

~~9. Proov. 24/115~~  
T 7 129

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha ..... 21/03/01 .....  
ENTRADA NUM. .... 1443 .....

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA  
GRANADA  
N.º Documento b13387030  
N.º Copia 115869957



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
09 MAR. 2001  
COMISION DE DOCTORADO

**CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE BISFENOL A  
Y COMPUESTOS RELACIONADOS EN MUESTRAS  
AMBIENTALES Y FLUIDOS BIOLÓGICOS POR  
ESPECTROFLUORIMETRÍA Y CROMATOGRFÍA DE  
GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

**TESIS DOCTORAL**

**Alberto Zafra Gómez**

**Granada, 2001**

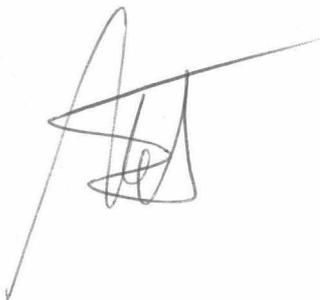
**CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE BISFENOL A Y  
COMPUESTOS RELACIONADOS EN MUESTRAS AMBIENTALES Y  
FLUIDOS BIOLÓGICOS POR ESPECTROFLUORIMETRÍA Y  
CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

por

**Alberto Zafra Gómez**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA  
UNIVERSIDAD DE GRANADA**

VISADA en Granada a 9 de  
Marzo de 2001.

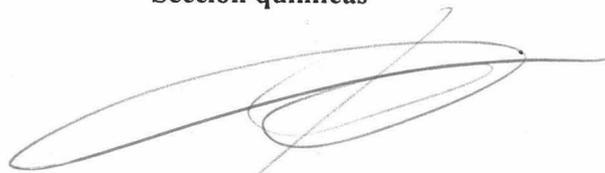


Fdo. Prof. Dr. José Luis  
Vilchez Quero, Catedrático  
del Departamento de Química  
Analítica de la Universidad de  
Granada

MEMORIA presentada para  
aspirar al Grado de Doctor en  
Ciencias, Sección Químicas.



Fdo.- Alberto Zafra Gómez  
Licenciado en Ciencias  
Sección químicas



Fdo. Dra. Monsalud del Olmo  
Iruela. Profesora Titular del  
Departamento de Química  
Analítica de la Universidad de  
Granada

Mi mas sincero agradecimiento a todas aquellas personas que en algún momento colaboraron con su ayuda, apoyo o amistad a la realización de esta Memoria de Doctorado.

A Esther

## ÍNDICE

OBJETO DE LA TESIS .....	1
INTRODUCCIÓN.....	5
1. BISFENOLES Y COMPUESTOS RELACIONADOS. SÍNTESIS Y PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS.....	7
1.1. Síntesis de los compuestos .....	10
1.1.1. Síntesis de los bisfenoles.....	10
1.1.1.1. Condensación de fenol con acetona o formaldehído .....	10
1.1.1.2. Condensación de fenol con otros compuestos.....	11
1.1.1.3. Purificación de los compuestos .....	12
1.1.2. Síntesis de los diglicidiléteres.....	13
1.1.2.1. Empleo de una disolución al 25 % de hidróxido sódico en agua .....	14
1.1.2.2. Empleo de sales de amonio cuaternario.....	14
1.1.3. Síntesis de los policarbonatos.....	15
1.1.4. Síntesis de los metacrilatos.....	16
1.1.4.1. Síntesis del bis-GMA .....	16
1.1.4.2. Síntesis del bis-DMA .....	17
1.2. Propiedades físicas .....	18
1.3. Propiedades químicas .....	19
1.3.1. Reacción de alquilación .....	19
1.3.2. Reacción de cianometilación.....	19
1.3.3. Reacción con epóxidos.....	19
1.3.4. Reacción con dihaluros .....	20
1.3.5. Reacción de sustitución.....	20
1.3.6. Esterificación con ácidos orgánicos.....	21
1.3.7. Reacción de hidrogenación .....	21
1.3.8. Otras reacciones.....	21
2. APLICACIONES DE LOS BISFENOLES Y COMPUESTOS RELACIONADOS. FUENTES DE EXPOSICIÓN HUMANA.....	22
2.1. Resinas epoxi: Fabricación y aplicaciones.....	23
2.2. Plásticos policarbonato: Fabricación y aplicaciones.....	24
2.3. Composites y selladores dentales: Aplicaciones médicas .....	25
2.4. Exposición ambiental.....	28

3.	ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE BISFENOLES Y DERIVADOS .....	30
3.1.	Definición de disrupción endocrina.....	30
3.2.	Definición de estrógeno .....	32
3.3.	Tests para la determinación de la actividad estrógenica .....	37
3.3.1.	Test de cornificación vaginal.....	37
3.3.2.	Test de incremento del peso uterino.....	38
3.3.3.	Test del enlace competitivo con el receptor estrogénico .....	38
3.3.4.	Tests de expresión génica e inducción de proteínas.....	38
3.3.4.1.	Test de la vitelogenina.....	39
3.3.4.2.	Test de lactoferrina .....	39
3.3.4.3.	Ensayo CAT .....	39
3.3.5.	Ensayos estrógeno dependientes. Ensayo de E-Screen. ....	40
3.4.	Efectos de la exposición a estos compuestos.....	41
3.4.1.	Reducciones temporales en la calidad y cantidad de semen.....	41
3.4.2.	Cáncer testicular .....	42
3.4.3.	Malformaciones congénitas.....	42
3.4.4.	Alteraciones en los porcentajes de sexos.....	42
3.4.5.	Cáncer de mama en mujeres.....	43
3.4.6.	Efectos neurológicos.....	43
3.4.7.	Alteraciones genéticas .....	43
3.4.8.	Otros efectos posibles .....	44
4.	ANÁLISIS DE BISFENOLES Y COMPUESTOS RELACIONADOS .....	45
4.1.	Métodos cromatográficos.....	46
4.1.1.	Cromatografía de gases.....	46
4.1.2.	Cromatografía de líquidos.....	48
4.1.3.	Cromatografía en capa fina (TLC).....	50
4.2.	Métodos espectroscópicos.....	50
CAPITULO I. EXPERIMENTAL: REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN.....		53
1.	DISOLUCIONES, REACTIVOS Y DISOLVENTES EMPLEADOS .....	55
1.1.	Disoluciones.....	55
1.2.	Reactivos empleados en la determinación de actividad estrogénica .....	58
1.3.	Reactivos de silanización.....	59



1.2.3.1. Datos sin tratar .....	88
1.2.3.2. Datos centrados respecto de la media .....	88
1.2.3.3. Datos autoescalados y centrados respecto de la media .....	89
1.2.4. Selección del número óptimo de factores .....	89
1.2.5. Calidad en el ajuste del modelo .....	91
1.2.5.1. Coeficiente de correlación o detección .....	91
1.2.5.2. Desviación estándar media residual (DEMR) .....	91
1.2.5.3. Error relativo de predicción (ERP) .....	92
1.2.5.4. Detección de muestras desechables .....	92
2. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS QUÍMICO .....	93
2.1. Comparación de dos rectas de regresión y ensayos de recuperación .....	93
2.1.1. Test de comparación de dos rectas de regresión .....	93
2.1.1.1. Comparación de las varianzas de ambos calibrados .....	93
2.1.1.2. Comparación de pendientes .....	94
2.1.1.3. Comparación de los términos independientes .....	96
2.1.2. Ensayos de recuperación .....	97
2.2. Metodología de adición de patrón .....	98
2.2.1. Comprobación de la exactitud del método .....	98
CAPÍTULO III. APLICACIONES DE LA ESPECTROFLUORIMETRÍA AL ANÁLISIS DE BISFENOLES Y COMPUESTOS RELACIONADOS .....	103
1. INTRODUCCIÓN .....	105
1.1. Empleo de medios organizados en fluorimetría .....	106
1.2. Empleo de disolventes no acuosos. Microextracción líquido-líquido .....	110
1.2.1. Microextracción líquido-líquido .....	111
1.2.1.1. Dispositivos empleados para microextracción .....	113
1.2.1.2. Comparación con otras técnicas separativas .....	118
1.3. Propuesta de trabajo .....	120
2. DETERMINACIÓN ESPECTROFLUORIMÉTRICA DE BISFENOL A EN AGUAS MEDIANTE FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN .....	122
2.1. Comportamiento fluorescente del bisfenol A en presencia de $\beta$ -ciclodextrina. Establecimiento de los parámetros instrumentales .....	122
2.1.1. Espectros de excitación y emisión del complejo de inclusión formado. Selección de las	

longitudes de onda de medida .....	122
2.1.2. Rendijas de excitación y emisión .....	124
2.2. Optimización de variables experimentales. Establecimiento de constantes .....	125
2.2.1. Influencia de la concentración de $\beta$ -ciclodextrina. Cálculo de la estequiometría y constante de formación del complejo de inclusión.....	125
2.2.1.1. Método de Benesi-Hildebrand.....	127
2.2.1.2. Método de Scatchard.....	130
2.2.2. Influencia del pH del medio. Cálculo de la constante de acidez del complejo.....	131
2.2.3. Influencia de la fuerza iónica del medio sobre la señal fluorescente.....	135
2.2.4. Influencia de la temperatura sobre la señal fluorescente .....	137
2.3. Resumen de la optimización de variables.....	139
2.4. Parámetros analíticos .....	139
2.4.1. Establecimiento y verificación del modelo .....	139
2.4.2. Parámetros de calidad del método analítico.....	141
2.4.2.1. Rango dinámico lineal y linealidad.....	141
2.4.2.2. Límites de detección y cuantificación .....	142
2.4.2.3. Precisión .....	143
2.4.2.4. Sensibilidad.....	143
2.4.2.5. Resumen de los parámetros analíticos.....	143
2.5. Estudio de interferencias .....	144
2.5.1. Composición de las aguas objeto de estudio.....	144
2.5.1.1. Agua de pozo.....	144
2.5.1.2. Agua de río .....	145
2.5.1.3. Agua de mar .....	145
2.5.2. Estudio de interferentes.....	145
2.5.3. Eliminación de los nitratos presentes en la muestra.....	152
2.5.3.1. Cantidad de resina .....	152
2.5.3.2. Fracción de muestra tomada para las medidas de fluorescencia .....	153
2.6. Aplicaciones y validación del método .....	154
2.6.1. Calibrados con adición de patrón .....	154
2.6.2. Comparación de los calibrados con patrones y adición de patrón.....	155
2.6.3. Estudios de recuperación.....	156
3. DETERMINACIÓN DE BISFENOL A EN PRESENCIA DE FENOL MEDIANTE ESPECTROFLUORIMETRÍA DERIVADA, PREVIA MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO .....	158

3.1. Comportamiento fluorescente de bisfenol A y fenol en éter etílico. Establecimiento de los parámetros instrumentales .....	158
3.1.1. Espectros fluorescentes de bisfenol A y fenol en éter etílico.....	158
3.1.2. Establecimiento de las longitudes de onda analíticas.....	160
3.1.3. Rendijas de excitación y emisión.....	163
3.2. Optimización de variables experimentales.....	163
3.2.1. Influencia del volumen de disolvente.....	164
3.2.2. Estudio de la agitación del sistema .....	165
3.2.2.1. Tipo de agitador.....	166
3.2.2.2. Tiempo de agitación .....	168
3.2.2.3. Velocidad de agitación.....	169
3.2.3. Tiempo de separación de las fases .....	171
3.2.4. Influencia del pH sobre el rendimiento del proceso de extracción.....	171
3.2.5. Influencia de la temperatura.....	173
3.2.6. Resumen de la optimización de variables .....	175
3.3. Parámetros analíticos .....	175
3.3.1. Establecimiento y verificación del modelo.....	175
3.3.1.1. Función de calibrado para un volumen de 100 ml .....	176
3.3.1.2. Función de calibrado para un volumen de 250 ml .....	177
3.3.1.3. Función de calibrado para un volumen de 500 ml .....	178
3.3.1.4. Comparación de la sensibilidad de los distintos volúmenes.....	180
3.3.2. Independencia de la señal analítica emitida por el bisfenol A con la concentración de fenol.....	182
3.3.3. Parámetros de calidad del método analítico .....	184
3.3.3.1. Rango dinámico lineal y linealidad .....	184
3.3.3.2. Límite de detección y cuantificación.....	185
3.3.3.3. Precisión.....	185
3.3.3.4. Sensibilidad .....	186
3.3.3.5. Resumen de los parámetros analíticos.....	186
3.4. Estudio de interferencias.....	187
3.5. Aplicaciones y validación del método.....	197
3.5.1. Resolución de mezclas sintéticas .....	198
3.5.2. Calibrados con adición de patrón .....	199
3.5.3. Comparación de los calibrados con patrones y adición de patrón.....	200
3.5.4. Ensayos de recuperación.....	201

4.	DETERMINACIÓN ESPECTROFLUORIMÉTRICA DE TRAZAS DE FENOL, BISFENOL A, Y BISFENOL A DIGLICIDIL ÉTER EN MEZCLAS, PREVIA MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO, HACIENDO USO DE CALIBRACION MULTIVARIANTE (PLS).....	203
4.1.	Comportamiento fluorescente de fenol, bisfenol A y bisfenol A diglicidil éter en éter etílico. Establecimiento de los parámetros instrumentales .....	203
4.2.	Optimización de variables experimentales .....	205
4.2.1.	Estudio del procedimiento de microextracción líquido-líquido .....	206
4.2.1.1.	Influencia del tiempo de agitación .....	206
4.2.1.2.	Influencia de la velocidad de agitación .....	207
4.2.2.	Influencia del pH del medio .....	209
4.3.	Parámetros analíticos .....	210
4.3.1.	Verificación de la linealidad.....	211
4.3.2.	Establecimiento de la matriz de calibración.....	212
4.3.3.	Selección del modelo de calibración.....	214
4.3.4.	Predicción.....	216
4.4.	Aplicación del método de calibración multivariante PLS-1 a la resolución de mezclas en aguas de distinta procedencia.....	219
CAPÍTULO IV. APLICACIONES DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS AL ANÁLISIS DE BISFENOLES Y COMPUESTOS RELACIONADOS.....		223
1.	INTRODUCCIÓN.....	225
1.1.	Parámetros instrumentales .....	226
1.1.1.	Parámetros instrumentales del cromatógrafo de gases.....	226
1.1.1.1.	Parámetros instrumentales que afectan al sistema de inyección.....	226
1.1.1.2.	Parámetros instrumentales que afectan a la separación cromatográfica .....	228
1.1.2.	Parámetros instrumentales del espectrómetro de masas .....	229
1.1.2.1.	Análisis en modo SCAN.....	229
1.1.2.2.	Análisis en modo SIM (Selected Ion Monitoring) .....	232
1.2.	Derivatización de compuestos hidroxilados. Silanización .....	234
1.3.	Estrategia de trabajo .....	237
2.	IDENTIFICACIÓN DE LOS CLORODERIVADOS DEL BISFENOL A EN AGUAS CLORADAS. PROPIEDADES ESTROGÉNICAS.....	238
2.1.	Caracterización de los compuestos mediante CG-EM.....	239

2.1.1. Espectro de masas de los compuestos silanizados .....	241
2.2. Variables experimentales que afectan a la cloración del bisfenol A.....	246
2.2.1. pH del medio .....	246
2.2.2. Concentración de cloro y tiempo de reacción.....	248
2.3. Síntesis de los compuestos clorados (P2000/02432).....	251
2.3.1. Cloración del bisfenol A .....	252
2.3.2. Separación por cromatografía en capa fina .....	252
2.3.3. Aislamiento por cromatografía líquida en columna.....	253
2.4. Identificación de los compuestos .....	254
2.4.1. Espectrometría de masas.....	255
2.4.1.1. Cromatogramas y espectros de masas de los compuestos clorados.....	255
2.4.1.2. Abundancias isotópicas. ....	259
2.4.2. Resonancia magnética nuclear de <sup>13</sup> C y de <sup>1</sup> H.....	262
2.5. Estudios biológicos. Determinación de la actividad estrogénica .....	264
3. DETERMINACIÓN DE BISFENOL F, BISFENOL A Y SUS CORRESPONDIENTES DIGLICIDIL ETER EN AGUAS RESIDUALES POR CROMATOGRAFIA DE GASES- ESPECTROMETRIA DE MASAS.....	267
3.1. Caracterización de los compuestos mediante CG-MS .....	267
3.1.1. Espectro de masas del antraceno deuterado.....	269
3.1.2. Espectros de masas de los compuestos objeto de estudio.....	270
3.2. Optimización de variables experimentales.....	275
3.2.1. Variables del proceso de derivatización .....	276
3.2.1.1. Elección del reactivo de silanización.....	276
3.2.1.2. Tiempo de agitación de la muestra.....	277
3.2.2. Variables que afectan a la extracción líquido-líquido .....	281
3.2.2.1. Elección del disolvente orgánico.....	282
3.2.2.2. Fuerza iónica y volumen de disolvente orgánico .....	283
3.2.2.3. Influencia del tiempo de agitación .....	285
3.2.2.4. Tiempo de separación de las fases.....	287
3.2.2.5. Influencia del pH.....	288
3.2.3. Resumen de las variables experimentales optimizadas .....	290
3.3. Parámetros analíticos .....	290
3.3.1. Establecimiento y verificación del modelo.....	290
3.3.2. Parámetros de calidad del método .....	293
3.3.2.1. Rango dinámico lineal y linealidad .....	293

3.3.2.2. Límite de detección y cuantificación.....	294
3.3.2.3. Precisión.....	295
3.3.2.4. Sensibilidad.....	296
3.3.2.5. Resumen de los parámetros analíticos.....	296
3.4. Aplicación y validación del método.....	297
3.4.1. Calibrados con patrones, adición de patrón y Youden.....	298
3.4.2. Comprobación de la exactitud del método.....	299
3.4.2.1. Parámetros del bisfenol F silanizado.....	299
3.4.2.2. Parámetros del bisfenol A silanizado.....	302
3.4.2.3. Parámetros del bisfenol F diglicidiléter.....	304
3.4.2.4. Parámetros del bisfenol A diglicidiléter.....	306
4. DETERMINACIÓN DE TRIETILENGLICOL DIMETACRILATO (TEGDMA), BISFENOL A, BISFENOL A DIMETACRILATO (BIS-DMA) Y BISFENOL A DIGLICIDIL DIMETACRILATO (BIS-GMA) EN SALIVA HUMANA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	309
4.1. Caracterización de los compuestos mediante CG-MS. Establecimiento del método cromatográfico.....	310
4.1.1. Cromatogramas y espectros de masas de los compuestos.....	312
4.1.1.1. Espectro de masas del bisfenol F (patrón interno).....	314
4.1.1.2. Espectro de masas de los compuestos objeto de estudio.....	314
4.1.2. Establecimiento del modo SIM.....	319
4.2. Optimización de variables experimentales.....	319
4.2.1. Volumen de acetonitrilo.....	320
4.2.2. Temperatura y tiempo de secado de la muestra.....	321
4.2.3. Tipo de agitación.....	322
4.2.4. Tipo de disolvente orgánico y tiempo de redisolución.....	323
4.2.5. Volumen de disolvente orgánico.....	325
4.2.6. Resumen de las variables experimentales.....	326
4.3. Parámetros analíticos.....	327
4.3.1. Establecimiento y verificación del modelo.....	327
4.3.2. Parámetros de calidad del método.....	330
4.3.2.1. Rango dinámico lineal y linealidad.....	330
4.3.2.2. Límite de detección y cuantificación.....	330
4.3.2.3. Precisión.....	332
4.3.2.4. Sensibilidad.....	333
4.3.2.5. Resumen de los parámetros analíticos.....	333

---

4.4. Aplicación y validación del método propuesto.....	334
4.4.1. Calibrado con patrones, adición de patrón y Youden.....	334
4.4.2. Comprobación de la exactitud del método .....	335
CONCLUSIONES.....	340

