sci. Total Environ*. 25: 143-167 (1982)

Bosnir J, Puntaric D, Skes I, Klaric M, Simic S, Zoric I. "Migration of phthalates from plastic products to model solutions". *Coll Antropol*.;27 Suppl 1:23-30. (2003)

Braunrath R, Cichna M. "Sample preparation including sol-gel immunoaffinity chromatography for determination of bisphenol A in canned beverages, fruits and vegetables". *J Chromatogr A*. 14;1062(2):189-98. (2005).

Braunrath R, Podlipna D, Padlesak S, Cichna-Markl M. "Determination of bisphenol A in canned foods by immunoaffinity chromatography", HPLC, and fluorescence detection. *J Agric Food Chem*.16;53(23):8911-7. (2005).

Brede C, Fjeldal P, Skjevraak I, Herikstad H. "Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing". *Food Addit Contam*.;20(7):684-9. (2003).

Brotos J.A, Olea Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N. "Xenoestrógenos released from laquer coating in food cans". *Health Perspect*. 103(6):608-612 (1995)

Brotos J.A, Pérez P, Olea Serrano F, Novillo Fertell A, Villalobos M, Olea N, "Contaminación de alimentos enlatados con monómeros de epoxiresinas. Comprobación del efecto estrogénico". 97-104. (1995)

Brunel, S. Riesgos para la maternidad y la reproducción: un problema específico para las mujeres". Resumen de ponencias de la Jornada "Disruptores Hormonales: un nuevo reto Ambiental" Ciclo de Invierno de Ciencia y Tecnología, Fundación General Universidad Complutense. Madrid, ISTAS. (2001) "

Bustamante-Montes L. P.; Lizama-Soberanis B.; Vázquez Moreno F.; García Fabila M. M.; Core-Téllez K. S.; Olaiz-Fernández G.; Borja-Aburto V. H. "Infant exposure to potentially toxic plasticizers in products for oral use". *Salud Pública Mexicana*. 46(6): 501-8. (2004).

Casajuana N, Lacorte S. "New methodology for the determination of phthalate esters, bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether, and nonylphenol in commercial whole milk samples". *J Agric Food Chem*. 16;52(12):3702-7. (2004)

Castle L.; Mayo A.; Gilbert J.; "Migration of plasticizers from printing inks into foods". 6(4): *Food Addit Contam*. 437-43. (1989).

Center for Bioenvironmental Research "Environmental Estrogens and Other Hormones" Louisiana, Tulane and Xavier Universities. (2002)

Climie IJ, Hutson DH, Stoydin G. "Metabolism of the epoxy resin component 2,2-bis[4]-(2,3-epoxypropoxy)phenyl]propane, the diglycidyl ether of bisphenol A (DGEBA) in the mouse. Part I. A comparison of the fate of a single dermal application and of a single oral dose of <sup>14</sup>C-DGEBA. *Xenobiotica*". 11(6):391-9. (1981).

Climie IJ, Hutson DH, Stoydin G. "Metabolism of the epoxy resin component 2,2-bis[4-(2,3-epoxypropoxy)phenyl]propane, the diglycidyl ether of bisphenol A (DGEBA) in the mouse. Part II. Identification of metabolites in urine and faeces following a single oral dose of <sup>14</sup>C-DGEBA. *Xenobiotica*".;11(6):401-24. (1981)

Climie, I.J. G., Hutson, D.H., Stoydin, G. "Metabolism of the epoxy resin component 2,2-bis(4-(2-3 epoxipropoxy)phenil)propane, the diglicil ether of bisphenol A (DGEBA) in the mouse". *Xenobiótica.*, 11(6); 401-424. (1981).

Colborn, T. y C. Clement, "Chemically Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife-Human Connection", Princeton Scientific Publishing, Princeton, New Jersey. .eds.(1992).

Colburn, T., Myers, J. P. y Dumanoski, D. "Nuestro Futuro Robado ¿Amenazan las sustancias químicas sintéticas nuestra fertilidad, inteligencia y supervivencia?" Madrid, Ecoespaña Editorial. (2001)

Comisión de las Comunidades Europeas COM 262 final. "Comunicación de la Comisión al Consejo y al Parlamento Europeo. Aplicación de la estrategia comunitaria en materia de alteradores endocrinos sustancias de las que se sospecha interfieren en los sistemas hormonales de seres humanos y animales". Bruselas, (2001)

Comisión de las Comunidades Europeas COM88 final "Libro Blanco. Estrategia para la futura política en materia de sustancias y preparados químicos". Bruselas, Comisión de las Comunidades Europeas. (2001)

Comisión técnica COTEC "Plastivida Argentina. Esteres de ftalatos: su relación con el PVC y sus diferentes aplicaciones". Boletín técnico informativo No. 14. 1-16. (2002).