**OBJETIVO DE LA MEMORIA**

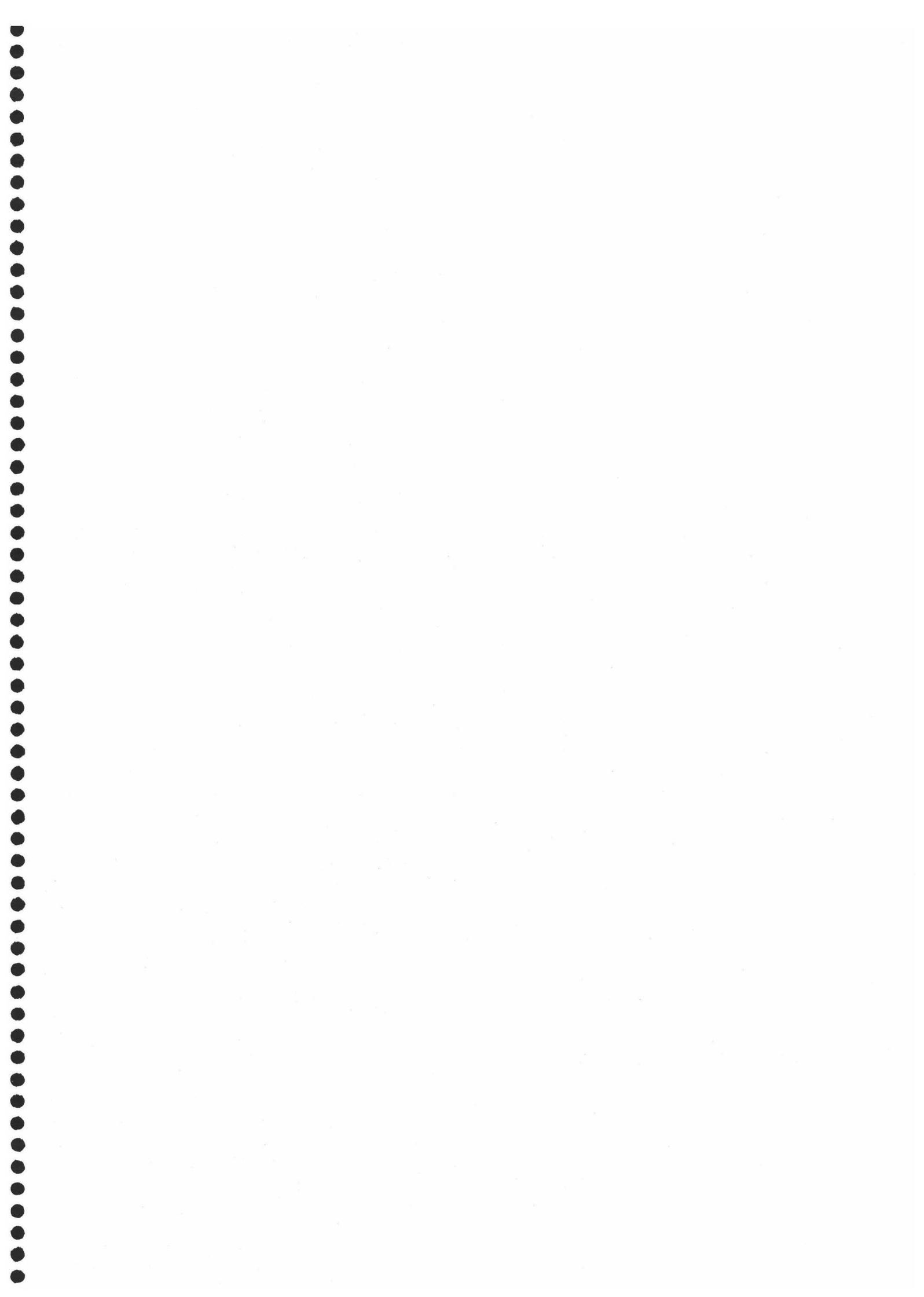


El objetivo de esta Memoria de Doctorado se centra en la aplicación de la espectrofluorimetría y la cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (CG-EM) a la caracterización y determinación de bisfenol A y algunos compuestos relacionados como el fenol, bisfenol F, bisfenol A diglicidiléter, bisfenol F diglicidiléter, bisfenol A diglicidil dimetacrilato, bisfenol A dimetacrilato y trietilenglicol dimetacrilato, en matrices de interés ambiental y biológico.

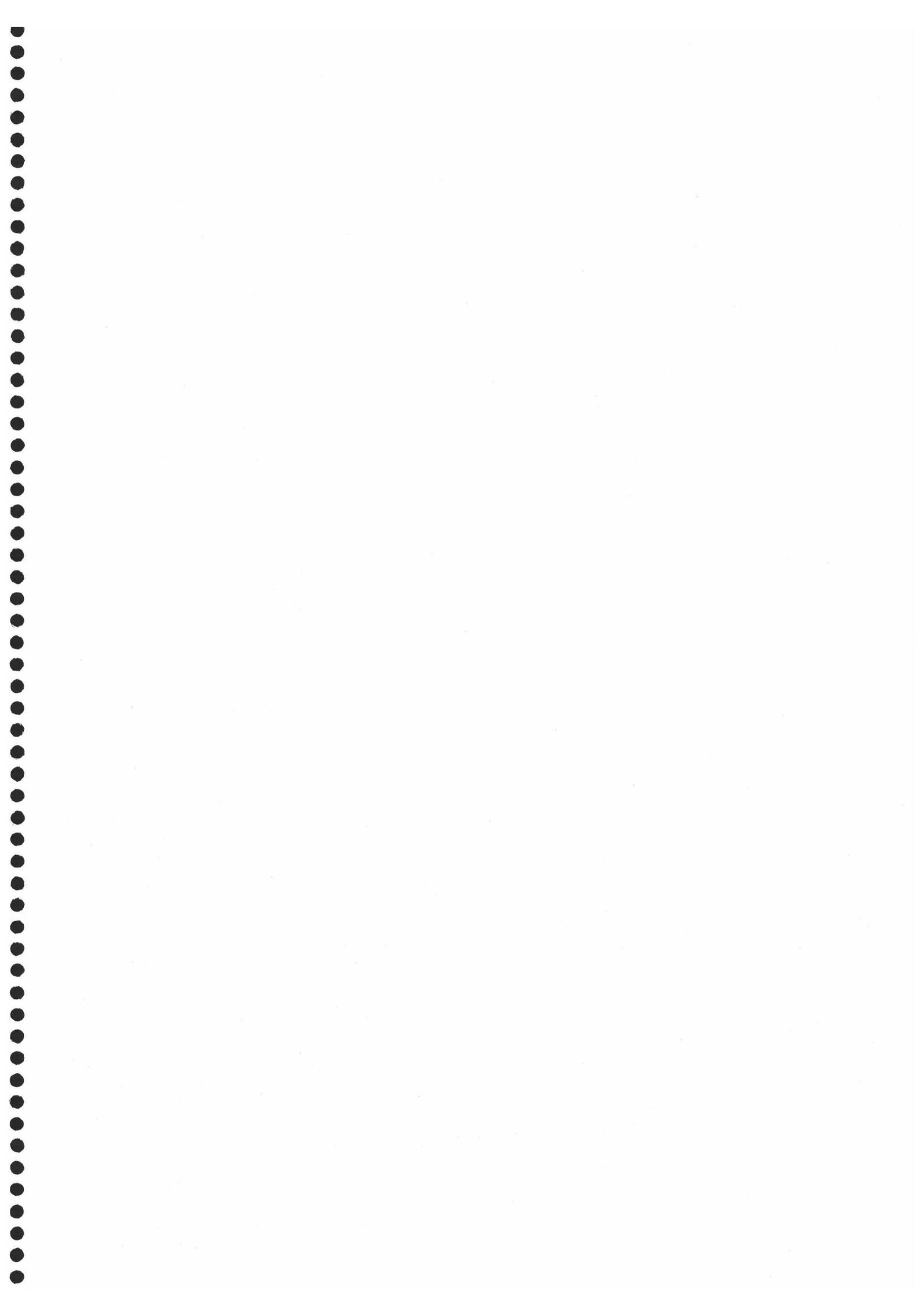
Estos compuestos, son ampliamente utilizados hoy día a nivel industrial y por tanto, son múltiples las fuentes de exposición en la vida diaria. El gran volumen de fabricación de estos compuestos y de alguno de sus derivados y la amplia utilidad de los materiales obtenidos a partir de ellos, unido a la actividad biológica asociada a este tipo de compuestos en los últimos años, justifica cualquier estudio de impacto ambiental que se realice sobre ellos.

El objetivo de esta Memoria es por tanto doble. Por una parte proponer metodología de buenas características analíticas para la determinación de estos compuestos, y por otra estudiar su comportamiento en las matrices objeto de estudio.

Así mismo, para abordar la problemática planteada por las técnicas seleccionadas para el estudio de los compuestos objeto de esta Memoria, se han aplicado diferentes estrategias. En espectrofluorimetría se propone el empleo de derivadas y calibración multivariante (PLS) para la resolución de mezclas de los compuestos. Así mismo, se propone la formación de complejos de inclusión en medios organizados y el empleo de procedimientos de microextracción líquido líquido. Por otra parte en CG-EM, se proponen tratamientos de muestra previos a la inyección cromatográfica como es el uso de técnicas de separación mediante extracción y microextracción líquido-líquido, así como diferentes reacciones de derivatización.

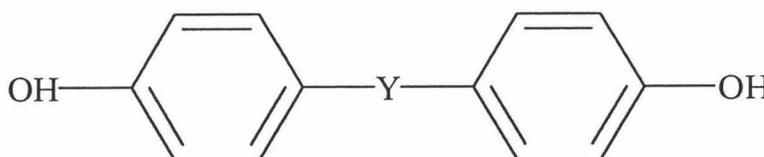


## INTRODUCCIÓN



## 1. BISFENOLES Y COMPUESTOS RELACIONADOS. SÍNTESIS Y PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS.

Los bisfenoles son compuestos aromáticos constituidos por dos anillos fenólicos que se unen a través de un grupo puente. Su fórmula general es  $Y(C_6H_5O)_2$ , donde "Y" que es el grupo puente, varía según el compuesto considerado.



*Figura 1.1 Estructura de los bisfenoles.*

Existen numerosos compuestos dentro de esta familia que son ampliamente empleados hoy día en la industria. El más simple de ellos es el bisfenol F, donde Y es un grupo metileno, seguido del bisfenol A que tiene un grupo isopropilideno como grupo puente. Además existen otros como el bisfenol B, C, F, G y H, los tienen como grupo puente un grupo metilpropilideno, metilbenceno, o-isopropilbenceno y ciclohexilideno respectivamente, ya que la síntesis de los bisfenoles se realiza mediante la reacción de condensación de dos moléculas de fenol y un segundo reactivo variable en función del compuesto considerado, así el bisfenol A se obtiene por reacción con acetona, el bisfenol B con butanona, el C con o-cresol, el F con formaldehído, el G con o-isopropilfenol y el H con ciclohexanona.

El primero de estos compuestos en ser sintetizado fue el bisfenol A. Dianin<sup>1</sup> en 1891 hizo reaccionar fenol con acetona en medio ácido, obteniendo los primeros cristales del compuesto. Este proceso no fue patentado hasta 1917 por Beaty y a partir de 1923 una compañía alemana (Chemischen Fabriken Dr. Kurt Albert) comenzó a fabricarlo con fines industriales, principalmente para la obtención de resinas de recubrimiento<sup>2</sup>. Posteriormente, en 1945, con la irrupción industrial de las resinas epoxi,

<sup>1</sup> Greth A. *Chem.-Ztg., Chem. Appar.*, **91**, 357 (1967).

<sup>2</sup> The Dow Chemical Company. *Bisphenol A*, (1969).

importantes empresas<sup>3</sup> como Bayer (Alemania), The Dow Chemical Company (USA), y Honshu Chemical Industries (Japón), entre otras, comenzaron a fabricar esta sustancia a mayor escala. Desde esta década hasta la actualidad, se han introducido nuevos compuestos de estructura similar como el bisfenol F, experimentando tanto la demanda como la producción de estos compuestos un fuerte incremento, debido a su incorporación como materiales de uso habitual en el mundo desarrollado.

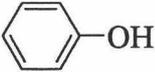
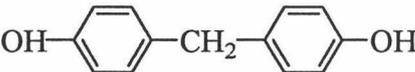
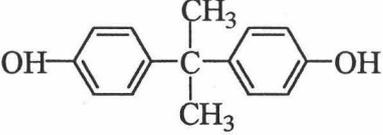
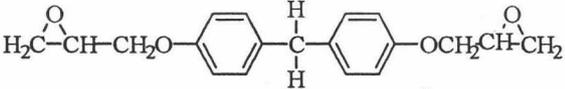
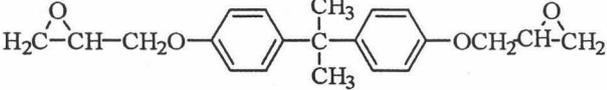
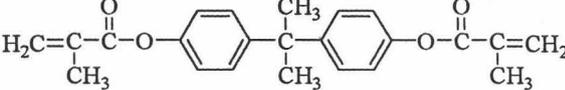
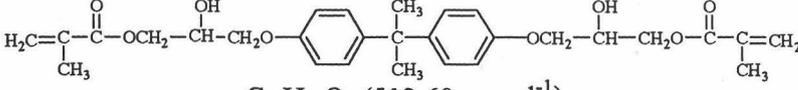
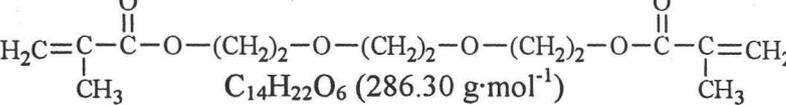
Esta Memoria se centra en el estudio de los bisfenoles A y F, por ser los éstos los más ampliamente utilizados, y algunos compuestos relacionados con ellos, como el fenol, empleado como reactivo en su síntesis, los diglicidiléteres de ambos, bisfenol A diglicidiléter (BADGE) y bisfenol F diglicidiléter (BFDGE), empleados en la fabricación de las denominadas resinas epoxi y finalmente compuestos como el bisfenol A dimetacrilato (bis-DMA) y bisfenol A diglicidil dimetacrilato (bis-GMA) que, junto al trietilenglicoldimetacrilato (TEGDMA), se emplean en la fabricación de selladores y composites dentales.

En la tabla 1.1 se recogen las estructuras de estos compuestos junto con su peso y fórmula molecular y su nomenclatura.

---

<sup>3</sup> US. Tariff Commission, "*Synthetic Organic Chemicals: US Production and Sales*".

Tabla 1.1. Características de los compuestos estudiados.

Estructura Química Fórmula (peso molecular)	Compuestos
 $C_6H_6O$ (94.11 $g \cdot mol^{-1}$ )	Fenol; Hidroxibenceno
 $C_{13}H_{12}O_2$ (200.24 $g \cdot mol^{-1}$ )	Bisfenol F; 4,4'-metiliden difenol, 4,4'-bis (hidroxifenil)metano; difenilolmetano
 $C_{15}H_{16}O_2$ (213.15 $g \cdot mol^{-1}$ )	Bisfenol A; 4,4'-isopropiliden difenol; 4,4'-bis(hidroxifenil) propano; difenilolpropano
 $C_{19}H_{20}O_4$ (312.37 $g \cdot mol^{-1}$ )	Bisfenol F diglicidiléter; BFDGE; Bis(4-glicidil oxifenil)metano
 $C_{21}H_{24}O_4$ (340.40 $g \cdot mol^{-1}$ )	Bisfenol A diglicidiléter; BADGE; Bis(4-glicidil oxifenil)propano
 $C_{15}H_{16}O_2$ (369.25 $g \cdot mol^{-1}$ )	Bis-DMA, Bisfenol A dimetacrilato
 $C_{29}H_{36}O_8$ (512.60 $g \cdot mol^{-1}$ )	Bisfenol A diglicidil dimetacrilato; bis-GMA; resina Bowen; 2,2'-bis[4-(2-hidroxi-3-metacriloiloxi -propoxi) fenil]propano; bisfenol A glicerolato dimetacrilato.
 $C_{14}H_{22}O_6$ (286.30 $g \cdot mol^{-1}$ )	TEGDMA; Trietilenglicol dimetacrilato

## 1.1. Síntesis de los compuestos.

A continuación se comentan brevemente los principales métodos de síntesis de bisfenol A y F, así como de los principales derivados obtenidos a partir de ellos. Se han agrupado en función del reactivo que se emplea junto con el bisfenol correspondiente en el proceso de síntesis, a saber: epiclorhidrina, cloruro de carbonilo y ácido metacrílico.

### 1.1.1. Síntesis de los bisfenoles.

Aunque se han propuesto a lo largo de los años numerosos métodos con distintas variantes para la obtención de estos compuestos a escala industrial, aún hoy día se utiliza el primero de ellos, propuesto a finales del siglo XIX y que se basa en la condensación de fenol con el reactivo correspondiente.

A continuación se describe brevemente este método junto con algunos otros menos empleados en la actualidad.

#### 1.1.1.1. Condensación de fenol con acetona o formaldehído.

Es el método más antiguo y a la vez el más utilizado. Se basa en la reacción de una molécula que presenta un grupo carboxílico (C=O) con dos de fenol<sup>2</sup>. La reacción que transcurre es la que se muestra a continuación:



donde *R* es un grupo metilo en el caso del bisfenol A y dos *hidrógenos* en el bisfenol F.

Para su realización práctica esta reacción no requiere condiciones críticas. Basta con tomar una mezcla 1:2 del reactivo adecuado y fenol en medio ácido (HCl concentrado al 70% v/v) y dejar reposar durante unas horas a temperatura ambiente hasta que aparezcan los cristales de bisfenol. La reacción transcurre mediante una

sustitución electrofílica, con una cinética de primer orden para ambos reactivos<sup>4,5</sup>; aunque hay autores que indican un segundo orden para el fenol cuando la reacción es catalizada por HCl. Se trata de una reacción reversible cuyo producto final está acompañado por un gran número de impurezas y subproductos de reacción<sup>6</sup>.

Como se ha dicho con anterioridad, el proceso es catalizado por diferentes ácidos fuertes<sup>7</sup> ( $K_a > 10^{-3}$ ) y, aunque el más utilizado es el ácido clorhídrico concentrado, también se puede emplear como catalizador ácido sulfúrico aproximadamente al 70-75% v/v, evitándose con esta concentración la sulfonación del producto resultante. El inconveniente que presenta este catalizador es que disminuye el rendimiento de la reacción y da lugar a un producto de escasa calidad, así mismo, origina numerosos problemas de corrosión en las instalaciones empleadas para llevar a cabo el proceso. Actualmente se ha propuesto el empleo de resinas de cambio iónico con carácter ácido fuerte como catalizadores, las cuales mejoran notablemente el proceso y no provocan ningún tipo de corrosión

#### 1.1.1.2. Condensación de fenol con otros compuestos.

Se han descrito otras reacciones similares para la obtención de bisfenoles, fundamentalmente para bisfenol A. Entre las que destacan las siguientes:

- Condensación con derivados del acetileno en presencia de catalizadores ácidos.



donde *R* es un grupo metilo en el caso del bisfenol A y dos *hidrógenos* en el bisfenol F.

<sup>4</sup> de Jong E. and Dethmers F.H.D. *Recl. Trav. Chimica Pays-Bas*, **84**, 460 (1965).

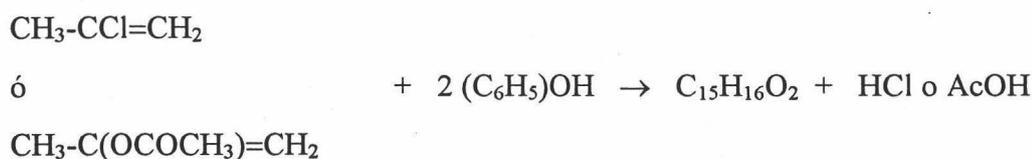
<sup>5</sup> Takenaka, T. Yamamoto, Y. Hirano, E. Nishi, S. Kodaka and T. Yoshida. *Kogyo Kagaku Zasshi*, **70**, 2081 (1967); *Chemical Abstract*, **69**, 18759 (1968).

<sup>6</sup> Egorova N.F. and Sokolov A.V. *Journal of Analytical Chemistry U.S.S.R.*, **23**, 1112 (1968).

<sup>7</sup> Kato T. *Nippon Kagaku Zasshi*, **84**, 458 (1963). *Chemical Abstr.*, **59**, 13781 (1963).

Este método presenta el inconveniente de que tanto el rendimiento como la Calidad del producto final es inferior al anteriormente descrito.

- Condensación de fenol con p-isopropilfenol, para obtener bisfenol A.
- Condensación catalizada por ácidos con 2-cloropropeno o isopropenilacetato, siendo la reacción implicada en cada caso la que se señala a continuación:



En general, todos estos métodos alternativos presentan pocas ventajas y bastantes inconvenientes, por lo que el proceso más utilizado en la actualidad sigue siendo la condensación de acetona con fenol en presencia de un catalizador ácido fuerte.

#### *1.1.1.3. Purificación de los compuestos.*

Una vez llevada a cabo la reacción, se debe purificar el compuesto obtenido, ya que el producto final suele estar acompañado de fenol, exceso de catalizador, agua y de algún subproducto de reacción.

En la práctica totalidad de los métodos de purificación existentes, el fenol en exceso se recicla nuevamente al reactor, con objeto de aprovecharlo en el siguiente proceso de síntesis.

Se han propuesto un gran número de procedimientos para la purificación del compuesto<sup>8</sup>, basados en distintos tratamientos. Se ha propuesto la utilización de disolventes como el benceno o mezclas de los mismos, que arrastran la mayor cantidad

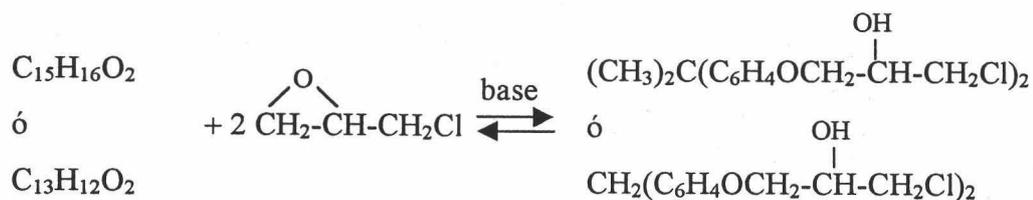
<sup>8</sup> Takenaka, T. Yamamoto, Y. Hirano, E. Nishi, S. Kodaka and T. Yoshida. *Kogyo Kagaku Zasshi*, 70, 2081 (1967); *Chemical Abstract.*, 69, 18759 (1968).

posible de subproductos de reacción pero no al bisfenol. Procedimientos más efectivos, aunque más laboriosos, son la recristalización utilizando disolventes aromáticos, o mezclas de estos con disolventes polares como metanol. Por último, un procedimiento poco utilizado consiste en disolver el bisfenol crudo en una solución alcalina, opcionalmente con adición de carbón activo y sales inorgánicas, posterior filtración y precipitación con un ácido fuerte. En la actualidad, todos estos procedimientos han sido desplazados por procesos de destilación<sup>9</sup>.

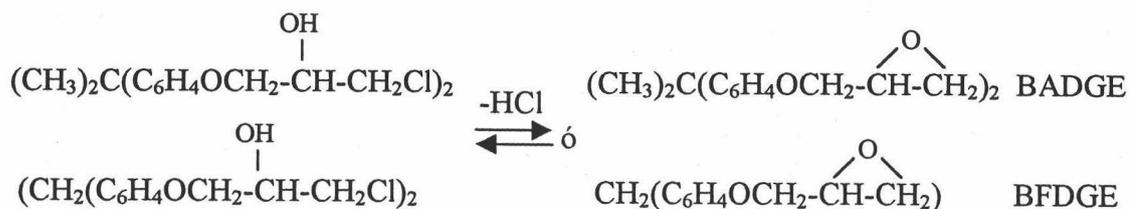
### 1.1.2. Síntesis de los diglicidiléteres.

Esta reacción da lugar a los derivados diglicidil éter de bisfenol A (BADGE) y bisfenol F (BFDGE). La reacción es catalizada por bases y transcurre en dos etapas.

En primer lugar el bisfenol reacciona con la epiclorhidrina, siendo el proceso catalizado por una base, que puede ser hidróxido sódico, alguna sal de litio o de amonio cuaternario.



A continuación se produce una deshidrohalogenación del compuesto intermedio dando lugar a los correspondientes diglicidiléteres.



<sup>9</sup> Staples C. A, Dorn P.B, Klecka G.M and O'block S.T. *Chemosphere*, 36, 2149 (1998).

En función del tipo de catalizador empleado, se distinguen dos modalidades diferentes:

*1.1.2.1. Empleo de una disolución al 25 % de hidróxido sódico en agua.*

En este caso, el catalizador es una base muy fuerte que se añade lentamente y con agitación constante, a la mezcla epiclorhidrina-bisfenol. En esta modalidad, la segunda etapa, es decir la deshidrohalogenación, es la que controla la reacción. Normalmente es necesaria una relación epiclorhidrina:bisfenol elevada con objeto de maximizar la producción de bisfenol A y bisfenol F diglicidiléter. Cuando la relación entre ambos reactivos es 10:1, se obtiene un 90 % de estos compuestos en el reactor.

*1.1.2.2. Empleo de sales de amonio cuaternario*

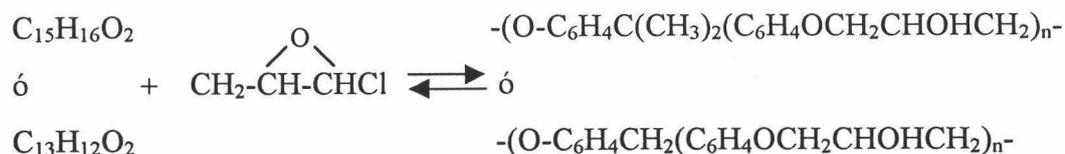
En este caso, las bases empleadas como catalizadores, al ser más débiles que el hidróxido sódico no son lo suficientemente fuertes como para producir la deshidrohalogenación del producto intermedio. Por tanto, para terminar la reacción, se elimina el exceso de epiclorhidrina y se añade la cantidad estequiométrica de una base fuerte como hidróxido sódico. Este método proporciona un rendimiento de reacción mas elevado que el primero.

A partir de estos dos métodos, han surgido nuevas variantes que han tratado de mejorar el rendimiento del proceso y obtener así resinas líquidas de mayor pureza y de mejores propiedades físicas y químicas.

Siguiendo los mismos procedimientos descritos, si la condensación se lleva a cabo fijando una relación 1:1 entre los reactivos, se produce una unión alternativa que origina los polímeros lineales termoplásticos<sup>10</sup> que se muestran a continuación.

---

<sup>10</sup>*Modern Plastic*, 40 (3), 169 (1962); 45 (5), 125 (1967).



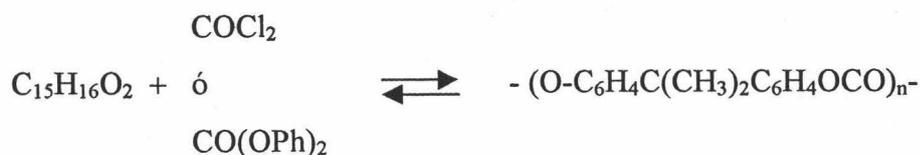
El valor de  $n$  suele estar comprendido entre 2 y 25 unidades, y dependiendo del uso final de la resina, se emplearan de mayor o menor peso molecular.

Finalmente, la reacción del bisfenol correspondiente a temperaturas entre 150 y 190 °C, con una resina epoxi líquida de bajo peso molecular, en presencia de un catalizador, origina las llamadas resinas epoxi sólidas de alto peso molecular. Esta reacción es muy rápida y presenta un rendimiento cercano al 100 %.

### 1.1.3. Síntesis de los policarbonatos.

Esta reacción da lugar a la aparición de los policarbonatos. Éstos, son compuestos, derivados del bisfenol A de gran importancia hoy día a nivel industrial, y se producen por reacción del bisfenol A y compuestos como cloruro de carbonilo (fosgeno,  $\text{O}=\text{CCl}_2$ ) o el difenilcarbonato ( $\text{O}=\text{C}(\text{OPh})_2$ ).

Para la fabricación de policarbonatos deben utilizarse reactivos de elevada pureza; tanto el bisfenol A como el fosgeno empleados en la síntesis deben ser previamente purificados mediante destilación. A continuación se muestran las reacciones que tienen lugar en el proceso de obtención de estos compuestos.



A nivel industrial, esta reacción se lleva a cabo siguiendo tres procedimientos diferentes.

- a. *Transesterificación del bisfenol A y difenilcarbonato* a alta temperatura. El difenilcarbonato se obtiene por reacción del fosgeno y la sal sódica del fenol en disolución acuosa con exceso de hidróxido sódico. Este proceso es el más económico de los existentes, aunque en la actualidad no se utiliza, pues los tipos de policarbonatos obtenidos son muy limitados y además es muy difícil obtener productos incoloros, propiedad principal de este tipo de derivados.
- b. *Reacción de policondensación en la interfase formada entre una solución de sal sódica de bisfenol A en fase acuosa y cloruro de carbonilo (fosgeno) en fase orgánica.* Es el procedimiento empleado hoy día a nivel industrial y se basa en la reacción de la sal sódica del bisfenol A con el fosgeno. En una primera fase se produce una reacción muy rápida, que transcurre en menos de 20 segundos, y que da lugar a la formación de bisclorocarbonatos. Seguidamente los grupos carbonato terminales se hidrolizan por el exceso de álcalis y se forman así oligómeros. Por último, se forman cadenas de policarbonatos pudiendo ser catalizado este proceso por alquilaminas terciarias.

#### **1.1.4. Síntesis de los metacrilatos.**

Otros derivados de gran importancia por su aplicabilidad actual, son los resultantes de la reacción del bisfenol A con ácido metacrílico empleados así mismo en la fabricación de resinas. Los dos derivados más importantes son el bisfenol A diglicidil dimetacrilato (bis-GMA) y el bisfenol A dimetacrilato (bis-DMA).

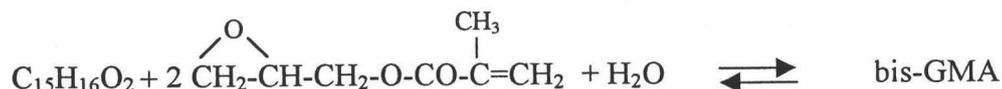
##### **1.1.4.1. Síntesis del bis-GMA.**

Esta síntesis fue realizada por primera vez en 1965 por Bowen. Consiste en la reacción del bisfenol A con el ácido metacrílico y el glicidil alcohol en dos etapas.

En primer lugar se produce una reacción de policondensación entre el alcohol y el ácido metacrílico originando metacrilato de glicidilo.



A continuación éste reacciona con el bisfenol A originando el compuesto final.



La resina producida, presenta una gran rigidez y viscosidad debido a su estructura molecular. Para disminuir esta rigidez, se suelen emplear como aditivos compuestos del tipo trietilenglicoldimetacrilato (TEGDMA), e incluso mezclas con bisfenol A dimetacrilato.

#### 1.1.4.2. Síntesis del bis-DMA.

El bisfenol A dimetacrilato, se sintetiza por reacción de esterificación entre el bisfenol A y el ácido metacrílico.



Así mismo, en bibliografía se ha descrito la posibilidad de obtener este compuesto a partir del bis-GMA mediante la pérdida del grupo diglicidilo<sup>11</sup>, aunque no se conoce el mecanismo de esta reacción.

Ambos procedimientos dan lugar a la aparición de resinas menos rígidas y viscosas que las derivadas del bis-GMA.

<sup>11</sup>Roth F. "Les composites", Ed Masson S.A, Capítulo 1, pag 3 Paris (1991).

## 1.2. Propiedades físicas.

A continuación se comentan brevemente algunas de las propiedades físicas de los compuestos considerados en esta Memoria. En la tabla 1.2, se muestra su *solubilidad* en distintos medios, *puntos de fusión* y *densidades*.

*Tabla 1.2. Propiedades físicas.*

	*Solubilidad a 25 °C				P <sub>fusión</sub> (°C)	Densidad (g/cm <sup>3</sup> )
	Agua	EtOH	Éter	CCl <sub>4</sub>		
<b>Fenol</b>	(3)	(4)	(3)	(3)	41	1.058
<b>Bisfenol A</b>	(2)	(4)	(3)	(3)	150-155	1.130
<b>Bisfenol F</b>	(2)	(4)	(3)	(3)	162-164	---
<b>BADGE</b>	(2)	(4)	(3)	(4)	45	---
<b>BFDGE</b>	(2)	(4)	(3)	(4)	15	1.190
<b>Bis-DMA</b>	(2)	(4)	(3)	(3)	72-74	---
<b>Bis-GMA</b>	(1)	(4)	(3)	(3)	ND	1.160
<b>TEGDMA</b>	(1)	(5)	(5)	(5)	<< 0	1.092

\* (1) Insoluble, (2) Poco soluble, (3) soluble, (4) muy soluble, (5) miscible.

Todos los compuestos son solubles en disolventes orgánicos como éter etílico y tetracloruro de carbono, siendo muy solubles en medio etanólico. Así mismo, se observa que en agua la solubilidad de la mayoría de ellos es muy baja e incluso algunos son insolubles en este medio a temperatura ambiente.

En cuanto al punto de fusión, se observa que bisfenol A, bisfenol F y bis-DMA, funden a temperaturas por encima de 70 °C, estos compuestos a temperatura ambiente son sólidos cristalinos. Por su parte, BADGE y BFDGE muestran puntos de fusión cercanos a la temperatura habitual del laboratorio, en estas condiciones, se trata de fluidos altamente viscosos. Por su parte el TEGDMA, presenta un punto fusión muy por debajo de 0 °C, siendo a temperatura ambiente líquido y además muy fluido.

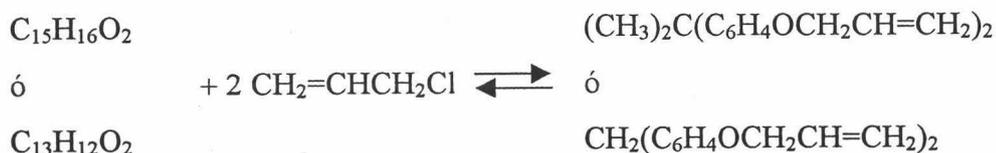
Finalmente, una propiedad física importante es el coeficiente de partición de entre el agua y distintos disolventes orgánicos. Para estos compuestos, los alcanos son

los peores extractantes, los disolventes aromáticos presentan un comportamiento intermedio y por último los alcoholes y éteres son los mejores<sup>12</sup>.

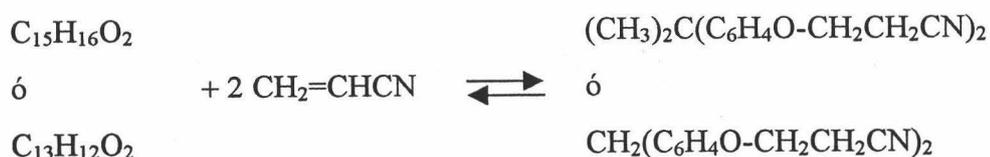
### 1.3. Propiedades químicas.

Los bisfenoles reaccionan con una gran variedad de compuestos y presentan una reactividad análoga a los fenoles p-sustituídos, pudiendo sufrir modificaciones en uno o los dos anillos, en los grupos hidroxilo, e incluso ser atacados en el carbono central que une ambos anillos. Entre las reacciones más importantes destacan:

#### 1.3.1. *Reacción de alquilación* con haluros de alquilo originando diéteres.



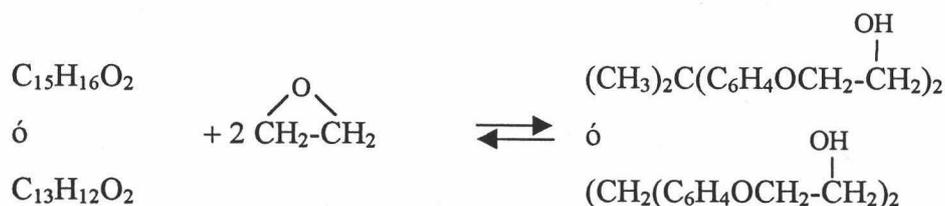
#### 1.3.2. *Reacción de cianometilación* catalizada por bases para originar dinitrilos que pueden ser hidrogenados hasta la formación de diaminas.



#### 1.3.3. *Reacción con epóxidos* originando una hidroxialquilación de los grupos fenólicos. Reacción ésta importante desde el punto de vista industrial para la obtención de poliésteres insaturados empleados para revestimientos<sup>13</sup>.

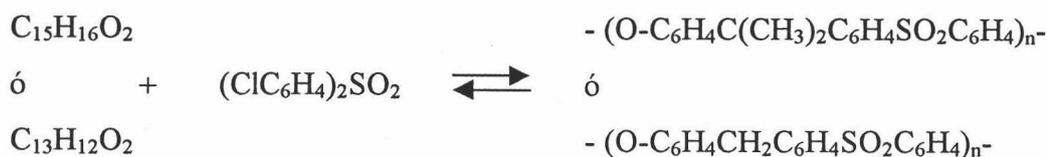
<sup>12</sup>Korenman I. and Gorokhov A.A. *Zh. Fiz Khim.*, 47, 2058 (1973); *Journal of Applied Chemistry U.S.S.R.*, 46, 2751 (1973).

<sup>13</sup>Doyle E.N. "*The Development and Use of Polyester Products*", Ed. McGraw Hill, New York (1969).

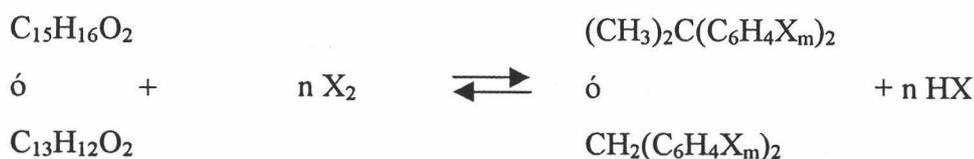


Quando el epóxido es el metacrilato de glicidilo, el compuesto resultante de la reacción entre el alcohol glicídico y el ácido metacrílico, es el bis-GMA.

**1.3.4. Reacción con dihaluros** como el bis-(2-cloroetiléter) o el 1,4-bis(clorometil)-benceno que en proporción menor a la estequiométrica (1:1) da lugar a polímeros con grupos fenólicos terminales, empleados en la fabricación de polímeros de mayor tamaño. Si reacciona en medio básico con bis(4-clorofenil) sulfonato, se obtienen las resinas polisulfónicas comerciales<sup>14</sup>.



**1.3.5. Reacción de sustitución** electrofílica en hidrógenos adyacentes a los grupos OH. Una de las más importantes es la halogenación que origina bisfenoles polihalogenados, usados como aditivos para dar resistencia a las resinas epoxi, poliéster y plásticos policarbonato.



Con n y m=1,2,3 o 4.

<sup>14</sup>"Encyclopedia of Polymer Science and Technology", Wiley-Interscience, 11, 447, New York (1969).

**1.3.6. Esterificación con ácidos orgánicos.** Da lugar a la formación de ésteres. Cuando el ácido es el metacrílico, se genera de bisfenol A dimetacrilato.



**1.3.7. Reacción de hidrogenación.**

Da lugar a isopropilidenciclohexanol y metildiciclohexanol respectivamente, compuestos utilizados para mejorar la resistencia de las resinas poliéster. La hidrogenolisis en caliente origina fenol, si la presión de  $\text{H}_2$  es alta, o trazas de isopropilfenol o metano, a bajas presiones de  $\text{H}_2$ .



**1.3.8. Otras reacciones.**

- a* **Reacción de alquilación** con isobutileno o estireno en medio ácido, origina compuestos usados como estabilizantes y antioxidantes en plásticos.
- b* **Reacción de policondesación con formaldehído** se utiliza como un paso previo para la fabricación de resinas de tipo fenólico.
- c* **Reacción de nitración** mediante reacciones de aminometilación, reacción de Kolbe, nitrosación y diazocopolación.
- d* **Reacción de pirólisis simple** que origina fenol, p-isopropilfenol o p-metilfenol y alquitrán residual.

## 2. APLICACIONES DE LOS BISFENOLES Y COMPUESTOS RELACIONADOS. FUENTES DE EXPOSICIÓN HUMANA.

En este apartado se comentan brevemente las principales aplicaciones industriales de los bisfenoles y de algunos compuestos relacionados con ellos. La producción a nivel industrial de este tipo de compuestos se ha incrementado notablemente a lo largo de los años. En la tabla 2.1 se muestran algunos datos de la demanda mundial de bisfenol A, compuesto de mayor aplicación a nivel industrial, durante la última década<sup>15</sup>.

*Tabla 2.1. Demanda mundial de bisfenol A.*

<b>Año</b>	<b>Demanda (libras)</b>
1990	0.99 billones
1992	1.42 billones
1996	1.47 billones
1997	1.73 billones
1998	1.80 billones
2000	2.30 billones

En los últimos diez años la demanda de bisfenol A se ha multiplicado por 2.3, produciéndose los mayores incrementos en los bienios 1990-1992 y 1998-2000. Así mismo, se prevé que la tendencia creciente se mantenga durante los próximos años, de hecho la previsión para los años 2001 y 2002, se estima en un crecimiento anual del 5%.

Este incremento en la producción industrial de este tipo de compuestos y la gran cantidad de aplicaciones que poseen en actualmente, hace posible que exista un contacto íntimo entre los seres vivos, incluido el hombre, el ambiente que los rodea y este tipo de sustancias. A continuación se comentan brevemente las principales aplicaciones tanto del bisfenol A como del bisfenol F y por tanto las fuentes de exposición por parte del ser humano.

<sup>15</sup>[www.chemexpo.com/news/profile99014.cfm](http://www.chemexpo.com/news/profile99014.cfm)

## 2.1. Resinas epoxi: Fabricación y aplicaciones.

Las resinas epoxi son prepolímeros que contienen una media de dos o tres grupos epóxido en su molécula<sup>16</sup>. Desde el punto de vista comercial las más importantes son aquellas que derivan de la reacción de la epiclorhidrina con compuestos que poseen al menos dos átomos de hidrógeno reactivos en su molécula, incluidos compuestos polifenólicos, mono y di aminas, aminofenoles, imidas heterocíclicas y amidas, dioles alifáticos y polialcoholes e incluso ácidos grasos diméricos. Desde el punto de vista industrial estas resinas son denominadas *glicidil-resinas* y suelen ser mezclas de varios de estos compuestos. Hoy día las más empleadas son las obtenidas a partir de compuestos bifenólicos como el bisfenol A y el bisfenol F.