Comité Científico de Toxicidad, Ecotoxicidad y Medio Ambiente (CSTEE) de la Comisión Europea, página en internet.

Cray Ch., "The Pop's treaty", *Rachels Enviroment & Healt Weekly.*, 601: (1998).

Criado MV, Fernandez Pinto VE, Badessari A, Cabral D. "Conditions that regulate the growth of moulds inoculated into bottled mineral water". *Int J Food Microbiol.* 1;99(3):343-9. (2005).

Directiva 2002/72/DE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios. ("DOCE" núm. L 71, de 10 de Marzo del 2004, pág. 8).

Directiva 2004/19/CE de la Comisión, de 1 de Marzo de 2004, por la que se modifica la Directiva 2002/72/CE relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios DOCE L 71, 10-3-2004

El PVC y los plastificantes”, Asociación Argentina de PVC, abril 1999.

Enciclopedia de “Salud y Seguridad Ocupacional”, Vol. 2, Oficina Internacional de trabajo, Ginebra, Suiza.(2002).

Environmental Protection Agency “Endocrine Disruptor Screening Program Report to Congress”. (2002)

Estrucplan On Line - [www.estrucplan.com.ar](http://www.estrucplan.com.ar), ( 2000).

European Comision, Joint Research Centre, Institute for Healt and Consumer Protection European Chemicals Bureau, 4,4-isopropylidenediphenol (Bisphenol A), CAS No. 80-05-7, EINECS No. 201-245—8, Risk Assesment Report, U. E., (2003).

Feldman D. “Estorgen from plastic Are we being exposed?”*Endocrinol* 138: 1777-1779, (1997).

Freire MT, Santana IA, Reyes FG. “Plasticizers in Brazilian food-packaging materials acquired on the retail market”. *Food Addit Contam.* 23(1):93-9. (2006)

Goodson A. Summerfield W. Cooper I. “Survey of bisphenol A and bisphenol F in canned foods”. *Food Addit Contam.* 19(8): 796-802. (2002).

Gray TJ, Gangolli SD. “Aspects of the testicular toxicity of phthalate esters”. *Environ Health Perspect.*; 65:229-35. (1986).

Hammarling, L., Gustavsson, H., Svensson, K., Oskarsson, A., “Migration of bisphenol-A diglycidyl ether (BADGE) and its reaction products in canned foods. *Food Additives and Contaminants*”, 17, 937-943. (2000).

Hanaoka T, Kawamura N, Hara K, Tsugane S. “Urinary bisphenol A and plasma hormone concentrations in male workers exposed to bisphenol A diglycidyl ether and mixed organic solvents”. *Occup Environ Med.*; 59(9):625-8. (2002).

Hardin y cols. 1981. Citados por “Dutch expert commitee on occupational standards. A committee of the healt cuncil of the netherlands.bisfenol A and its diglycidylether.gezondheidsrrad”, postbus, 90517, 2509 L.M. Den Haag. (1995)

Hashimoto Y., Moriguchi Y., Oshima H., Nishikawa J., Nishiara T., Nakamura M., “Estrogenyc activy of chemicals for dental and similar use in vitro”. *J. Mater. Sci. Med.* 11(8): 464-468 (2002).

Hauser R.; Duty S.; Godfrey Bailley L.; Calafat A. M. “ Medications as a source of human exposure to phthalates”. *Environ Healt Perspect.* 112(6):751-3. (2004).



Hauser R.; Meeker J. D.; Park S.; Silva M. J.; Calafar A. M. "Temporal variability of urinary phthalate metabolite levels in men of reproductive age". *Environ Health Perspect.* 112(7): 1734-40. (2004).

Henriks-Eckerman M. L., Laijoki T. "Determination of oligomer 340 and polyamines in cured epoxy resins by extraction and high performance liquid chromatography. *Analyst*"; 113: 239-243. (1988).