Para su utilización, estos compuestos deben ser sometidos a una reacción de curación o entrecruzamiento<sup>17</sup>. La reacción consiste en un tratamiento con agentes químicos como aminas, ácidos polibásicos o anhídridos, fenoles, mercaptanos, etc. o tratamientos térmicos, consiguiéndose así una estructura tridimensional entrecruzada de gran resistencia química sobre todo a ambientes corrosivos, excelente adherencia a numerosos substratos, gran resistencia a la flexión, tensión y compresión, además presentan excelentes propiedades como aislantes eléctricos y son resistentes a la agresión física<sup>18</sup>.

Hoy día aproximadamente el 75% de las resinas epoxi utilizadas a nivel mundial, son derivadas del bisfenol A diglicidiléter (BADGE)<sup>19</sup>, debido a la combinación del bajo coste económico que supone su producción y sus excelentes propiedades.

Actualmente, se está introduciendo un nuevo tipo de resinas epoxi denominadas *resinas epoxi novolac*, de las cuales el miembro más simple son las basadas en el

<sup>16</sup>Gao Jungang. *Journal of Applied Polymer Science*, **48**, 237 (1993).

<sup>17</sup>O'Neil L.A. and Cole C.P., *Journal of Applied Chemistry*, **6**, 356 (1956).

<sup>18</sup>Antoon M.K. and Koenig J.L. *Journal of Polymers Science*, **19**, 549 (1981).

<sup>19</sup>Musopf J.W. and McCollister S.B. "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry", Vol A9, VCH Publishers, New York, 547 (1987)

bisfenol F diglicidiléter (BFDGE), empleadas ampliamente como diluyentes en aquellos casos en los que se necesiten resinas de menor viscosidad, como por ejemplo en la fabricación de revestimientos para metales. Esta modificación va encaminada principalmente a conseguir polímeros de alta resistencia química para ser utilizados en procesos químicos donde intervienen productos corrosivos como son la producción de cloro, refinado de metales, producción de pulpa de papel, etc<sup>20</sup>. Químicamente este tipo de resinas son modificaciones de las epoxi de manera que pueden ser sometidas a reacciones de curación mediante los mismos métodos utilizados para las resinas de poliéster insaturado tradicionales (UP), es decir, a través de un mecanismo radical con estireno como agente de curado.

Las primeras patentes de síntesis y procesos de curación de estas resinas, se remontan a la década de los años 30. Ciba en Europa y Shell en Estados Unidos, fueron los primeros en comercializarlas a principios de los años 40, siendo estas dos compañías en la actualidad, junto con la Dow Chemical, las máximas productoras mundiales. Actualmente, el consumo de resinas epoxi derivadas de BADGE y BFDGE está aún en claro crecimiento a pesar de la aparición de nuevos tipos que compiten con ellas en la facilidad de producción y los bajos costes generados en la misma.

Se emplean en aplicaciones tan diversas como pinturas, pegamentos y adhesivos, pavimentos y suelos, revestimientos de protección sobre todo en industria conservera<sup>21</sup>, siendo numerosos los mecanismos de exposición del ser humano a este tipo de polímeros.

## 2.2. Plásticos policarbonato: Fabricación y aplicaciones.

Otro derivado importante desde el punto de vista de su aplicación, son los plásticos policarbonato. Se trata de poliésteres lineales del ácido carbónico y un dihidroxifenol aromático. Comercialmente los policarbonatos más importantes son los

---

<sup>20</sup> M. Jaeger y F. Hurtado. *Revista de Plásticos Modernos*, 73, nº 489 (1997).

<sup>21</sup> Brontons J.A., Olea-Serrano M.F., Villalobos M., Pedraza V. and Olea N. *Environmental Health Perspectives*, 106, 608 (1995).

derivados del bisfenol A.

Este tipo de plásticos<sup>22</sup> fue descubierto casi simultáneamente por Bayer AG en Alemania y General Electric Company en Estados Unidos en 1958, estableciéndose las primeras plantas comerciales para su producción industrial unos años después.

Como resultado de los procesos de síntesis de este tipo de compuestos, se obtienen polímeros muy aptos para usos industriales como plásticos de elevada resistencia al impacto, gran estabilidad dimensional y térmica, buen comportamiento deslizante y elevada transparencia<sup>23,24,25</sup>.

Existen más de 100 variedades de plásticos policarbonato, dependiendo sobre todo del peso molecular del polímero. Cada una de ellas, tiene sus aplicaciones industriales específicas; así, entre otras muchas, se usan en la industria del automóvil y aeronáutica, en instalaciones de alumbrado, en construcción, en sistemas eléctricos, conducciones de aguas potables, telecomunicaciones, equipos fotográficos, lentes ópticas y discos compactos, envasado de alimentos y aguas<sup>26</sup>, en productos manufacturados como los biberones<sup>27</sup> e incluso en materiales relacionados con la salud humana como prótesis y lentes intraoculares<sup>28</sup>.

### 2.3. Composites y selladores dentales: Aplicaciones médicas.

Finalmente otra importante aplicación, fundamentalmente del bisfenol A, es la fabricación de las llamadas en medicina *resinas compuestas*. La introducción de este tipo de resinas ha sido uno de los avances más relevantes de la odontología clínica moderna. Su amplia y rápida difusión entre los profesionales de este campo, ha

<sup>22</sup>Christopher, et al., *Polycarbonates*, Ed. Reinhold, New York (1962).

<sup>23</sup>General Electric Company, *Manuals for Lexan Polycarbonates* (1973).

<sup>24</sup>Dow Chemical Company, *Manuals for Calibre Polycarbonate* (1975).

<sup>25</sup>Mobay Corporation, *Manuals for Makrolon Polycarbonate* (1980).

<sup>26</sup>Krishnan A.V., Stathis P., Permuth S.F., Tokes L. and Feldman D. *Endocrinology*, **132**, 1179 (1993).

<sup>27</sup>Mountfort K.A., Kelly J., Jickells S.M. and Castle L. *Food Additive Contaminants*, **14**, 737 (1997).

<sup>28</sup>Yalon M., Goldberg E.P., Osborn D., Stacholy J. and Sheets J.W. *Journal of Cataract Refract Surgery*, **14**, 393 (1988).

supuesto una auténtica revolución en la operatoria dental, introduciendo nuevos conceptos y prácticas, como el de odontología adhesiva, sinónimo en muchos aspectos de una odontología más estética y menos invasiva.

Uno de los campos que más directamente se ha beneficiado de la aparición de estos nuevos materiales es el de la odontología preventiva, gracias a la aplicación de las resinas compuestas en forma de selladores de fisuras, técnica de demostrada efectividad en la prevención de las caries oclusales.

Las resinas más empleadas en la actualidad son las basadas en compuestos como el bis-GMA, patentado por Bowen, que es un oligómero que posee dos dobles enlaces reactivos en ambos extremos de la molécula, según se señaló en el apartado 1.

Otro compuesto empleado aunque en menor medida en la fabricación de este tipo de polímeros es el bisfenol A dimetacrilato (bis-DMA), que a veces se encuentra incluso junto con bis-GMA en algunas de las resinas fabricadas a partir de este último.

Además de bis-GMA y bis-DMA a estas resinas, se suelen añadir una gran cantidad de aditivos que cumplen distintas funciones:

- Se añaden *controladores de la viscosidad*, ya que las resinas derivadas del bisfenol A, principalmente el bis-GMA, son altamente viscosas. Así, se adicionan monómeros de baja viscosidad, como el trietilenglycoldimetacrilato (TEGDMA), que polimerizan junto con el bis-GMA dando lugar a la aparición de un copolímero altamente entrecruzado y muy fluido y manejable.
- Así mismo, se mezclan *partículas de relleno* que proporcionan estabilidad dimensional a la matriz de la resina y una mayor dureza. El tamaño de estas partículas varía entre 100 y 0.7  $\mu\text{m}$  y se suelen emplear como materiales, partículas de cuarzo cristalino, sílice pirolítico (como aerosil), silicato de aluminio o vidrio de silicato.
- Por otra parte, se añaden *agentes de acoplamiento*, compuestos éstos que

facilitan la unión entre las partículas de relleno y la matriz de la resina, componentes que no se encuentran unidos mediante enlace químico. Habitualmente se utilizan epoxi, vinil o metilsilanos.

- También se adicionan *compuestos inhibidores* que evitan la polimerización prematura de las resinas. Con frecuencia, se emplean compuestos como el 4-metoxifenol (PMP) o el 2,4,6-triterciaributilfenol (BHT), en un porcentaje aproximado del 0.1 %.
  
- Se añaden por otra parte *estabilizadores de color* que suelen ser benzofenonas, benzotiazoles o fenilsalicilatos, e incluso el BHT puede contribuir en este aspecto.
  
- Finalmente, se adicionan *iniciadores de la polimerización* que varían en función del procedimiento seguido. Uno de ellos implica un proceso térmico con un iniciador químico como el peróxido de benzoilo y calor. Otra posibilidad es una iniciación química con este mismo iniciador en presencia de un 2% de una amina terciaria aromática. Una tercera opción es la utilización de luz ultravioleta a 365 nm, en presencia de un 0.1% de éter alquilbenzónico. Finalmente, una cuarta opción consiste en emplear luz halógena a 425-450 nm, en presencia de canforoquinona (0.06%), una amina terciaria alifática (0.04%) o aromática (0.01%)

Por tanto, dada la gran cantidad de componentes químicos presentes en este tipo de polímeros y teniendo en cuenta que la polimerización nunca es completa<sup>29</sup>, con los datos disponibles actualmente, se puede afirmar que en las resinas derivadas de bis-GMA y bis-DMA existen impurezas que, bien liberadas de las restauraciones dentales por una polimerización incompleta o por generación a partir de la degradación de las resinas iniciales, son potencialmente estrogénicas principalmente monómeros libres como bisfenol A y bis-DMA, los cuales pasan al organismo del paciente sometido al tratamiento preventivo o restaurativo en el que se ha empleado este tipo de material a

---

<sup>29</sup>Söderholm KJ, Mariotti A. *Journal of American Dental Association*, 130, 201 (1999).

través de la saliva. El individuo por tanto se encuentra expuesto a su acción lo cual supone un riesgo potencial para su salud .

#### 2.4. Exposición ambiental.

Por último, es importante destacar que además de las fuentes de exposición directa a través de los productos manufacturados citados con anterioridad, existe un importante factor de exposición ambiental a este tipo de compuestos. La actividad industrial asociada a la síntesis de todos estos compuestos<sup>30</sup>, es responsable de su liberación al ambiente. Dado que se ha tratado en muchas ocasiones de sustancias químicas originales, sin correspondencia en la naturaleza, se ha exigido por parte de los organismos encargados de la protección del ambiente y la salud el cumplimiento de ciertos requisitos previos a su utilización, ante la sospecha de una posible influencia de estas nuevas sustancias en el desarrollo de la vida sobre la Tierra<sup>31</sup>. Estudios de impacto ambiental realizados sobre la existencia de estas sustancias en ríos de Europa, Japón y Estados Unidos, han puesto de manifiesto su presencia en concentraciones que, aunque no son muy altas, pueden llegar a convertirse en problemáticas.

Los principales factores que las convierten en tóxicas y peligrosas para el ambiente y sus habitantes son su bioacumulación y elevada persistencia. Hoy día se genera una gran cantidad de residuos, entre los que se incluyen derivados degradables de los bisfenoles, compuestos que se van depositando lentamente en los ríos y sedimentos, e incluso se difunden a través del suelo, llegando a las aguas subterráneas. Un buen factor para la caracterización de su bioacumulación y persistencia es el tiempo de vida medio. Este parámetro se puede definir como el tiempo que tarda en descomponerse el 50% de la sustancia. Un estudio de bioacumulación del bisfenol A realizado muestra los siguientes datos<sup>30</sup>:

---

<sup>30</sup>Nicolás Olea. *Laboratorio de Investigaciones Médicas Y Laboratorio Tumoral Facultad de Medicina*, Universidad de Granada. Editorial (1999).

<sup>31</sup>*Oslo a Paris conventions for the prevention of marine pollution working group on concentrations. Trends and effects of substances in the marine environment (SIME). Ostend, SIME 97/3/NGO.1E (3-7 Febrero de 1997).*

---

* En aire	De 0.74 a 7.4 horas.
* En tierra	De 1 a 180 días.
* En aguas superficiales	De 1 a 150 días.
* En aguas subterráneas	De 21 a 360 días.

Estos valores indican su alta acumulación en el medio, entrando a través de diversas vías en el ciclo biológico de los individuos que habitan en las zonas de descarga de vertidos y residuos, quedando así expuestos a su acción. El hombre como ser vivo también se encuentra expuesto a ellos. Es importante por tanto conocer a fondo estas vías de exposición, así como sus consecuencias.

### 3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE BISFENOLES Y DERIVADOS.

A lo largo de los últimos años, un gran número de estudios realizados han demostrado un incremento en la incidencia de determinadas alteraciones en la salud y fecundidad de los seres vivos, incluido el hombre. Estos cambios pueden ser atribuidos a efectos sobre el sistema hormonal debido a la presencia de ciertos compuestos químicos en el ambiente<sup>32,33</sup>. Este hecho es objeto de estudio por parte de numerosos grupos de investigación especializados<sup>34</sup>, comités gubernamentales e industrias en Europa, Japón y Estados Unidos<sup>35</sup>. Se han llevado a cabo numerosos estudios experimentales y epidemiológicos en humanos y animales, principalmente con objeto de determinar el efecto de este tipo de compuestos sobre la salud sexual de los individuos, particularmente centrados en efectos sobre la salud reproductiva derivados de la exposición a disruptores endocrinos en las primeras etapas de la vida.

#### 3.1. Definición de disrupción endocrina.

Originalmente, el concepto de disrupción endocrina, ha sido casi totalmente referido a efectos sobre el sistema reproductor de los individuos y generalmente se ha referido a la presencia de compuestos químicos con capacidad para mimetizar a los estrógenos. Con el tiempo, se ha demostrado que numerosos compuestos poseen capacidad para bloquear respuestas estrogénicas (anti-estrogenos) o las respuestas androgénicas (anti-andrógenos) y además se ha puesto de manifiesto, que estos compuestos químicos pueden afectar a otros elementos del sistema endocrino a través de su interacción con el receptor hormonal. Por este motivo, hoy día se emplea el término disruptor endocrino, que incluye efectos sobre la salud relacionados con la interacción del compuesto con cualquier parte del sistema endocrino.

<sup>32</sup>Colborn T. and Clement C. *Advances in Modern Environmental Toxicology*. Vol XXI, Princeton Scientific, New Jersey (1992).

<sup>33</sup>Institute for Environmental and Health, assessment A1, *Environmental Oestrogens: Consequences to Human Health and Wildlife*, IEH, Leicester (1995).

<sup>34</sup>Kavlock R.J., Dston G.P., de Rosa C., Fenner-Crisp P., Gray L., Kaatari S., Lucier G., Luester M., Mac M.J., Maczka C., Miller R., Moore J., Rolland R., Scott G., Sheehan D.M., Sinks T. and Tilson H.A. *Environmental Health Perspectives*, 104 (suppl. 4), 715 (1995).

<sup>35</sup>US Environmental Protection Agency. *Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis*, EPA/630/R-96/012, Washington (1997).

Con objeto de establecer un consenso a la hora de identificar este tipo de compuestos para futuras regulaciones y controles, la Unión Europea ha definido el término disruptor endocrino (ED) como “*sustancia exógena que causa efectos adversos sobre la salud de un organismo sano o en su descendencia, originando cambios en las funciones endocrinas*”<sup>36</sup>.

Queda claro que esta definición puede ser aplicada a individuos jóvenes, adultos o a los descendientes de estos. Así en este trabajo de la Unión Europea, queda establecido que aunque se ha encontrado evidencia de este tipo de actividad en numerosos compuestos químicos empleando sólo modelos *in vitro* como ensayos de afinidad hormonales, estos compuestos deberían ser considerados solamente como “potenciales” disruptores endocrinos frente a los demostrados mediante ensayos *in vivo*. Para aquellos compuestos que son considerados como “potenciales” disruptores endocrinos, la UE propone una definición alternativa, según la cual, un compuesto de este tipo, será una “*sustancia que posee propiedades que podrían originar disrupción endocrina en un organismo sano*”.

Además de esta definición proporcionada por la Unión Europea, son varias las definiciones propuestas para este concepto y que son empleadas hoy día. Así, para la US Environmental Protection Agency (EPA) Risk Assessment Forum<sup>4</sup> un disruptor endocrino es un agente exógeno que interfiere en la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación de las hormonas naturales del cuerpo responsables del mantenimiento de la homeostasis, reproducción, desarrollo y/o comportamiento. The International Programme on Chemical Safety (IPCS)<sup>37</sup> lo define como “*una sustancia exógena o mezcla de sustancias que altera las funciones del sistema endocrino y consecuentemente causa efectos adversos sobre la salud en organismos sanos o en su descendencia*” y disruptor endocrino potencial como “*sustancia exógena o mezcla de sustancias que posee propiedades que podrían originar disrupción endocrina en un*

<sup>36</sup>European Commission DGXII, Report EUR 17549, Brussels (1997).

<sup>37</sup>International Programme on Chemical Safety. Report of IPCS/OECD Scopin Meeting on Endocrine Disrupters, Washington (1998)

*organismo sano o en su descendencia*". Finalmente, la US EPA's Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC)<sup>38</sup> lo define como "*compuesto químico o mezcla que altera la estructura o funciones de el sistema endocrino, y causa efectos adversos a nivel de organismo, en su descendencia, en poblaciones o subpoblaciones de organismos, basado en principios científicos, datos, evidencias y principios de precaución*", esta última proposición presenta un problema añadido y es la definición de la palabra "adverso".

Es importante conocer los efectos toxicológicos producidos por este tipo de compuestos y detectarlos por medio de test de toxicidad. Por ejemplo, en los últimos años se ha demostrado que el estrógeno sintético dietilstilbestrol (DES), ampliamente utilizado en décadas pasadas como medicamento para prevenir abortos y ayudar en embarazos complicados, está implicado en el aumento del número de abortos producidos, muertes de recién nacidos y nacimientos prematuros, así como en determinadas anomalías en las mujeres tratadas con esta sustancia, como el incremento en la incidencia del adenocarcinoma vaginal<sup>39</sup>.

### **3.2. Definición de estrógeno**

Los estrógenos naturales o estrógenos "endógenos" constituyen una clase de hormonas esteroideas cuya propiedad común es regular el crecimiento, desarrollo y diferenciación de los órganos sexuales secundarios en la hembra. Las hormonas estrogénicas juegan un papel primordial en el desarrollo de los vertebrados: son indispensables para la gestación y el desarrollo embrionario y ocupan un lugar preferente en la regulación de la fertilidad en la hembra. En los mamíferos la estructura química de las hormonas estrogénicas es exclusivamente de tipo esteroideo<sup>40</sup>, estando representadas fundamentalmente por el estradiol - 17 $\beta$ , la estrona y el estriol.

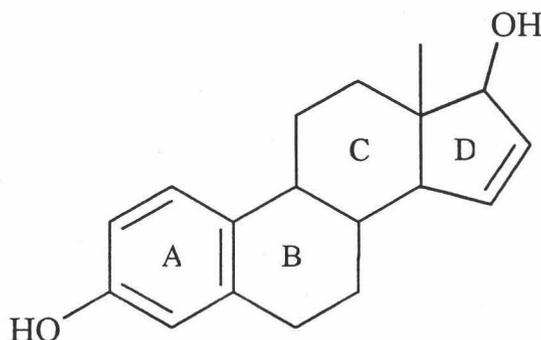
---

<sup>38</sup>Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee. *Final Report*, EPA, Washington (1998).

<sup>39</sup>Herbst A.L., Ulfelder H. and Poskanzer D.C. *National English Journal of Medicine*, 284, 878 (1971)

<sup>40</sup>McLachlan, J.A. "*Estrogen in the Environment*". Ed Elsevier, New York (1979).

Los estrógenos naturales son moléculas relativamente rígidas, lipofílicas con pesos moleculares de alrededor de 300 Da. Tradicionalmente se ha considerado que los requerimientos estructurales necesarios para que un compuesto químico tenga actividad estrogénica se resumen en: 1) Un anillo fenólico insaturado (A), con el carbono en posición 3 ligado a un grupo hidroxilo, 2) existencia de un grupo cetónico o hidroxilo en el carbono 17 del anillo D y 3) Un grupo metilo en posición angular unido al carbono 13 entre los anillos C y D.



*Figura 3.1. Estructura química de un estrógeno natural.*

La estructura de los anillos C y D parece ser de menor importancia ya que su ruptura o la presencia de cadenas alifáticas saturadas no conlleva pérdida de actividad biológica<sup>41</sup>. Es interesante resaltar que en todos estos casos se mantiene la distancia entre los carbonos 3 y 16-17, hecho común en muchas de las moléculas químicas con actividad estrogénica conocida. Así, a pesar de la aparente diversidad estructural, los potentes estrógenos sintéticos hexestrol o dietilestilbestrol (DES) mantienen esa relación de proporciones<sup>42</sup> presentando dos grupos fenólicos, llamados anillos  $\phi$ - $\phi'$ , separados por una cadena hidrocarbonada. Estudios cristalográficos han demostrado que estos estrógenos sintéticos en configuración "trans" son muy semejantes a estradiol - 17 $\beta$ . Posiblemente esta estereoquímica es obligada para la unión del estrógeno a sus receptores específicos o proteínas celulares de interacción.

<sup>41</sup>Allen, E., Smith, G.M.; Gardner, W.U. *American Journal of Anatomy*, **61**, 321 (1936).

<sup>42</sup>Leclercq, G. and Heuson, J.C. *Biochemical and Biophysic Acta*, **560**, 427 (1979).

Por otra parte, en las plantas y los hongos se han descrito compuestos químicos con estructura no esteroidea que tienen actividad estrogénica cuando son administrados a los animales, a tales estrógenos naturales se les conoce con el nombre de fitoestrógenos y micoestrógenos, dependiendo de su origen. La función de estos compuestos en las propias plantas no es conocida y se especula con la idea de que actúan en los mecanismos de defensa frente a herbívoros y agentes patógenos<sup>43,44</sup>. Se han descrito fitoestrógenos con muy diferente filiación química<sup>45</sup>; entre ellos destacan los Cúmenanos, como el cumestrol, las isoflavonas, como la genisteína, las dihidrochalconas, como el floretín, las lactonas del ácido resorcílico como la zearalenona, y otros compuestos como las saponinas de algunas plantas (diosgeninas), los esteroides (sitosteroides) y varios ácidos orgánicos (Ácido podocárpico y giberélico) completan la lista de estrógenos naturales<sup>46</sup>.

Finalmente, la industria química de síntesis ha desarrollado nuevos compuestos químicos con estructuras muy diferentes que presentan actividad estrogénica en modelos animales. Dentro de este grupo de “estrógenos sintéticos” destacan los hidroxiestilbenos entre los que se encuentra el conocido dietilestilbestrol y el hexestrol.

Además de los estrógenos naturales, se ha descrito actividad estrogénica “in vitro” en numerosos compuestos sintetizados por el hombre y empleados en multitud de campos de su desarrollo.

Algunos *plaguicidas organoclorados* de muy diferente estructura y origen químico presentan actividad estrogénica. Desde la segunda mitad del siglo XIX se sintetizaban ésteres fosfóricos, compuestos similares a los pesticidas organofosforados, el mismo DDT fue sintetizado por Zeider en 1873. Es a partir de 1950 cuando se intensifica la investigación de moléculas orgánicas con actividad pesticida y se sintetiza

<sup>43</sup>Schutt, D.A. *Endeavor*, 35, 110 (1976).

<sup>44</sup>Verdeal, K., Ryan, D.S. *Journal of Food Protection* 42, 577 (1979).

<sup>45</sup>Miksicek, R.J. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 49 (2/3), 153 (1994).

<sup>46</sup>Farnsworth N.R., Bingel A.S., Cordell G.A., Grane, F.A. and Fong H.H.S. *Journal of Pharmaceutical Science*, 64, 535 (1995).

un importante número de ellos<sup>47</sup>. Cuando Miller descubrió las propiedades insecticidas del DDT inició una revolución en este campo desencadenando la incorporación de productos derivados de síntesis orgánica a la lucha contra plagas y enfermedades transmisibles. Además, al ser el DDT un derivado clorado se abrió, a su vez, un camino de búsqueda de materias activas dentro de este campo, así el hexaclorociclohexano (HCH), sigue en historia y popularidad al DDT. Se trata de una mezcla de isómeros que condicionan su actividad insecticida. Existen otros insecticidas importantes que tendiendo a su constitución química se agrupan en tres series. Derivados del dimetanaftaleno como el aldrín, dieldrín, isodrín y endrín, derivados del indano como clordano y heptacloro y derivados de biciclohepteno como el telodrín, endosulfán, ciclodán y bromodán.

Otro grupo de compuestos con actividad estrogénica son los denominados *bifenilos policlorados* (PCBs). Se han descrito algunos PCBs, con actividad hormonal de carácter estrogénico sobre todo aquellos con baja cloración que pueden ser "activados" mediante decloración-hidroxilación<sup>48,49</sup>. Con este término genérico, se denominan un gran número de derivados clorados del bifenilo. Hay un total de 210 posibles combinaciones, pero sólo se ha dispuesto de 102 combinaciones comerciales con diferente contenido en cloro. Algunas propiedades como su liposolubilidad y estabilidad hace que se busquen debido a su bioacumulación, en la cadena alimentaria. Por vía gastrointestinal se estima que se absorbe más del 90% de estas sustancias. Son almacenados inicialmente en el tejido adiposo, con concentraciones intermedias en la piel, glándulas adrenales, aorta y bajas concentraciones en sangre. Las concentraciones decrecen con el tiempo más rápidamente en sangre y lentamente en tejido adiposo. Se estima que la vida media biológica en ratas macho es de 8 semanas y en la hembra de 12 semanas.

<sup>47</sup>Barbera, C. *Pesticidas agrícolas*. Ed. Omega, 4ª edición, Barcelona (1989).

<sup>48</sup>Brotons J.A., Olea-Serrano M.F., Villalobos M., Pedraza P. and Olea N. *Environmental Health Perspectives*, **103**, 608 (1995).

<sup>49</sup>Wolff M.S., Toniolo P.G., Lee E.W., Rivera M., Dubin N. *Journal of National Cancer Institute*, **85**, 648 (1993).

Así mismo los *alquifenoles y derivados* de los que en la actualidad se sabe que los de cadena C-5 a C-12 presentan efecto estrogénico. Estos compuestos se utilizan ampliamente como surfactantes y aditivos de materiales plásticos. Se trata de estructuras químicas sencillas en las que predomina un anillo fenólico y una cadena, ramificada o no, que contiene el grupo alquilo. En 1992 se publicó el primer trabajo sobre la estrogénicidad de los alquilfenoles con cadenas de 5 a 14 carbonos<sup>50</sup>. Dentro de este grupo se incluyen alcoholetoxilatos, ésteres de ácidos grasos y de poliglicoles, alquifenoles polietoxilatos, etc. En su biodegradación desaparece la parte del etoxilato, mientras que el radical fenol da origen a residuos más tóxicos y no biodegradables. La concentración media de los lodos de estaciones depuradoras puede elevarse hasta 1g/Kg de peso seco. La legislación europea se atiene a la biodegradabilidad del 80% para tensioactivos no iónicos. Ningún país ha establecido hasta el momento límites respecto al producto completo, sólo respecto a su degradación.

Finalmente, otro grupo de compuestos químicos sintéticos con actividad estrogénica está representado por los *materiales plásticos* y los *polímeros sintéticos* ampliamente utilizados en la actualidad, tanto por la universalidad de su empleo como por la cantidad de material manufacturado. Algunos monómeros constituyentes de plásticos y polímeros sintéticos, caso de los bisfenoles, han demostrado estar dotados de actividad hormonal en diferentes sistemas biológicos y pueden ser contaminantes de alimentos y productos manufacturados<sup>51</sup>. La bibliografía consultada, demuestra que el menos activo de la familia de los bisfenoles es el más simple de ellos, es decir el bisfenol F, en el que no existe ningún sustituyente en el carbono central, lo cual indica que al sustituir los H por grupos alquilo la actividad aumenta. Por otra parte de los derivados de estos compuestos estudiados a lo largo de esta Memoria, el bis-DMA presenta una actividad estrogénica notable<sup>52</sup>, los oligómeros BADGE y BFDGE son débilmente estrogénicos, y el polímero bis-GMA no presenta actividad estrogénica. Sin embargo cuando estos compuestos derivados de bisfenol A y F son sometidos a

<sup>50</sup>Soto A.M., Lin T.M., Justicia H., Silvia R.M. and Sonnenschein C.A. *Advances in Modern Environmental Toxicology*, 23, 87 (1985).

<sup>51</sup>Primo-Yufer E. *Química agrícola*. Ed. Alhambra, Madrid (1979).

<sup>52</sup>Schafer T.E., Lapp C.A., Hanes C.M., Lewis J.B., Wataha J.C and Schuster G.S. *Journal of Biomedical Material Research*, 45, 192 (1999).

tratamientos hidrolíticos en medio ácido o básico se produce la aparición de dicha actividad. El análisis cromatográfico de las muestras hidrolizadas demuestra la presencia de bisfenol, liberado del producto tras el tratamiento<sup>53</sup>. Es decir, la degradación de estos derivados, genera monómeros libres con actividad biológica. Se han estudiado por tanto las vías metabólicas de degradación de algunas resinas epoxi y derivados difenólicos en ratones<sup>54,55,56</sup>. Así por ejemplo, se sabe que el BADGE es metabolizado mediante dealquilación oxidativa para dar un derivado difenólico.

### 3.3. Tests para la determinación de la actividad estrógena.

El reconocimiento de compuestos químicos con actividad hormonal se ha visto dificultado durante años fundamentalmente por dos causas: 1) la complejidad de los tests predictivos y 2) la imposibilidad de atribuir a un compuesto químico actividad de tipo hormonal tomando como base la simple observación de su estructura molecular.

A pesar del gran interés en la identificación de los compuestos químicos dotados de actividad estrogénica o xenoestrógenos, son pocos los bioensayos que se reconocen en la actualidad como instrumentos útiles para la identificación de sustancias químicas con esta actividad hormonal<sup>57</sup>. A continuación se comentan brevemente los tests de identificación de actividad estrogénica más empleados en la actualidad.

#### 3.3.1. Test de cornificación vaginal.

Se basa en la capacidad de una sustancia química para inducir la fase de "estro" cuando se inyecta en un animal, generalmente ratón o rata hembra, previamente castrado. La técnica del test ha permanecido casi invariable desde su descripción en 1923 por Allen y Doisy, siendo el examen microscópico del epitelio vaginal la forma usual de evaluar la transformación estrogénica del animal receptivo. Habitualmente la

<sup>53</sup>Olea N., Pulgar R., Pérez P., Oleá Serrano F., Rivas A., Novillo A., Pedraza V., Soto A.M. and Sonnenschein C. *Environmental Health Perspectives*, **104**, 298 (1996).

<sup>54</sup>Climie I.J.G. *Xenobiotics*, **1**, 391 (1981).

<sup>55</sup>Climie I.J.G. *Xenobiotics*, **6**, 401 (1981).

<sup>56</sup>Steiner S., Houper G. and Saglsdorf P. *Carcinogenesis*, **13**, 969 (1992).

<sup>57</sup>Korach K.S. and MacLachlan J.A. *Environmental Health Perspectives*, **103**, 5 (1995).

actividad de una sustancia se expresa en unidades internacionales, siendo la U.I. la cantidad de estrógeno natural capaz de inducir el "estro".

### 3.3.2. *Test de incremento del peso uterino.*

Este test identifica un potencial estrógeno mediante la evaluación del incremento del peso uterino tras la aplicación subcutánea de la sustancia estrogénica a un animal hembra inmaduro u ovariectomizado<sup>58</sup>. Se aconseja realizar el tratamiento del animal mediante inyección diaria durante tres días y sacrificio al cuarto día. Al final de este periodo, los úteros son extraídos, eliminando el tejido parametrial y grasa y a continuación pesados. Las diferencias de peso frente a grupos de úteros control, no tratados, sirve para cuantificar el efecto e identificar al estrógeno.

### 3.3.3. *Test del enlace competitivo con el receptor estrogénico.*

Se basa en la demostración previa de la existencia de una proteína conocida como "receptor estrogénico" (RE) aislada en aquellos tejidos subsidiarios de la acción estrogénica, a la cual se unen, específicamente, estrógenos naturales y aquellas sustancias con probada acción hormonal<sup>59</sup>. Se ha defendido durante los últimos años la hipótesis de que tras la unión del estrógeno al receptor estrogénico se produce una alteración conformacional de éste último, el cual queda capacitado para unirse al ADN intranuclear desencadenando la expresión de ciertos genes relacionados con la síntesis proteica y la proliferación celular. El ensayo fue descrito para su uso "in vivo" pero fue posteriormente adaptado al laboratorio

### 3.3.4. *Tests de expresión génica e inducción de proteínas.*

Son tests en los cuales se emplean proteínas estrógeno-sensibles. Entre ellos cabe destacar tres tipos.

<sup>58</sup> Astwood E.B. *Endocrinology*, **23**, 25 (1938).

<sup>59</sup> Jensen E.V. *Recent Programme on Hormones*, **18**, 387 (1962).

#### 3.3.4.1. *Test de la vitelogenina.*

La vitelogenina es una proteína que se sintetiza en el hígado de los vertebrados ovíparos bajo control de los estrógenos, principalmente en hembras, aunque en determinadas condiciones también se puede inducir su síntesis en machos. El test utiliza un anticuerpo capaz de reconocer a la proteína en diferentes especies animales lo cual permite su cuantificación. Este test ha sido recientemente estandarizado entre los ensayos de exposición ambiental a xenoestrógenos de vertebrados ovíparos<sup>60</sup>.

#### 3.3.4.2. *Test de lactoferrina .*

La lactoferrina es otra proteína estrógeno inducible detectada en tejido uterino sometido al estímulo hormonal. Se trata de una proteína de 68-70 kDaltons capaz de ligar hierro y cuyo gen pertenece a la familia de las transferrinas. Se ha propuesto el empleo de la cuantificación de lactoferrina como biomarcador de exposición a xenoestrógenos en mamíferos de forma similar al empleo de la vitelogenina en el caso de peces y reptiles<sup>61</sup>.

#### 3.3.4.3. *Ensayo CAT.*

Korach y colaboradores clonaron los elementos de respuesta estrogénica (ERE) del gen de la vitelogenina, el cual se expresa bajo la acción estrogénica una vez que el complejo ligando-receptor se ha unido a esa secuencia ERE. La secuencia fue entonces insertada en un vector y convertida en un gen-reporter y a su vez transfectada sobre células de cáncer mamario MCF7. Cuando las células son tratadas con estradiol-17 $\beta$ , se forma el complejo E-RE, éste se une a la secuencia ERE y se expresa el gen insertado. En este caso el gen expresado es un enzima de origen bacteriano, acetiltransferasa del cloranfenicol, cuya actividad puede ser mediada de muy diferentes maneras.

<sup>60</sup>Heppell S.A., Denslow N.D., Folmar L.C. and Sullivan C.V. *Environmental Health Perspectives*, **103**, 9 (1995).

<sup>61</sup>Teng G et all. *Environmental Health Perspectives*, **103**, 17 (1995).

### 3.3.5. Ensayos estrógeno dependiente. Ensayo de E-Screen.

Son tests en los cuales se emplean células de tejidos estrógeno-sensibles, en muchas ocasiones de origen humano, establecidas en cultivo a largo plazo y que pueden ser fácilmente tratadas con estradiol-17 $\beta$  o cualquier compuesto químico sospechoso de ser un estrógeno. Estos ensayos finalizan con la cuantificación de la proliferación celular tras varios días de subcultivo, o midiendo la expresión de algún gen que codifica una proteína específica, en ese modelo, de la acción hormonal. Se establecen, además, los controles mediante el mantenimiento de grupos celulares en medio libre de estrógenos. Entre ellos se encuentra el ensayo E-SCREEN<sup>62</sup> utilizado en esta Memoria.

En 1992 Soto y colaboradores presentaron un test de estrogenicidad que fue patentado bajo el nombre de E-SCREEN basado en el empleo de las células MCF7 en cultivo en monocapa. El test pone de manifiesto la actividad estrogénica de un compuesto químico basándose exclusivamente en la observación de su capacidad proliferativa. Se ha señalado que es primordial la elección del clon de células MCF7 para que la respuesta en el E-SCREEN sea óptima. El desarrollo metodológico del llamado test E-SCREEN ha venido a facilitar el "screening" rápido y fiable de gran número de compuestos en los que se quiere demostrar una actividad hormonal de carácter estrogénico.

De forma resumida el ensayo se basa en el estudio de la actividad proliferativa de un compuesto químico sobre un cultivo celular "in vitro" de células de cáncer de mama humano MCF7. Estas células responden con un incremento significativo del índice proliferativo a la acción exclusiva de los estrógenos naturales en concentraciones picomolares<sup>63</sup>. Se ha recomendado el uso de las células MCF7 sobre otras células mamarias debido al conocimiento previo de su dependencia hormonal.

<sup>62</sup>Soto A.M, Lin T.M., Justicia H., Silvia R.M. and Sonnenschein C. Ed. Princenton, *Princenton Scientific Publishing* 295 (1992). Patente USA 4,859,585

<sup>63</sup>Soto A.M. and Sonnenschein. *Journal of Steroid Biochemistry*. 23, 87 (1985).

### 3.4. Efectos de la exposición a estos compuestos.

Aunque ya en 1936 Dodds y Lawson describieron la actividad estrogénica "in vivo" de algunos derivados bifenólicos<sup>64</sup>, durante muchos años no se había asociado el carácter hormonal estrogénico de estos con su empleo creciente en la industria química de síntesis. A partir de 1969 en diversas ocasiones han aparecido informes que asociaban ciertos casos de ginecomastia, pubertad precoz y otros problemas endocrinos al consumo abusivo de ciertos compuestos químicos. Hoy día, esto ha dejado de ser una "anécdota" y está pasando a ser un problema a considerar, ya que se está demostrando la existencia de una fuerte relación<sup>65</sup> entre la exposición a compuestos estrogénicos como los bisfenoles y los desequilibrios hormonales encontrados en numerosos individuos, la proliferación del cáncer principalmente de mama, o la feminización de los individuos macho (peces encontrados en varios lagos de Gran Bretaña). Efectos que pueden ser comparables a los observados después de la administración de estrógenos naturales a hombres, en los que se observa un descenso acusado en la producción de testosterona y reducción de la espermatogénesis.

Numerosos investigadores han estudiado estos efectos sobre la salud humana, algunos de los cuales se muestran a continuación.

#### 3.4.1. Reducciones temporales en la calidad y cantidad de semen.

Un estudio realizado por Carlsen y colaboradores ha demostrado que el número de espermatozoides por volumen de semen analizado, ha descendido entre los años 1938 y 1990 en un 0.8 % anual<sup>66</sup>. Así mismo estudios de morfología testicular realizados en Finlandia sugieren una reducción en la espermatogénesis<sup>67</sup> en la década comprendida entre 1981 y 1991, encontrándose unas considerables variaciones en el

<sup>64</sup>Dodds E.C. and Lawson W. *Nature*, 996 (1936).

<sup>65</sup>Sonnenschein C., Soto A.M., Fernández M.F., Olea N., Olea-Serrano M.F. and Ruíz López M.D. *Clinical Chemistry*. (1995).

<sup>66</sup>Carlsen E., Giwercman A., Keiding N. and Skakkebaek N.E. *Br. Medical Journal*, 332, 281 (1995).

<sup>67</sup>Pajarinen J., Laippala P., Penttila A. and Karhunen P.J. *Br. Medical Journal*, 314, 13 (1997).

número de espermatozoides en función de las zonas geográficas<sup>68,69</sup>. Parece por tanto evidente que en determinados países, la cantidad y calidad del semen producido por sus habitantes varones ha descendido y, aunque la incidencia en el descenso de la fertilidad en la población es difícil de medir, se sabe que la calidad del semen es un factor principal en la fertilidad del hombre.

### 3.4.2. *Cáncer testicular.*

Se ha observado un aumento en la incidencia del cáncer de testículo en países, como los situados en la zona del mar Báltico, Alemania, Reino Unido, Estados Unidos y Nueva Zelanda<sup>70,71</sup>, con una incidencia notablemente creciente en países del Norte de Europa como Dinamarca o Finlandia.

Así mismo, se ha observado un incremento en los casos de cáncer de próstata en estos países<sup>72</sup>.

### 3.4.3. *Malformaciones congénitas.*

También se ha observado un incremento en la incidencia de malformaciones congénitas<sup>73</sup> en los individuos como el criptorchidismo (no descenso de los testículos) y las hipospadias (malformaciones en el pene).

### 3.4.4. *Alteraciones en los porcentajes de sexos.*

Un estudio realizado en una zona contaminada en Svesso, Italia, tras un accidente por disruptores endocrinos en 1976, demuestra que entre 1977 y 1984, de los

<sup>68</sup>Fish H., Goluboff E.T. Olson J.H., Feldshuh J., Broder S.H. and Barod D.H. *Fertility and Sterility*, **64**, 1009 (1996).

<sup>69</sup>Fish H., Ikeguch I.F and Goluboff E.T. *Urology*, **48**, 909 (1996).