Hiroi H, Tsutsumi O, Takeuchi T, Momoeda M, Ikezaki Y, Okamura A, Yokota H, Taketani Y. "Differences in serum bisphenol A concentrations in premenopausal normal women and women with endometrial hyperplasia". *Endocr J.*;51(6):595-600. (2004)

Holmes M.J.; Hart A.; Northing P.; Oldring P.K. Castle L.; Stott D. Smith G; Wardman O. "Dietary exposure to chemical migrants from food contact materials a probabilistic approach". *Food Addit Contam.* 22(10): 907-19. (2005).

Howirtz W, Britton P, Chirtel S, " A Simple Method for Evaluating data from an Interlaboratory Study". *Journal of AOAC International* ; 81(6): 1257-1265. (1998).  
<http://www.som.tulane.edu/cbr/ecme/eehome/default.html>.

Huber WW, Grasl-Kraupp B, Schulte-Hermann R. "Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate in rodents and its implications on human risk". *Crit Rev Toxicol.* 26(4):365-481. (1996)

Hutson JM, Graystone JE, Egami K, Fowler R, Cheek DB. "Compensatory renal growth in the mouse. II. The effect of growth hormone deficiency". *Pediatr Res.*;15(10):1375-80. (1981)

Hutson JM, Holt AB, Egami K, Niall M, Fowler R, Cheek DB. "Compensatory renal growth in the mouse. I. Allometric approach to the effect of age". *Pediatr Res.*;15(10):1370-4. PMID: 7301459 (1981)

IISD, "The Second Session of the International Negotiating Committee for an International Legally Binding Instrument for Implementing International Action on Certain Persistent Organic Pollutants (POPS)": 25-29 January 1999. "A Brief History of the POPs Negotiations", *Earth Negotiations Bulletin*, 1 de febrero de 1999

Inoue K, Yamaguchi A, Wada M, Yoshimura Y, Makino T, Nakazaw H. "Quantitative detection of bisphenol A and bisphenol A diglycidyl ether metabolites in human plasma by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry". *J Chromatogr B. Biomed Sci Appl.* 25;765(2):121-6. (2001)

Jenke DR. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation parameters. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* ; 19(5): 737-757. (1996).

Kang JH, Kito K, Kondo F. "Factors influencing the migration of bisphenol A from cans". *J Food Prot.*;66(8):1444-7. (2003)

Kang JH, Kondo F. Bisphenol A migration from cans containing coffee and caffeine. *Food Addit Contam.* 19(9):886-90 (2002).

Koo H. J.; Lee B. M.; "Human monitoring of phthalates and risk assessment". *J: Toxicol. Environ Health A.* 68(16): 1372-92. (2005).

Koop "Seguridad de los ftalatos usados en los juguetes para niños y en dispositivos médicos", Consejo Americano de Ciencias y Salud /ACSH).

Krishnan, A.V., Stathis, P, Permmunth, S.F., Tokes, L. Feldman, D. "Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving". *Endocrinology* 132: 2279-2286. (1993).

Kuroda N, Kinoshita Y, Sun Y, Wada M, Kishikawa N, Nakashima K, Makino T, Nakazawa H. "Measurement of bisphenol A levels in human blood serum and ascitic fluid by HPLC using a fluorescent labeling reagent". *J Pharm Biomed Anal.* 15;30(6):1743-9. (2003).

Lemen J.G., arends R.J., Van Der Saag P.T., Van Der Burg B., "In vivo imaging of activated estrogen receptors in utero by estrogens and bisphenol A". *Environ. Health Perspect.* 112(15): 1544-9 (2004).

Long G. L., Winffordner J. D. "Limit of detection". A closer look at the IUPAC definition. *Anal. Chem.* 55: 712-724. (1983).

Mac Dougall D., Amore F. J., Cox G. V. Crosby D. G., "Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry." *Anal. Chem.* 52:2242-2249. (1980).

Majima T, Tsujiuchi T, Tsutsumi M, Tsunoda T, Konishi Y. "Mutations of K-ras but not p53 genes in biliary duct and pancreatic duct carcinomas induced in hamsters by cholecystoduodenostomy with dissection of the common duct followed by N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine". *Cancer Lett.* 16;118(1):47-53. 1(997).