<sup>70</sup>Brow L.M., Pottern L.M. Hoover R.N., Devesa S.S, Aselton P. and Flannery J.T. *International Journal of Epidemiology*, **15**, 164 (1986)

<sup>71</sup>Adami H.O., Bergström R., Möhner M., Zatonski W., Storm H., Ekblom A., Tretli S., Teppo L., Zeigler H., Rahu M., Gurevicius R. And Stengrevics A. *International Journal of Cancer*, **59**, 33 (1994).

<sup>72</sup>Merril R.M. and Brawley O.W. *Epidemiology*, **8**, 126 (1997).

<sup>73</sup>World Health Organization. *Editorial Elsevier*, Oxford, pag 113 (1991).

74 nacimientos ocurridos en la zona más duramente contaminada, 48 fueron niñas mientras que tan solo 26 fueron niños. Este mismo estudio realizado en la misma zona entre los años 1985 y 1994, demuestra que los nacimientos producidos fueron aproximadamente 50 % niños y niñas. Este hecho sugiere que la exposición de ambos progenitores a los compuestos vertidos al ambiente durante el accidente, produjo el desequilibrio en los nacimientos.

#### 3.4.5. *Cáncer de mama en mujeres.*

Otro efecto observado es el incremento en el número de casos de cáncer de mama en los países citados con anterioridad<sup>74</sup>. Estudios realizados en Finlandia, por ejemplo, demuestran que la incidencia de este tipo de cáncer aumentó en un 1 % anual en los años comprendidos entre 1953 y 1980.

#### 3.4.6. *Efectos neurológicos.*

Es un hecho demostrado que uno de las partes del cuerpo humano más afectada por la acción de los esteroides es el cerebro. En los últimos años se está demostrando la influencia de la presencia de disruptores endocrinos sobre el desarrollo y comportamiento del cerebro, apareciendo efectos negativos sobre las funciones neurológicas e intelectuales (memoria y atención), así mismo se especula que la exposición a contaminantes ambientales puede influir en el desarrollo sexual humano y en el comportamiento sexual<sup>75</sup>.

#### 3.4.7. *Alteraciones genéticas.*

Atkinson y Roy<sup>76,77</sup>, han puesto de manifiesto la capacidad que posee el bisfenol A para unirse, mediante enlaces covalentes, al ADN previa oxidación hasta bisfenol o-

<sup>74</sup>Quinn M. and Allen E. *Br. Medical Journal*, **311**, 1391 (1995).

<sup>75</sup>Whitten P.L. *Advances in Modern Environmental Toxicology*, **21**, 311 (1992).

<sup>76</sup>Atkison A. and Roy D. *Environmental & Molecular Mutagenesis*, **26** (1), 60 (1995).

<sup>77</sup>Roy D. Palangat M., Chen C.W., Thomas R.D., Colerangle J., Atkinson A. and Yan Z.J. *Journal of Toxicology & Environmental Health*, **50** (1), 1 (1997).

quinona dando lugar a la formación de aductos. Esta actuación hace pensar en los bisfenoles como responsables de aberraciones genéticas, alteraciones hepáticas como el cáncer de hígado y otras disfunciones fisiológicas.

#### *3.4.8. Otros efectos posibles*

También se ha sugerido que la disrupción endocrina puede estar implicada, entre otros, en el aumento de la incidencia de la endometriosis en mujeres, enfermedades cardiovasculares, desórdenes tiroidales y deficiencias en el sistema inmune.

Actualmente, no está totalmente establecida la relación entre el incremento en la incidencia de todos los problemas citados a lo largo de este apartado y la exposición a sustancias químicas con actividad disruptora endocrina, lo que si está claramente definido es que muchas de las anormalidades citadas, así como los tumores de testículo, próstata o mama son generalmente sensibles y responden proliferando ante la presencia de este tipo de compuestos, de hecho en el tratamiento médico de este tipo de enfermedades, se suelen emplear compuestos cuya misión es la de inhibir la acción hormonal. Este hecho pone de manifiesto la implicación las hormonas sexuales en todo este tipo de procesos y por tanto los compuestos químicos capaces de mimetizarlas. Por tanto parece evidente que estos compuestos, junto a otros factores, como el tipo de vida, hábitos alimentarios o los cambios climáticos están implicados en la aparición y proliferación de numerosas de enfermedades.

#### 4. ANÁLISIS DE BISFENOLES Y COMPUESTOS RELACIONADOS.

Son numerosos los métodos de análisis e identificación de bisfenoles y compuestos relacionados que se han propuesto en los últimos años.

Hasta finales de la década de los años 80 y principio de los 90 este tipo de compuestos no han sido considerados como sustancias tóxicas y peligrosas para el ambiente y las poblaciones que lo habitan. Este hecho parece ser el principal factor que ha motivado la escasa atención prestada a estos compuestos, de modo que la mayor parte de los trabajos de identificación y determinación de bisfenoles y compuestos relacionados con ellos han sido desarrollados durante los últimos años. De hecho, en la actualidad existe un gran número de grupos de investigación, dedicados al desarrollo de metodología analítica para su determinación en matrices diversas y haciendo uso en la mayoría de los casos de técnicas separativas.

Las matrices objeto de análisis son de naturaleza muy diversa, destacando aguas naturales de distinta procedencia, aguas residuales, fangos, aire, plásticos, resinas, alimentos, composites y selladores dentales e incluso tejidos animales y fluidos biológicos como salivas y suero humano.

Las técnicas aplicadas dependen básicamente de las propiedades del compuesto y de la matriz en la que se encuentren. Generalmente, se encuentran involucradas etapas previas de separación con objeto de minimizar o eliminar posibles interferentes y en muchas ocasiones se requiere además el empleo de una adecuada etapa de preconcentración que permita adecuar la concentración del compuesto al rango lineal del método elegido. Entre las técnicas más empleadas en la actualidad para la identificación y determinación de bisfenoles y compuestos relacionados se encuentran las técnicas cromatográficas y espectroscópicas. A continuación se comentan algunos de los métodos analíticos encontrados en bibliografía.

#### 4.1. Métodos cromatográficos.

Se han empleado principalmente las siguientes técnicas: cromatografía de gases (CG), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y cromatografía en capa fina (TLC), en combinación con diferentes tipos de detectores. A continuación se comentan brevemente.

##### 4.1.1. *Cromatografía de gases.*

La cromatografía de gases permite la detección y determinación de sustancias suficientemente volátiles y estables térmicamente, o que pueden llegar a serlo mediante una adecuada reacción de derivatización. Los compuestos objeto de estudio son moléculas térmicamente estables y en la mayoría de los casos suficientemente volátiles, y por tanto esta técnica se ha aplicado al análisis de tales compuestos.

La sensibilidad, selectividad y resolución dependen del detector empleado y del tipo de columna. Como sistema de detección se proponen detectores de ionización de llama (FID) y principalmente espectrometría de masas (MS), ya que esta técnica además, de ser útil para la cuantificación de los compuestos, permite así mismo la identificación de los mismos y la relativamente baja sensibilidad obtenida operando en modo barrido (SCAN) puede ser paliada en parte con la posibilidad de trabajar en modo SIM (Selected Ion Monitoring) detectando uno o varios iones del espectro de masas, con lo que el detector observa mayor número de impactos y origina mayor respuesta analítica. Así mismo se recurre en ciertos casos al empleo de reacciones de derivatización y procedimientos de preconcentración como extracción y microextracción en fase sólida o líquido-líquido.

En la tabla 4.1 se muestran algunos de los métodos analíticos existentes en bibliografía que emplean esta técnica con indicación del tipo de detector empleado en la identificación y/o determinación de los compuestos implicados, los límites de detección obtenidos y la naturaleza de la matriz en la que se lleva a cabo la determinación.

Tabla 4.1. Análisis por cromatografía de gases.

Compuesto	Detector	LD	Matriz
<sup>78</sup> Bisfenol A	FID	Identificación	Patrón comercial de bisfenol A
<sup>79</sup> Bisfenol A	MS	Identificación	---
<sup>80</sup> TEGDMA Bis-GMA	FID	Identificación	Composites dentales
<sup>81</sup> BADGE BFDGE	MS	Identificación	Barniz
<sup>82</sup> Bisfenol A	MS	0.6 µg·l <sup>-1</sup>	Aguas naturales
<sup>83</sup> Bisfenol A	MS	0.4 ng·l <sup>-1</sup>	Aguas naturales
<sup>84</sup> Bisfenol A	MS	1.0 µg·l <sup>-1</sup>	Revestimientos en latas de conserva
<sup>85</sup> Bisfenol A BADGE	MS	0.1 ng·g <sup>-1</sup> 13.0 ng·g <sup>-1</sup>	Comidas en conserva
<sup>86</sup> Bisfenol A	MS	2.0 ng·g <sup>-1</sup>	Plásticos
<sup>87</sup> Bisfenol A	MS	6.0 ng·l <sup>-1</sup> 50 ng·g <sup>-1</sup>	Aguas residuales municipales Fangos
<sup>88</sup> Bisfenol A	MS	5.0 ng·l <sup>-1</sup>	Aguas residuales
<sup>89</sup> Bisfenol A	MS	20 ng·l <sup>-1</sup>	Aguas
<sup>90</sup> Bisfenol A	MS	0.5 µg·l <sup>-1</sup>	Aguas residuales industriales
<sup>91</sup> Bisfenol A	MS	0.5 µg·l <sup>-1</sup>	Filtraciones de vertederos
<sup>92</sup> Bisfenol A Fenol	MS	0.5 µg·l <sup>-1</sup> 1.0 µg·l <sup>-1</sup>	Aguas naturales

<sup>78</sup>Brydia L.E. *Analytical Chemistry*, **40** (14), 2212 (1968).

<sup>79</sup>Lingon W.V and Grade H. *Analytical Chemistry*, **63** (3), 255 (1991).

<sup>80</sup>Tanaka K., Taira M., Shintani H., Wakasa K. and Yamaki M. *Journal of Oral Rehabilitation*, **18**, 353 (1991).

<sup>81</sup>Cottier S., Riquet A.M, Feigenbaum A., Pollet B., Lapierre C. and Mortreuil P. *Journal of Chromatography A*, **771**, 366 (1997).

<sup>82</sup>del Olmo M., González A., Navas N.A. and Vilchez J.L. *Analytica Chimica Acta*, **?**, **?** (1997).

<sup>83</sup>González A, Navas N, del Olmo M and Vilchez J.L. *Journal of Chromatographic Science*, **36**, 565 (1998)

<sup>84</sup>Wingender R.J. and Niketas P. *Journal of Coating Technology*, **70**, 69 (1998).

<sup>85</sup>Salafranca J., Batlle R. And Nerín C., *Journal of Chromatography A*, **864**, 137 (1999).

<sup>86</sup>Yamamoto T. And Yasuhara A., *Chemosphere*, **38**, 2569 (1999).

<sup>87</sup>Lee H.B and Peart T.E., *Journal of AOAC International*, **83**, 290 (2000).

<sup>88</sup>Mol H.G.J, Sunarto S. and Steijger O.M. *Journal of Chromatography A*, **879**, 97 (2000).

<sup>89</sup>Bolz U., Körner W and Hagenmaier H., *Chemosphere*, **40**, 928 (2000).

<sup>90</sup>Fürhacker M. Scharf S and Weber H., *Chemosphere*, **41**, 751 (2000).

<sup>91</sup>Yamamoto T., Yasuhara A, Shiraishi H and Nakasugi O., *Chemosphere*, **42**, 415 (2001).

<sup>92</sup>Helaleh M.I.H., Takabayashi Y., Fujii S. and Korenaga T., *Analytica Chimica Acta*, **428**, 227 (2001).

Se observa que en la mayor parte de los casos, el detector empleado es el espectrómetro de masas, y el compuesto estudiado es el bisfenol A. Así mismo, las matrices en las que se realiza cuantificación son mayoritariamente ambientales, aunque se aplica a algunos materiales relacionados con la industria de envasado de alimentos.

#### **4.1.2. Cromatografía de líquidos.**

La cromatografía de líquidos en cualquiera de sus modalidades tanto en fase normal como reversa, no está limitada por la volatilidad o estabilidad térmica de la muestra, pudiéndose separar por tanto macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales de alto peso molecular. El requerimiento básico para que un compuesto pueda ser determinado mediante cromatografía de líquidos es que sea suficientemente soluble en la fase móvil, propiedad que poseen los compuestos objeto de estudio en esta Memoria, ya que todos ellos son altamente solubles en los disolventes orgánicos empleados habitualmente en esta técnica como fases móviles.

La bibliografía consultada, demuestra que ésta ha sido la técnica más aplicada en la identificación y análisis de bisfenoles y compuestos relacionados con él. Se ha aplicado en numerosas matrices tanto ambientales como biológicas empleando una gran diversidad de detectores, como espectrometría de masas (MS), fluorescencia (FD), detección electroquímica (ED) y absorción molecular ultravioleta visible (UV-vis). En la tabla 4.2 se muestran algunos de los trabajos publicados en los últimos años.

Tabla 4.2. Análisis por cromatografía de líquidos.

Compuesto	Detector	LD	Matriz
<sup>93</sup> BADGE BFDGE	UV-vis	< 1.0 µg·l <sup>-1</sup> < 1.0 µg·l <sup>-1</sup>	Aguas
<sup>94</sup> Bisfenol A	VD	0.25 ng·l <sup>-1</sup>	Degradación de productos derivados
<sup>95</sup> Bisfenol A	ED	25.0 ng·m <sup>-3</sup>	Aire
<sup>96</sup> BADGE BFDGE	FD	Identificación	Food simulants
<sup>97</sup> Bisfenol A Bisfenol F	FD	6.0 µg·l <sup>-1</sup> 4.0 µg·l <sup>-1</sup>	Resinas epoxi no curadas
<sup>98</sup> BADGE	FD	<2.0 µg·l <sup>-1</sup>	Food simulants
<sup>99</sup> Bisfenol A	ED MS	0.2 µg·l <sup>-1</sup> 0.1 µg·l <sup>-1</sup>	Suero humano
<sup>100</sup> Bisfenol A BADGE Bis-DMA bis-GMA	MS	0.20 mg·l <sup>-1</sup> 0.90 mg·l <sup>-1</sup> 0.40 mg·l <sup>-1</sup> 0.30 mg·l <sup>-1</sup>	Composites y selladores dentales.
<sup>101</sup> TEGDMA Bisfenol A bis-GMA	UV-vis	Identificación	Migración a aguas, disolventes orgánicos y suero humano
<sup>102</sup> Bisfenol A	ED	10.0 ng·l <sup>-1</sup>	Aguas naturales Suero humano
<sup>103</sup> Bisfenol A	QD	0.4 µg·l <sup>-1</sup>	Biberones
<sup>104</sup> Bisfenol A	MS	50.0 ng·g <sup>-1</sup>	Tejidos de peces

<sup>93</sup>Chrathorne B., Palmer C.P. and Stanley J.A. *Journal of Chromatography*, **360**, 266 (1986).

<sup>94</sup>Tesarova E., Pacakova V. and Stulik K. *Chromatographia*, **23**, 102 (1987).

<sup>95</sup>Peltonen K. and Pukkila J. *Journal of Chromatography A*, **439**, 375 (1988).

<sup>96</sup>Paseiro P., Simal Lozano J., Paz Abuín S., López P. and Simal Gándara J. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**, 868 (1992).

<sup>97</sup>Simal J., Paz S., Paseiro P. and Simal Lozano J. *Journal of Chromatographic Science*, **31**, 450 (1993).

<sup>98</sup>Paseiro P., Pérez C., López M.F., Sanmartín P. and Simal Lozano J. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 3493 (1997).

<sup>99</sup>Sajiki J., Takahashi K. and Yonekubo J. *Journal of Chromatography B*, **736**, 155 (1999).

<sup>100</sup>Pulgar R., Olea M.F., Novillo A., Rivas A., Pazos P., Pedraza V., Navajas J.M. and Olea N. *Environmental Health Perspectives*, **108** (1), 21 (2000).

<sup>101</sup>Shintani H. *Journal of Liquid Chromatography*, **18** (3), 613 (1995).

<sup>102</sup>Inoue K., Kato K., Makino T. and Nakazawa H. *Journal of Chromatography B*, **749**, 17 (2000).

<sup>103</sup>Sun Y., Wada M., Al-Dirbashi O., Nuroda N., Nakazawa H. and Nakashima K. *Journal of Chromatography B*, **749**, 49 (2000).

<sup>104</sup>Sun Y., Wada M., Al-Dirbashi O., Nuroda N., Nakazawa H. and Nakashima K. *Journal of Chromatography B*, **749**, 49 (2000).

En este caso se observa una mayor variedad en los tipos de detectores y matrices analizadas, siendo estas matrices en general más complejas que las analizadas mediante Cromatografía de gases, incluyendo matrices biológicas como suero humano o tejido animal. Aunque al igual que esta técnica el compuesto más estudiado es el bisfenol A.

#### 4.1.3. *Cromatografía en capa fina (TLC).*

La cromatografía en capa fina es una técnica de gran utilidad para la separación de cualquier compuesto aislándolo de otros componentes que se encuentren en la muestra. Por este motivo se utiliza frecuentemente como pretratamiento junto con otras técnicas como cromatografía de líquidos o en espectrometría de masas.

Esta técnica se ha aplicado a la determinación de compuestos fenólicos usando como fase estacionaria C-18 y como fase móvil la mezcla agua/metanol con adición de surfactantes<sup>105</sup>. También se ha llevado a cabo la determinación de monómeros de bisfenol A en productos manufacturados como polisulfonatos, policarbonatos y poliarilatos<sup>106</sup>.

#### 4.2. **Métodos espectroscópicos.**

El análisis de este tipo de compuestos requiere generalmente el empleo de técnicas suficientemente sensibles y selectivas dado que a menudo estos se presentan como mezclas de mayor o menor complejidad. Como se vio en el apartado anterior, estas técnicas han sido empleadas como sistemas de detección en cromatografía de líquidos y gases, pero su uso para la determinación directa de estos compuestos está muy restringido. No obstante se han encontrado referencias bibliográficas en las que se aplica este tipo de metodología de forma directa a la determinación de bisfenol A. Destacan la colorimetría, espectroscopía IR, espectrometría de absorción ultravioleta visible y espectrofluorimetría. En la tabla 4.3 se resumen los métodos encontrados.

<sup>105</sup>Tesarova, E., Snopek, J. and Smolkova-Keulemansova, E. *Journal of High Resolution Chromatography. & Chrom. Commun.* **10** (7), 404 (1987).

<sup>106</sup>Tikhonova, T.Z., Vakhtina, I.A., Kudim, T.V., Medvedeva, T.A. *Zh. Alal. Khim*, **44**(3), 572 (1989).

*Tabla 4.3. Métodos espectroscópicos.*

Compuesto	Técnica	LD	Matriz
<sup>107</sup> Bisfenol A	Infrarrojo	Identificación	Plásticos polisulfonato
<sup>108</sup> Bisfenol A Bisfenol F	Absorción UV-vis	Identificación	Resinas epoxi
<sup>109</sup> Bisfenol A	Colorimetría	Identificación	Latas de conserva
<sup>110</sup> Bisfenol A	Espectrofluorimetría	Identificación	Plásticos policarbonato
<sup>111</sup> Bisfenol A	Espectrofluorimetría	Identificación	Plásticos policarbonato

Según se observa en todos los casos se trata de un análisis cualitativo y el compuesto de interés es fundamentalmente bisfenol A. Cabe destacar el hecho de que las matrices propuestas son todas ellas de naturaleza sólida.

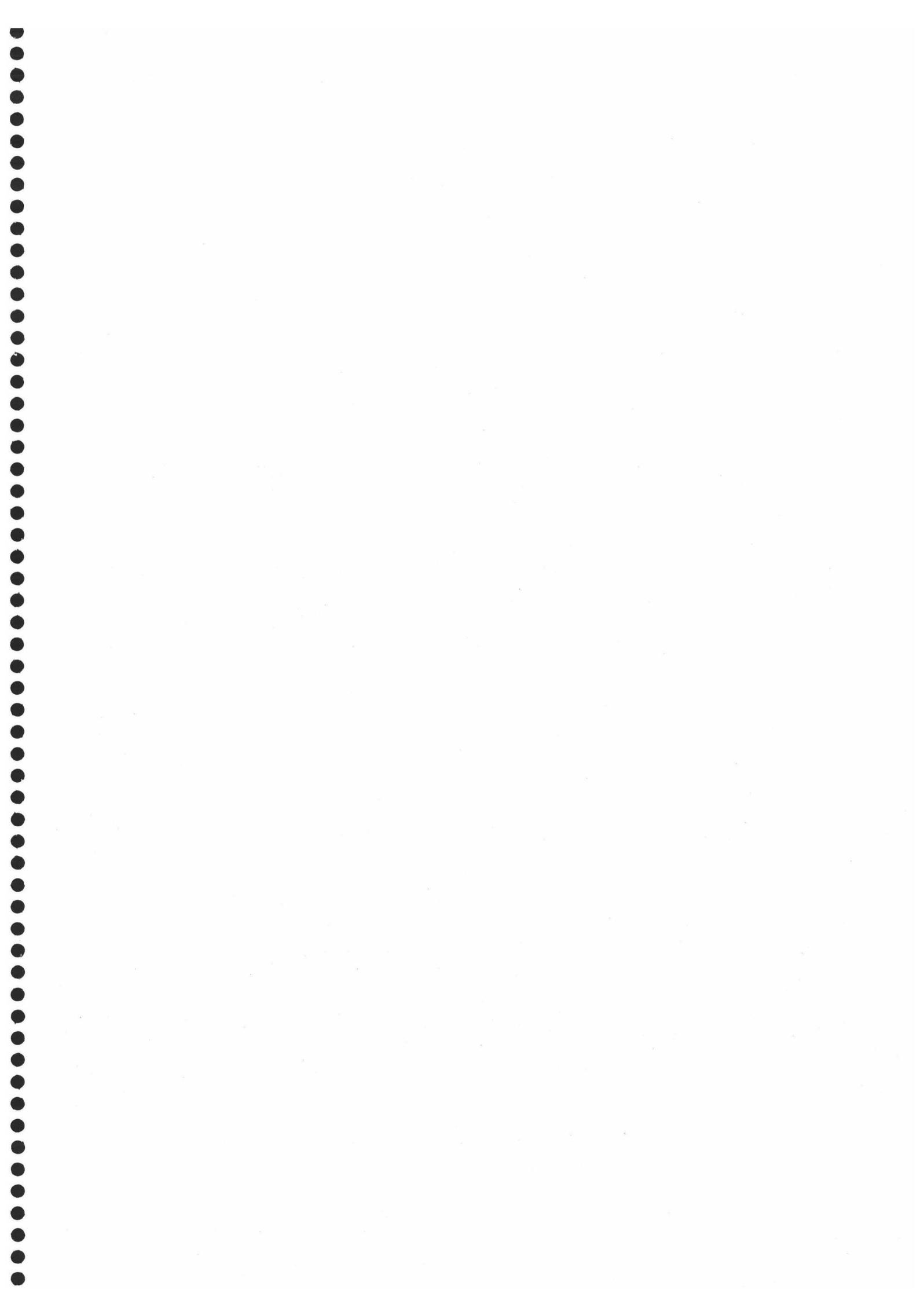
<sup>107</sup>Motorina, M.A., Metelkina, E.I., Narkon, A.L., Bolotina, L.M., Malyshev, A.I. *Plastic Massy*, **10**, 39 (1987).

<sup>108</sup>Ye, M. *Huaxue Shijie*, **32** (12), 553 (1991).

<sup>109</sup>Iwanska, S., Leszczynska, I., *Polimery (Warsaw)*, **37** (11-12), 523 (1992).

<sup>110</sup>Rufus, I.B., Shah, H. and Hoyle, C.E. *Journal of applied Polymer Science*, **51**, 1549 (1994).

<sup>111</sup>Hideyuki Itagaki and Yoshiko Umeda. *Polymer*, **36**, 29 (1995).



**CAPÍTULO I**

**EXPERIMENTAL: REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN**



## 1. DISOLUCIONES, REACTIVOS Y DISOLVENTES EMPLEADOS.

### 1.1. Disoluciones.

Se recogen en este apartado todas las disoluciones utilizadas a lo largo del trabajo experimental llevado a cabo en esta Memoria de doctorado.

#### *A. Disoluciones patrón.*

Preparadas por pesada exacta de las cantidades de patrón correspondiente mostradas en la tabla I.1.1 y posterior disolución en etanol absoluto, ya que todos estos compuestos presentan una gran solubilidad y estabilidad en medio etanólico, siendo ésta mucho más reducida en medio acuoso. Además la miscibilidad de este disolvente con agua permite la preparación de disoluciones patrón de concentraciones inferiores en medio acuoso, medio seleccionado como matriz para la aplicación de casi todos los métodos propuestos en esta Memoria.

Las disoluciones fueron conservadas en botes de cristal ámbar para evitar la acción de la luz sobre los compuestos y en el refrigerador a 4 °C. Para comprobar la estabilidad de las disoluciones, se hizo un seguimiento periódico del valor de la propiedad analítica correspondiente y se observó la evolución ésta con el tiempo. Se comprobó que no existían diferencias superiores al 5% en la señal emitida por las distintas disoluciones durante un periodo de al menos seis meses.

En la tabla I.1.1 se muestran los patrones empleados, su grado de pureza, fabricante y concentración.

Tabla I.1.1. Disoluciones patrón.

	Pureza	Fabricante	mg·100ml <sup>-1</sup>	[A] mg·l <sup>-1</sup>
<b>Fenol</b>	99.0 %	Sigma-Aldrich	10.0	100
<b>Bisfenol A</b>	99.0 %	Sigma-Aldrich	10.0	100
<b>Bisfenol F</b>	98.0 %	Sigma-Aldrich	10.0	100
<b>BFACl<sub>4</sub></b>	98.0 %	Sigma-Aldrich	100.0	1000
<b>BADGE</b>	95.0 %	Ciba Geigy	100.0	1000
<b>BFDGE</b>	95.0 %	Sigma-Aldrich	100.0	1000
<b>TEGDMA</b>	95.0 %	Sigma-Aldrich	10.0	100
<b>Bis-DMA</b>	99.0 %	Sigma-Aldrich	100.0	1000
<b>Bis-GMA</b>	95.0 %	Röhm-Degussa	100.0	1000

Las disoluciones de trabajo se prepararon a partir de éstas por dilución con agua desionizada, trabajando siempre dentro del intervalo de solubilidad acuosa correspondiente a cada uno de los compuestos.

#### B. Disoluciones de ciclodextrinas y surfactantes

Los surfactantes y ciclodextrinas empleados como modificadores del medio acuoso fueron:

a. *Surfactantes*: Disoluciones de SDS (Dodecil sulfato sódico) y TRITÓN X-100, de concentración 5 g·l<sup>-1</sup>.

- *Dodecil Sulfato Sódico (DSS)*. Se preparó por disolución de 0,5 gramos de la sustancia sólida en 100 ml de agua desionizada.
- *TRITÓN*. Se preparó por dilución con agua desionizada de 0,83 ml de una disolución concentrada del mismo (600 g·l<sup>-1</sup>) en un matraz aforado de 100 ml de capacidad.

- b. *Ciclodextrinas* Para preparar cada una de estas disoluciones se pesaron las cantidades mostradas en la tabla I.1.2 de los correspondientes patrones (calidad RA) y se disolvieron en 100 ml de agua desionizada. A partir de éstas disoluciones más concentradas se prepararon las disoluciones de trabajo por dilución con agua desionizada, en función de las necesidades de cada experiencia.

*Tabla I.1.2. Disoluciones de ciclodextrinas.*

	Fabricante	g·100 ml <sup>-1</sup>	[CDx] mol·l <sup>-1</sup>
$\alpha$ -ciclodextrina	Sigma-Aldrich	0.973	10 <sup>-2</sup>
$\beta$ -ciclodextrina	Sigma-Aldrich	1.135	10 <sup>-2</sup>
$\gamma$ -ciclodextrina	Sigma-Aldrich	1.297	10 <sup>-2</sup>

*C. Disoluciones de iones.*

Disoluciones de 1 g·l<sup>-1</sup> de concentración en el ion correspondiente preparadas por disolución de las sales (calidad RA) que se indican en la tabla I.1.3.

*Tabla I.1.3. Sales empleadas para las disoluciones de iones.*

Ion	Sal	Ion	Sal	Ion	Sal
CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	ClO <sup>-</sup>	NaClO	Ca <sup>+2</sup>	CaCl <sub>2</sub>
CO <sub>3</sub> H <sup>-</sup>	NaHCO <sub>3</sub>	Cl <sup>-</sup>	NaCl	Hg <sup>+2</sup>	HgCl <sub>2</sub>
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Br <sup>-</sup>	KBr	Be <sup>+2</sup>	BeO
SO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	Pb <sup>+2</sup>	PbCl <sub>2</sub>	Mg <sup>+2</sup>	MgCl <sub>2</sub>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	KNO <sub>3</sub>	Cu <sup>+2</sup>	CuCl <sub>2</sub>	Al <sup>+3</sup>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> Na	Mn <sup>+2</sup>	MnCl <sub>2</sub>	Fe <sup>+3</sup>	FeCl <sub>3</sub>
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Cd <sup>+2</sup>	CdCl <sub>2</sub>	Cr <sup>+3</sup>	CrCl <sub>3</sub>
SiO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	K <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ·xH <sub>2</sub> O	Zn <sup>+2</sup>	ZnCl <sub>2</sub>	---	---

Las sales utilizadas, procedían de las casas comerciales MERCK y PANREAC.

- D. Disoluciones de pesticidas* (SIGMA-ALDRICH). Los pesticidas empleados fueron: Diclone, morestan, bentazona, warfarina, benomil, carbaril, o-fenil fenol.

### **E. Otras disoluciones.**

- a. *Disolución de cloruro sódico*, ( $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Preparada por disolución de 5.844 g de NaCl en 50 ml de agua desionizada.
- b. *Disolución de perclorato sódico*, ( $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Preparada por disolución de 14.046 g de  $\text{NaClO}_4$  en 50 ml de agua desionizada.
- c. *Disolución de acetato sódico* ( $2 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Preparada por disolución de 8.2 gramos de la sal en 50 ml de agua desionizada.
- d. *Disolución de sulfito sódico*, ( $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) Preparada por disolución de 100 mg de la sal pura en 1 litro de agua desionizada. A partir de ésta y por dilución se prepararon las disoluciones necesarias.
- e. *Disolución de ácido cloroacético* al 10%.
- f. *Disolución de sulforodamida* en acético al 1%.
- g. *Disoluciones de HCl y NaOH* de diferentes concentraciones preparadas a partir de los reactivos puros (PANREAC).
- h. *Disolución de cloro*. Obtenida por burbujeo en agua desionizada de una corriente gaseosa generada por reacción a alta temperatura de dióxido de manganeso y ácido clorhídrico concentrado. Esta disolución fue contrastada a posteriori mediante yodometría, con tiosulfato sódico.

### **1.2. Reactivos empleados en la determinación de actividad estrogénica.**

- A. *Estradiol-17 $\beta$*  CALBIOCHEM. Se preparó una solución stock en etanol a una concentración de 1mM. La concentración final de etanol en los cultivos no superó el 0,1%.
- B. *Tripsina-EDTA* ICN FLOW LABORATORIES, las células se separaron del soporte sólido utilizando una disolución estéril de Tripsina (0.05%) y EDTA (0.025%).
- C. *Dextrano T-70* PHARMACIA FINE CHEMICALS Se ha utilizado una suspensión de carbón y dextrano para la preparación del suero libre de estrógenos.

- D.** Disolución para el test E-Screen de *Sulforrodamina-B (SRB)*, 0,4% de sulforrodamina-B (SIGMA) en 1% de ácido acético (MERCK).
- E. Medios de cultivo celular.** Se han utilizado los siguientes medios sintéticos: Mínimo Esencial Medio suplementado con sales de Earle (MEM) y Mínimo Esencial Medio con sales de Earle modificado por Dulbecco (DMEM), ambos fueron suministrados por ICN Flow Laboratories (USA).
- F. Suero.** Los medios de cultivo empleados para el mantenimiento de las células MCF7 contuvieron, además de los componentes específicos de los medios MEM, DMEM y DMEM (-RF) un complemento variable (5-10%) de suero de procedencias diferentes: i) suero bovino fetal (FBS) (PAA Labor und Forschungs Ges, MBH Linz, Austria), y ii) suero humano (HuS) obtenido a partir de sangre fresca extraída a voluntarios sanos. Este suero se obtuvo a partir de plasma tras su tratamiento con cloruro cálcico (MERCK).

### 1.3. Reactivos de silanización.

Los reactivos de silanización empleados son los mostrados en la tabla.

*Tabla I.1.4. Reactivos de silanización empleados.*

Reactivo	Abreviatura	Casa comercial
<b>TMCS, hexametildisilazano y piridina (1:3:9)</b>	Sil-A	Sigma-Aldrich
<b>Timetilclorosilano</b>	TMCS	Sigma-Aldrich
<b>N,O-Bis(trimetilsilil) acetamida</b>	TMSA	Sigma-Aldrich
<b>N,O-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida</b>	BSTFA	Fluka
<b>N-trimetilsililimidazol</b>	TMSI	Sigma-Aldrich

### 1.4. Reactivos sólidos.

Los reactivos empleados a lo largo de esta Memoria fueron:

- A. *Cloruro sódico* PANREAC QP.
- B. *Perclorato Sódico* PANREAC QP.
- C. *Acetato sódico* PANREAC QP.
- D. *Hidróxido sódico* PANREAC PA.
- E. *Sulfato sódico anhidro* Pro Análisis MERCK PRS.
- F. *Dióxido de manganeso* PANREAC para la generación de cloro.
- G. *Yoduro potásico* FLUKA. Empleado en las determinaciones de la concentración de cloro.
- H. *Tiosulfato sódico* PANREAC. Agente valorante en las yodometrías para el contraste de las disoluciones de cloro.
- I. *N,N-dietil-p-fenilendiamina (DPD)* reactivo empleado para la determinación de la concentración de cloro libre en un agua, por formación de un complejo de color rosa con éste.
- J. *Antraceno deuterado* ( $^2\text{H}_{10}$ -antraceno) CROMLAB.

### 1.5. Resinas.

- A. *Resina de cambio iónico* Sephadex QAE A-25 SIGMA-ALDRICH. La resina se empleó sin ningún tratamiento previo de lavado o acondicionamiento para evitar posibles contaminaciones.
- B. *Sílica gel 60* (35-70 mallas ASTM), MERCK, con tamaño medio de partícula entre 0.2 y 0.5 mm.

### 1.6. Gases empleados.

- A. *Helio* AIR LIQUID Alfa Gaz 99.999% de pureza.
- B. *Nitrógeno* AIR LIQUID ALFA Gaz 99.999 % de pureza.
- C. *Aire seco*.

### 1.7. Disolventes.

- A. *Acido nítrico* PANREAC PRS.

- B. *Ácido clorhídrico* PANREAC PRS.
- C. *Metanol purísimo*, PANREAC PRS
- D. *Etanol Absoluto*, 99.0 (v/v) % PANREAC.
- E. *Diethyl éter* LAB-SCAN HPLC y PANREAC PRS.
- F. *n-Hexano*, PANREAC PRS
- G. *Tetracloruro de carbono*, PANREAC HPLC
- H. *Triclorometano*, PANREAC PRS
- I. *Diclorometano*, PANREAC PRS
- J. *Acetato de etilo*, PANREAC PRS
- K. *Acetonitrilo* PANREAC PAI.
- L. *Ácido acético glacial* PANREAC PRS.
- M. **Agua desionizada.** Obtenida en el equipo de ósmosis inversa Milli RO 12 Plus (MILLIPORE) acoplado con un equipo de refinado Milli Q Plus 185 (MILLIPORE). La conductividad del agua fue controlada periódicamente, no superando en ningún momento el valor 10  $\mu$ S.

## 2. MATERIAL DE LABORATORIO E INSTRUMENTACIÓN.

### 2.1. Material de laboratorio.

Todo el material utilizado en el trabajo experimental fue de vidrio. Los compuestos objeto de estudio se emplean como base para la fabricación de un gran número de plásticos, motivo por el cual el empleo de material de plástico, podría suponer un posible foco de contaminación.

- A. *Matraces aforados* AFORA clase A, de diferentes capacidades.
- B. *Pipetas graduadas y aforadas* AFORA clase A de diferentes capacidades.
- C. *Cubetas de cuarzo* para fluorescencia TECNOKROMA de 10 mm de paso de luz y *HELLMA 1 115F QS* de 10 mm de diámetro externo y 2 mm de paso de luz con un volumen de 400  $\mu$ l.
- D. *Viales de inyección cromatográfica* HP de 2 ml de capacidad.
- E. *Inserto de cristal* SUPELCO de 0.2 ml de capacidad.
- F. *Embudos de decantación* AFORA de diferentes capacidades.
- G. *Matraces esféricos* POBEL de 10, 25 y 50 ml de capacidad.
- H. *Embudos de cristal* AFORA de distintos tamaños.
- I. *Bureta* AFORA de 50 ml de volumen para la determinación volumétrica de la concentración de cloro.
- J. *Columnas de vidrio* de 20 cm de alto por 1 cm de diámetro interno y de 50 cm de alto por 3 cm de diámetro interno.
- K. *Equipo de filtración*. MILLIPORE provisto de:
  - *Portafiltros analíticos de soporte de vidrio sinterizado*
  - *Filtros Millipore de 47 mm.*
  - *Matraz kitasato* para vacío de 500 ml.
- L. *Montaje para generación de gases* provisto de:
  - *Matraz esférico* de 1 l de capacidad.
  - *Conexiones de vidrio* con terminaciones esmeriladas.

- *Frasco lavador de vidrio* de 100 ml de capacidad.
  
- M. Encapsulador de viales cromatográficos* HP.
- N. Descapsulador de viales cromatográficos* TECNOKROMA.
- O. Microjeringas* HAMILTON de 10, 50 y 100  $\mu\text{l}$  de capacidad.
- P. Micropipeta* BOECO, 50-200  $\mu\text{l}$ .
- Q. Placas* NUNC de 24 pocillos para los ensayos de estrogenicidad de buena calidad óptica
- R. Goteros, vasos de precipitado, tubos de ensayo, matraces Erlenmeyer, pesa sustancias, pipetas Pasteur*, así como otro tipo de material elemental de vidrio que podemos encontrar en cualquier laboratorio analítico .

La limpieza y mantenimiento del material de vidrio empleado a lo largo del proceso experimental se llevó a cabo con  $\text{HNO}_3$  al 50% y enjuagando posteriormente con abundante agua desionizada antes de su utilización. Las cubetas fueron mantenidas en una disolución  $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}$ .

## 2.2. Instrumentación.

### 2.2.1. Espectrofluorímetro PERKIN-ELMER LS-50, provisto de:

- *Lámpara de Xenon* de 20 Ka de descarga modulada
- *Monocromadores* MONK-GILLIESON con intervalos de longitudes de onda  
Excitación: 200 a 800 nm.  
Emisión: 200 a 900 nm.
- *Contador cuántico de rodamina 101* para corregir los espectros de excitación.
- *Fotomultiplicador* GATED.
- *Software* FLDM.

### 2.2.2. Sistema acoplado Cromatógrafo de Gases-Espectrómetro de Masas.

a. Cromatógrafo de Gases HEWLETT PACKARD 5890 SERIE II, provisto de:

- Portal de inyección para columnas capilares sin división de muestra.
- Horno cromatográfico con un rango de temperatura 20-400 °C.
- Interfase de transferencia directa de muestra al espectrómetro de masas.
- Columna capilar de sílice (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm de tamaño de partícula) HP1-MS.

b. Espectrómetro de masas HEWLETT PACKARD 5971A, provisto de:

- Fuente de ionización por impacto electrónico a 70 eV.
- Separador de iones tipo cuadrupolo.
- Bomba de vacío EDWARDS High Vacuum Pump E2M2.
- Medidor de vacío Ionization Gauge Controller HP 59822B.

c. Sistema de inyección automático, provisto de:

- Inyector automático HP 7673.
- Bandeja Portamuestras HP 7673
- Jeringa HP 5181-1267

2.2.3. Espectrómetro de RMN BRUKER AM 300. Las experiencias fueron realizadas utilizando triclorometano deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) como disolvente y tetrametisilano (TMS,  $\text{SiMe}_4$ ) como referencia interna. El número de barridos fue de 800.

2.2.4. Lector de densidad óptica para placas de 96 pocillos basado en la lectura densitométrica de la coloración existente en placas de cultivo de 96 pocillos. El equipo, suministrado por la firma ICN Flow, se denomina Titertek Multiskan modelo MK11.

2.2.5. *Equipo para extracción líquido-líquido* integrado por el sistema de agitación mecánica y el sistema de separación de fases:

a. *Sistema de agitación mecánica compuesto de:*

- *Agitador mecánico* EUROSTAR Basic IKA LABORTECHNICK EURO-ST-B 50 a 2000 r.p.m.
- *Embudo de decantación* de 100, 250 y 500 ml de capacidad.
- *Agitadores de vidrio* de distinta geometría.

b. *Sistema de separación de fases:*

- *Disolventes más densos que el agua.* Cuando se emplearon como extractantes disolventes más densos que el agua, la separación se realizó por gravedad haciendo pasar el disolvente orgánico a través de una minicolumna de vidrio rellena de un agente desecante (sulfato sódico anhidro) y acoplada al embudo de decantación.
- *Disolventes menos densos que el agua.* En el caso de disolventes menos densos que el agua la separación de la fase orgánica de la acuosa se realizó haciendo uso un montaje en el que se conecta, mediante un tubo de teflón, el embudo de decantación a un depósito de vidrio que contiene agua saturada en cloruro sódico. El depósito se encuentra situado a mayor altura que el embudo de decantación por lo que la fase orgánica asciende, por efecto de vasos comunicantes, hasta ser situada en la pieza de vidrio colocada al efecto en la parte superior del embudo de decantación. Con la ayuda de una pipeta Pasteur la fase orgánica puede ser fácilmente transferida a la cubeta de medida de fluorescencia o al vial cromatográfico.