Moore R W., Rudy T A , Lin T. M., Ko K., PETERSON r. E., "Abnormalities OF sexual development in male rats with in ytero and lactational exposure to the antiandrogenic plasticizer di(2-ethylhexyl) phthalate". *Environ. Health. Perspect.* 109:229-237. (2001).

Morrissey, R. E., George, J.D., Price, C.J., Tyl, R.W., Marr, M.C., Kimmel, C.A. "the developmental toxicity of bisphenol A in rats and mice". *Fundam Appl Toxicol*, 8: 571-582. (1987).

Mortensen G. K.; Main K: M.; Anderson A: M.; LeffersH.; Skakkebaek N. E. "Determination of phthalate monoesters in human milk, consumer milk, and infant formula by tandem mass spectrometry (LC-MS-MS)". *Anal Bioanal. Chem.* 382(4): 1084-92. (2005).

Mungia López EM, Lugo S, Peralta E, Bolumen S, Soto-Valdez H. "Migration of bisphenol A (BPA) from can coatings into a fatty-food simulant and tuna fish". *Agric Food Chem.* 4;50(25): 7299-302. Publications. High Quality, High Impact. (2002).

Mylchreest E, Cattley RC, Foster PM. "Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to Di(n-butyl) phthalate: an antiandrogenic mechanism?" *Toxicol Sci.*;43(1):47-60. (1998).

Olea MF. "Estrogenic Xenobiotics: A goal for the Funtional Toxicology." 37:2; 183-196, (1996).

Olea N.,Pulgar R., Pérez P., Olea-Serrano F., Rivas A., Novillo-Fertrell A.,Pedraza V.,Soto A., Sonnenssssschein C.: "Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry". *Eviron healt perspec*, aceptado en prensa. (1995).

Olea N.; Pulgar R.; Pérez P: " Estrogenicity of resin based composites and sealants used in dentistry" *Environ Healt Perspect.* 104:298-305. (1996).

Olea, N. "La exposición a disruptores endocrinos". Ponencias del Curso de Verano de El Escorial. "Riesgo Tóxico Protección Ambiental, Salud Laboral Y Seguridad Alimentaria". Fundación General de la Universidad Complutense de Madrid 30 de julio - 3 de agosto de 2001.

Ozaki A.; Yamaguchi Y; Okamoto A.; Hawai N. "Determination of alkylphenols, bisphenol A, benzophenone and phthalates in containers of baby food, and migration into food simulants". *Shokuhim Eiseigaku Zasshi.*43(4): 260-6. (2002).

Page B. D.; Lacroix G. M.; "Studies into transfer and migration of phthalate esters from aluminium foil-paper laminates to butter and margarine". *Food Addit Contam.* 9(3): 197-212. (1992).

Page B.D. Lacroix G.M. « The ocurrence of phthalate ester and di-2-ethyl adipate plasticizers in Canadian pakaking and food sampled in 1985-1989: a survey". *Food Addit Contam.* 12(1): 129-51. (1995).

Paseiro L. P.; López M: P.; Vázquez O. L. ; Simal L: J: ; Simal G: J: "Sensitive and rapad reserved-phase liquid chomtography-fluorescence method for determining bisphenol A disglycidyl ether in aqueous-based food simulants" *J: Assoc. Off Anal. Chem.* 74; 925-930. (1989).

Paseiro L. P.; Paz A. S.; Simal L: J;; Simal G: J; López M: P.; "Kinetic of hydrolysis of bisphenol F diglycidyl ether in water-based food simulants. Comparison with bisphenol A diglycidyl ether". *J. Agric.Food Chem.* 40 868-872 (1992).

Paseiro L. P.; Paz A. S.; Simal L: J;; Simal G: J; López M: P.; "Kinetic of hydrolysis of bisphenol F diglycidyl ether (BADGE) in water-based food simulants". *Fresenius J: Anal. Chem.* 345; 527-532. (1993).

Paseiro L. P.; Paz A. S.; Vázquez O. L. ; Simal L: J: ; Simal G: J: “Determination of residual free monomers (m-xilylenediamine and bisphenol A diglycidyl ether) in the finished product”. J. of chromatography; 585; 75-81.(1991).

Pérez M., Broto F., Cornellas L., Díaz-Ferrero J. “Estudio de la concentración de di(etilhexil) ftalato en hemoderivados almacenados en bolsas de PVC.” Libro de abstracts de la V Conferencia Nacional de Disruptores Endocrinos. Madrid (2001).

Pérez P., Pulgar R., Olea\_serrano M.F., Villalobos M., Rivas A., Metzler M., Pedraza V., Olea N.”The estrogenicity of bisphenol A related diphenylalkanes with various substitutes at central carbon and the hidroxy groups. Environ. Healt Perspect. 106.167-174 (1998).

Petersen J. H.; Breidahl T.; “Plasticizers in total diet samples, baby food and infant formulae”. Food Addit Contam. 17(2): 133-41. (2000).

Propuesta de REGLAMENTO DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos y se modifican la Directiva 1999/48/CE y el Reglamento (CE) {sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes} Propuesta de DIRECTIVA DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO por la que se modifica la Directiva 67/548/CEE del Consejo para adaptarla al Reglamento (CE) del Parlamento Europeo y del Consejo relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos.

Pulgar Encinas R.; Composites y selladores dentales: Análisis cromatográfico y demostración de actividad estrogénica. Tesis Doctoral. Universidad de Granada. (1996).

Pulgar; Olea-Serrano M. F.; Novilo-Fertrell A, Rivas A.; Pérez P.; Olea N. “Determination of bisphenol A and oligomers in dental epoxy resins by high performance liquid chromatography” . Environ Healt Perspect . (1997).

.....

Real Decreto 211/1992, sobre las listas permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos, destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo. (BOE 72, de 24 Marzo 1992).

Real Decreto 397/1990 de 16 de marzo del Ministerio. de relaciones con las Cortes y de la Secretaria del Gobierno "aprueba las condiciones generales de los materiales par uso alimentario distinto de los poliméricos" (BOE n 74 de 27-III-1990).

Reddy JK, Reddy MK, Usman MI, Lalwani ND, Rao MS. “Comparison of hepatic peroxisome proliferative effect and its implication for hepatocarcinogenicity of phthalate esters, di(2-ethylhexyl) phthalate, and di(2-ethylhexyl) adipate with a hypolipidemic drug”. Environ Health Perspect.; 65:317-27. (1986).

Reed y cols. 1985 Citados por “Dutch expert committee on occupational standards. A committee of the healt cuncil of the netherlands.bisfenol A and its diglycidylether.gezondheidsrrad”, postbus (1995), 90517, 2509 L.M. Den Haag.

Reid, E.E.; Wilson, "The relation of estrogenic activity". *J. Am. Chem. Soc.* 66, 967-969. (1994).

Rivas A., Lacroix M., Olea-Serrano F., Laios I., Leclercq G., Olea N. "Estrogenic effect of a series of bisphenol analogues on gene and protein expression in MCF-7 breast cancer cells". *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 82: 45-53 (2002).

Rivas A.; Olea N.; Olea-Serrano M. F. "Human exposure to endocrine -disrupting chemicals: assessing the total estrogenic xenobiotic burden. *TRAC* 16:613-619. (1997).

Saito I. Ueno E. Oshima H. Matsumoto H. "Levels of phthalates and adipates in processed foods and migration of di-isononyl adipate from polyvinyl chloride film into foods". *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*; 43(3): 185-9. (2002).

Sajiki J, Takahashi K, Yonekubo J. "Sensitive method for the determination of bisphenol-A in serum using two systems of high-performance liquid chromatography". *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 24;736(1-2):255-61. (1999).

Satoh K., Ohshima K., Aoki N, Iida M., Nagai F., "Study on antiandrogenic effects of bisphenol A diglycidyl ether (BADGE), Bisphenol F diglycidyl ether (BFDGE) and their derivatives using cells stably transfected with human androgen receptor, AR-EcoScreen". *Food Chem. Toxicol.* 42(6): 1458-65 (1999).

Schaefer A.; Simat T.J.; "Migration from can coatings: part 3. Synthesis, identification and quantification of migrating epoxy-based substances below 1000 Da." *Food Addit Contam.* 21(4): 390-405. (2004).

Schamitz G.; Preiss A.; Arenholt-Bindslev D. "Bisphenol A content of resin monomers and related degradation products". *Clin Oral Investig.* 3(3): 114-9. (1999).

Seidel V., Lindner W., "Universal sample enrichment technique for organochlorine pesticides in environmental and biological samples using a redesigned simultaneous steam distillation-solvent extraction apparatus". *Anal. Chem.* 65; 3677-3683, (1993).

Sharman M.; Read W. A.; Castle L.; Gilbert J. "Levels of di-(2-ethyl) phthalate esters in milk, cream, butter and cheese". *Food Addit Contam.* 11(3): 375-85. (1994).

Siddiqui A, Srivastava SP. "Effect of di(2-ethylhexyl)phthalate administration on rat sperm count and on sperm metabolic enzymes". *Bull Environ Contam Toxicol.*; 48(1):115-9. (1992 )

Silva M.J.; Barr D.B.; Reidy J.A.; Malek N.A.; Hodge C. C.; Caudill S. P.; Brock J. W.; Needham L. L.; Calafat A. M. "Urinary levels of seven phthalate metabolites in the U. S. Population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2000". *Environ Health Perspect.* 112(5): A270. (2004).

Simal G. J; Paseiro L. P.; Paz A. S.; Simal L. J.; "Determination of bisphenol A and F in noncured epoxy resins by RP-HPLC-fluorescence techniques". *J. Of Chromatographic Science*. 31; 450-455. (1993).

Simoneau C, Theobald A, Hannaert P, Roncari P, Roncari A, Rudolph T, Anklam E. "Monitoring of bisphenol-A-diglycidyl-ether (BADGE) in canned fish in oil. *Food Addit Contam.*;16(5):189-95. (1999).

Summerfield W.; Cooper I. "Investigation of migration from paper and board into food-development of methods for rapid testing". *Food Addit Contam.* 18(1): 77-88. (2001).

Sumpter JP, Jobling S. "Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment" *Environ Health Perspect.*;103 Suppl 7:173-8. Review. (1995).

Sumpter JP. Feminized responses in fish to environmental estrogens. *Toxicol Lett.*;82-83:737-42. (1995).

Takeuchi T, Tsutsumi O, Ikezuki Y, Takai Y, Taketani Y."Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction". *Endocr J.*; 51(2):165-9. (2004).

Tan G. H., "Comparison of solvent extraction and solid-phase extraction for the determination of organochlorine pesticide residues in water". *Analyst*. 117; 1129-1132. (1992).

ThompsonM., Ellison S.L., Fajgelj A., Wilets P., Wood R., "Harmonised guidelines for de use of recovery information in anlytical measurement. *Pure & Appl. Chem*; 71(2): 337-348. (1999).

ThompsonM., Ellison S.L., Wood R., "Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *IUPAC. Pure Appl. Chem.*; 74(5): 835-855. (2002).

Thomson BM, Grounds PR. Bisphenol A in canned foods in New Zeland: an exposure assessment. *Food Addit Contam.* 22(1):65-72. (2005).

Tsumura Y.; Ishimitsu S.; Nakamura Y.; Yoshii K.; Tonogai Y. "Contents of eleven phthalates and di(2-ethylhexyl) adipate in retail packed lunches after prohibition of DEHP containing PVC gloves for cooking purposes" *Shokuhim Eiseigaku Zasshi*. 42(2): 128-32.(2001).

Tsutsumi O. "Assessment of human contamination of estrogenic endocrine-disrupting chemicals and their risk for human reproduction". *J Steroid Biochem Mol Biol.*;93(2-5):325-30. (2005).

Yano K. Hirosawa N.; Sakamoto Y.; Katayama H.; Moriguchi T.; Asakola K. "Phthalates levels in baby milk powders sold in several countries". *Bull Environ Contam Toxicol*. 74(2): 373-9. (2005).

Yano K.; Hirosawa N.; Sakamoto Y.; Katayama H.; Moriguchi T.; Young K. E.; sheen Y. Y.; Asaoka K. "Phthalate levels in Beverages in Japan and Korea". *Bull Environ Contam. Toxicol.* 68:463-469. (2002).

Ye X, Kuklennyik Z, Needham LL, Calafat AM. "Quantification of urinary conjugates of bisphenol A, 2,5-dichlorophenol, and 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone in humans by online solid phase extraction-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry". *Anal Bioanal Chem*;383(4):638-44. (2005).

Yoshida T, Horie M, Hoshino Y, Nakazawa H." Determination of bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography". *Food Addit Contam.* 18 (1): 69-75. (2001).