2.2.6. *Otros aparatos e instrumentos.*

A. *Balanzas Analíticas* METTLER PJ360 Delta Range y METTLER AE 163.

- B. pH-metro digital* CRISON, modelo MicropH 2000, provisto de electrodo combinado de vidrio y cloruro de plata.
- C. Cloro-metro digital* HANNA INSTRUMENT, modelo HI 93701 provisto de una lámpara ultravioleta con longitud de onda 555 nm y que emplea DPD como reactivo.
- D. Termostato-criostato* BRAUM-MELSUNGEN FRIGOMIX.
- E. Estufa de secado*, HEAREUS 50-300 °C.
- F. Baño de ultrasonidos* SELECTA de 1 litro de capacidad.
- G. Baños de agua* SELECTA Precistern s-140 y SELECTA Precistern s-137.
- H. Rotavapor* HEIDOLPH VV1. 40-220 r.p.m.
- I. Agitador de tubos* HEIDOLPH REAX 2000.
- J. Agitador de matraces* SELECTA.
- K. Placa agitadora-calefactora* HEILDOPH MODELO 2002.
- L. Bomba de agua para vacío* BUCHI B-169 Vacuum-System.
- M. Compresor de aire* PUSKA XMP.
- N. Arcón congelador* EDESA.

### 3. ORDENADORES, IMPRESORAS Y PAQUETES INFORMÁTICOS.

#### 3.1. Ordenadores.

##### A. Ordenador personal Pentium MMX P200 provisto de:

- Disco duro de 3,2 Gb
- CD-ROM 32X
- 64 Mb de Memoria RAM.

##### B. Ordenador Personal MITAC MPC 3000f 386 DX-25 con interface R-232C vía puerto serie para establecer la comunicación con el espectrofluorímetro.

##### C. Ordenador Personal HP Apollo Serie 400 para GC-MS provisto de:

- Pantalla de video HP98754A.
- Unidad de datos DAT HP 6000 (600s) Digital Data Storage.
- Conexiones HP-IB para establecer comunicación con los diferentes componentes del equipo.

#### 3.2. Impresoras.

##### A. Hewlett Packard 690C.

##### B. Hewlett Packard LaserJet III.

#### 3.3. Paquetes informáticos.

##### A. La recogida y tratamiento de datos espectrofluorimétricos se ha realizado mediante el programa FLDM (Fluorescence Data Manager) diseñado para el espectrofluorímetro PERKIN-ELMER LS-50.

**B.** *El tratamiento de los datos en calibración multivariante* se ha realizado con el programa Grams/386<sup>1</sup> versión 2.02 de GALACTIC INDUSTRIES CORPORATION (1993).

**C.** *La recogida y tratamiento de los datos del sistema GC-MS* se ha realizado mediante el programa HP-UX Chemsystem para GC-MS.

**D.** *Las representaciones gráficas* se han realizado mediante el programa Microsoft Excel 97.

**E.** *Las estructuras químicas* se ha dibujado con el programa CS ChemDraw Pro, Cambridge Soft Corporation 1985-1997 (1997).

**F.** *Los programas de cálculo* utilizados han sido:

- *Statgraphics<sup>2</sup> Plus* versión 3.1, STSC. Inc., de Statistical Graphics Corporation (1998).
- *Alamin<sup>3</sup>* (1997).
- *Quimio<sup>4</sup>* (1994).
- *Microsoft Excel 97 Copyright 1985-1997* Microsoft Corporation (1997).

**G.** *El tratamiento de texto* se ha realizado mediante el programa Microsoft Word 97, Copyright 1983-1997 Microsoft Corporation (1997).

---

<sup>1</sup>GRAMS-386 Software package, version 1.0 and Add-on Application PLS plus Version 2.1. G. Galactics Industries, Salem, NH (1993).

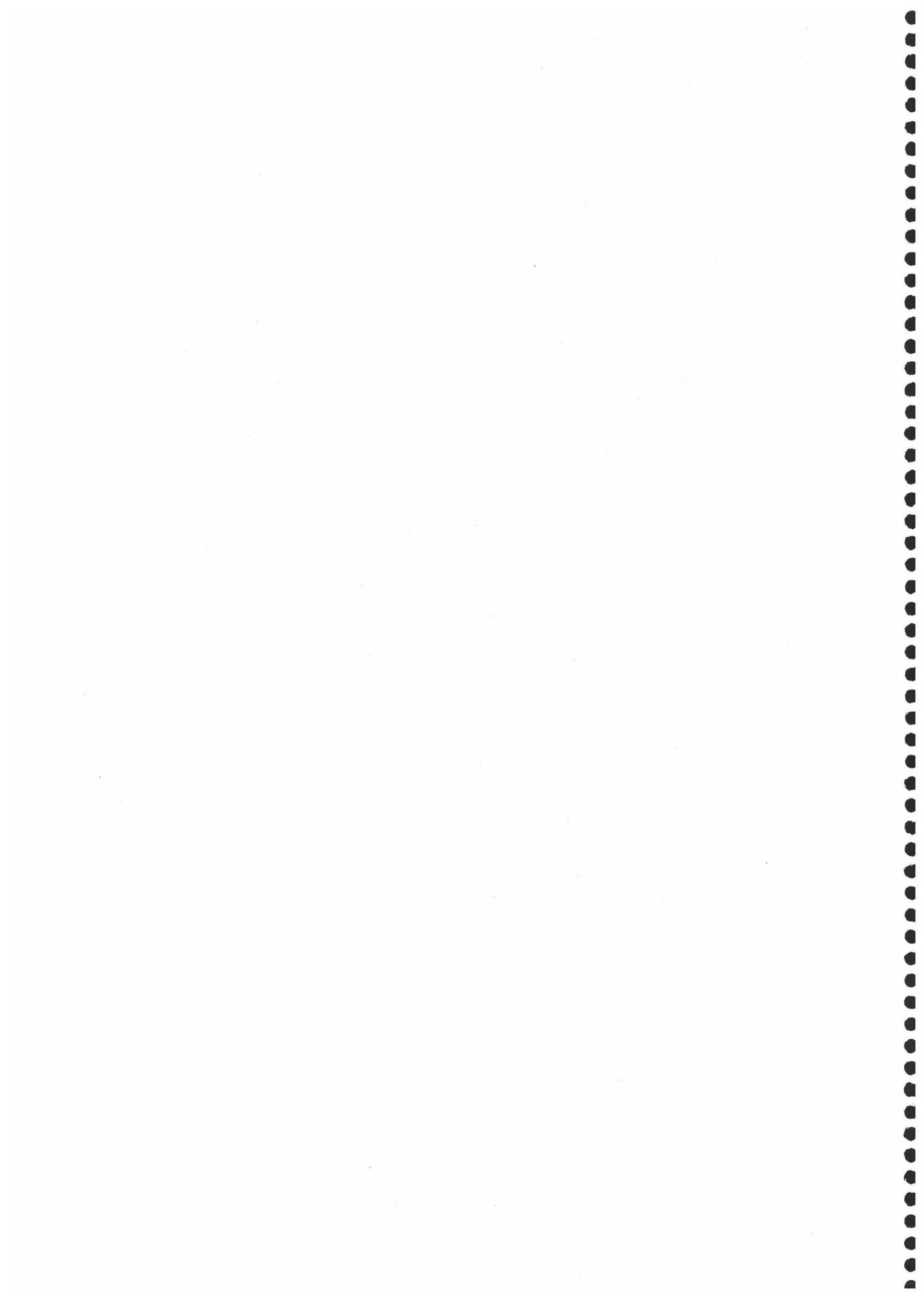
<sup>2</sup>Statgraphics versión 3.1 para Windows. *Statistical Graphics Corporation, USA* (1997).

<sup>3</sup>García Campaña A.M., Cuadros L., Alés F., Jiménez C., Román M and Sierra J.L *Trends in Analytical Chemistry*, 16, 381 (1997).

<sup>4</sup>Cela R. Universidad de Santiago de Compostela, *Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico*, Santiago de Compostela (1994).

**CAPÍTULO II**

**METODOLOGÍA DE TRATAMIENTO DE LOS  
DATOS ANALÍTICOS**



En este capítulo se resumen las diferentes metodologías empleadas en esta Memoria de doctorado para el tratamiento de los datos analíticos. Este estudio se divide en dos bloques: por una parte el estudio de la etapa de calibración y por otra los procedimientos de validación aplicados a los diferentes métodos analíticos que se proponen.

## 1. CALIBRACIÓN.

Los métodos instrumentales de análisis suelen ser métodos comparativos o relativos. Por tanto, para obtener la concentración de analito presente en una muestra, es necesario realizar la comparación de la medida física con la de un conjunto de patrones de composición conocida a través de lo que llamamos proceso de calibración.

Es por ello por lo que la calibración, como etapa integrante del proceso analítico, es de gran importancia y sólo podremos obtener una buena exactitud en los resultados si se aplican buenos métodos de calibración.

El proceso de calibración consta de dos etapas:

- 1.- **Etapa de calibración.** En ella se establece modelo que relaciona la variable dependiente, señal analítica, con la variable independiente, o concentración.

$$\text{Señal analítica} = f[\text{concentración}]$$

La selección del modelo de calibración puede realizarse por aplicación de una relación teórica ya bien establecida y conocida, como por ejemplo la aplicación de la ley de Lambert-Beer en espectrometría de absorción, la ecuación de Ilkovic en polarografía, la ecuación de Nernst en potenciometría, etc. o por el contrario, puede ser totalmente empírica.

- 2.- **Etapa de predicción.** Consiste en obtener las variables independientes, es decir las concentraciones, de una o más muestras problema a partir del valor obtenido

para la variable dependiente. El valor de la variable independiente medida en las muestras patrón junto con las sensibilidades, permiten predecir los valores de estas variables en las muestras problema.

En esta Memoria de doctorado, se han utilizado dos modelos funcionales matemáticos para establecer el calibrado analítico: univariante y multivariante. En ambos casos se trata de modelos lineales, es decir, existe una relación lineal entre la variable independiente y la variable dependiente.

### 1.1. Modelos univariantes.

Los modelos de regresión univariante son los más utilizados, dentro del campo de la Química Analítica, para la realización de la etapa de calibración. Estos modelos se caracterizan por la existencia de una variable independiente (concentración) que se relaciona con una respuesta (señal instrumental) mediante una relación lineal. La relación funcional que se establece entre ambas variables, se ajusta a un modelo matemático del tipo:

$$Y = a + b \cdot X$$

donde  $Y$  es la variable dependiente,  $X$  la independiente y  $a$  y  $b$  dos parámetros estimados a partir de los datos experimentales.

Para garantizar la validez del modelo de regresión univariante, las hipótesis básicas que deben cumplirse son cuatro: existencia de aleatoriedad en las muestras, normalidad, linealidad y homogeneidad de varianzas (condición de homocedasticidad).

En la figura II.1.1 se muestra un modelo de regresión univariante lineal.

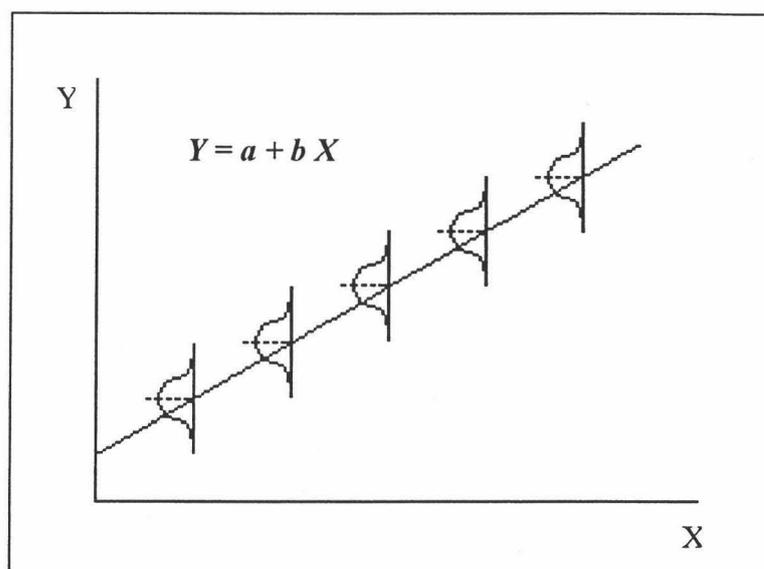


Figura II.1.1. Ilustración gráfica del modelo de regresión lineal.

### 1.1.1. Estimación de los parámetros del modelo y validación del mismo.

La estimación de los parámetros  $a$  y  $b$  del modelo es la primera operación a realizar, con objeto de obtener la función lineal de calibración. Para ello partimos de una serie de  $n$  pares de datos experimentales correspondientes a las concentraciones y señales analíticas, y les aplicamos el método de mínimos cuadrados.

Si se supone el cumplimiento de la condición de homocedasticidad, el método de mínimos cuadrados proporciona las estimaciones de los parámetros  $a$  y  $b$  más precisas entre las veraces. Los intervalos de confianza de la pendiente ( $b$ ) y la ordenada en el origen ( $a$ ) se calculan a partir de las siguientes ecuaciones :

<i>Ordenada en el origen</i>	$a \pm t_{\alpha, n-2} \cdot s_a$
<i>Pendiente</i>	$b \pm t_{\alpha, n-2} \cdot s_b$

Donde  $t_{\alpha, n-2}$  es el valor del estadístico *t-Student* tabulado para un nivel de significación  $\alpha$  determinado y  $n-2$  grados de libertad y  $s_b$  y  $s_a$  son las desviaciones estándar

correspondientes a la pendiente y ordenada en el origen respectivamente. A lo largo de esta Memoria se utiliza un nivel de significación del 5%.

La verificación de las hipótesis del modelo en un problema particular es clave para establecer la validez de dicho modelo.

En primer lugar se asume la aleatoriedad de la muestra, parámetro controlado por una planificación correcta de la experiencia de calibrado.

En segundo lugar se asume así mismo la normalidad de los datos.

En tercer lugar, para comprobar la tendencia lineal de los datos, en esta Memoria se ha optado por la evaluación del **fallo de ajuste** de los datos homocedásticos al modelo. El test se aplica sobre el conjunto de parejas de datos experimentales empleadas para establecer el modelo de regresión. Es necesario para ello, tener más de una réplica de algunas de las parejas de datos. Este test compara el valor del estadístico  $F$ , calculado como el cociente de las varianzas debidas al fallo de ajuste,  $MS_{FA}$ , y al error puro,  $MS_{PE}$ , con los valores tabulados, para un determinado nivel de significación  $\alpha$ , fijado en el 5%, y con  $k-2$  y  $n-k$  grados de libertad, siendo  $k$  el número de patrones de calibración diferentes y  $n$  el número total de observaciones. El nivel de significación establecido a lo largo de toda esta Memoria es del 5%. Esta condición será evaluada mediante el cálculo del valor  $P_{lof}$  del test de fallo de ajuste.

Si  $P \geq 5 \%$  concluiremos por la existencia de linealidad, es decir, los datos se ajustan al modelo lineal seleccionado.

Finalmente, se estudia la homogeneidad de varianzas es decir, la condición de homocedasticidad. Para comprobar esta hipótesis, se empleó el **análisis gráfico de los residuos**, según propone Boqué y Rius<sup>1</sup>, definiendo como *residuo* a la distancia vertical

---

<sup>1</sup> Boqué R. y Rius F. X. "Avances en Quimiometría Práctica" Universidad de Santiago de Compostela, Servicio de Publicaciones e Intercambio científico. Santiago de Compostela (1994)

desde cada punto experimental al que le correspondería mediante la recta de regresión estimada por mínimos cuadrados. Normalmente se realizan representaciones gráficas de los residuos frente a las respuestas calculadas por el modelo o frente a la variable independiente –concentración-. En esta Memoria se ha hecho uso de este último tipo, es decir, la representación gráfica de los residuos frente a los valores de concentración. De la observación de estas gráficas, puede evaluarse el cumplimiento de la condición de homocedasticidad de los datos y detectarse la presencia de valores anómalos, para ello se debe cumplir que sea igual el número de residuos positivos y negativos encontrado, haya aleatoriedad en la distribución y se obtengan valores similares entre los residuales.

### 1.1.2. Parámetros de calidad del modelo.

Los parámetros de calidad establecidos a lo largo de esta Memoria son los siguientes:

#### 1.1.3.1. Rango dinámico lineal y linealidad.

El rango dinámico lineal viene definido por los límites superior e inferior del intervalo de concentraciones en el que se ha aplicado el método analítico.

Por otra parte, la linealidad nos indica el grado de ajuste de los valores de la señal medidos sobre la recta de calibrado<sup>2</sup>. La calculamos a partir de la desviación estándar relativa de la pendiente de la recta de calibrado, según la ecuación 1.

$$LIN = [1 - DSR(b)] \cdot 100 \quad (1)$$

El valor máximo de linealidad será por tanto del 100 %, de forma que cuanto mas próximo esté el valor calculado para este parámetro a dicho valor, mayor será el ajuste de los datos experimentales al modelo lineal propuesto.

---

<sup>2</sup> Analytical Methods Committee. *Analyst*, 119, 2363 (1994).

### 1.1.3.2. Límites de detección y cuantificación

Podemos definir el límite de detección de un procedimiento analítico como la menor concentración ( $C_L$ ) o cantidad del compuesto ( $q$ ) que puede ser detectada en una disolución problema con un nivel de confianza determinado. En esta Memoria se ha empleado el concepto de límite de detección, basado en un tratamiento estadístico de la señal del blanco<sup>3</sup>.

Según esta metodología al límite de detección expresado como  $C_L$  le corresponde una señal analítica que viene definida por la expresión 2.

$$X_L = X_B + Ks_B \quad (2)$$

donde  $X_B$  es el valor medio de la respuesta del blanco;  $s_B$  la desviación estándar de dicha señal y  $K$  un factor numérico seleccionado de acuerdo con el nivel de confianza deseado.

La concentración  $C_L$  está relacionada con el valor de  $X_L$  según la expresión 3.

$$C_L = \frac{(X_L - X_B)}{b} \quad (3)$$

donde  $b$  es la pendiente de la función de calibrado.

Sustituyendo la ecuación 2 en 3 se obtiene que el límite de detección vendrá dado por:

$$C_L = \frac{K \cdot s_b}{b} \quad (4)$$

<sup>3</sup> IUPAC, *Spectrochimica Acta B*, **33B**, 242 (1978).

Este valor  $C_L$  será un fiel reflejo del límite de detección del método, siempre que  $b$  esté bien definida.

Como regla general, se suele usar el valor  $K=3$  que nos permite un nivel de confianza del 99.86%, asegurándose así que la magnitud analítica  $X_L > X_B + 3S_B$  sea debida a la presencia de analito en una disolución problema y no a las fluctuaciones del blanco.

Por otra parte, el límite de cuantificación, se define como la concentración de analito que corresponde a una señal analítica  $X_Q$ , definida por la ecuación 5.

$$X_Q = X_B + Ks_B \quad (5)$$

Por tanto, y siguiendo un razonamiento similar al anterior, la concentración correspondiente a este límite de cuantificación vendrá dada por la siguiente expresión:

$$C_Q = \frac{K \cdot s_b}{b} \quad (6)$$

recomendándose en este caso el valor mínimo de 10 para la constante  $K$ .

Para calcular la desviación estándar correspondiente al blanco, se opera de forma diferente según se utilice la espectrofluorimetría o la cromatografía de gases con espectrometría de masas como técnica analítica para el desarrollo del método correspondiente.

- En espectrofluorimetría, se registran los espectros de excitación o emisión correspondientes a diez disoluciones blanco, empleando las condiciones instrumentales establecidas para cada método y se mide la señal fluorescente a las longitudes de onda prefijadas.

- En cromatografía de gases con espectrometría de masas, se hace uso de la metodología descrita por Vilchez y colaboradores<sup>4</sup>.

Según estos autores, el calibrado correspondiente a un método cromatográfico se caracteriza por la ausencia de señal analítica correspondiente al blanco, lo cual implica que las predicciones sobre la zona baja de la recta de calibrado puedan realizarse sobre valores extrapolados no controlados experimentalmente. Para evitar este hecho, normalmente se introducen en la experiencia de calibrado puntos correspondientes a concentraciones de analito tan bajas como sea posible cuantificar, lo que rompe el diseño homogéneo de la experiencia de calibrado (concentración de los patrones equidistantes), hecho que dificulta la aplicación de contrastes estadísticos como el test de linealidad.

Por otro lado, la ausencia de señal correspondiente al blanco, imposibilita el cálculo del límite de detección de forma similar a la empleada para métodos espectroscópicos de análisis, y por ello se ha recurrido a lo largo del tiempo a otros procedimientos como son la utilización de la relación señal/ruido<sup>5,6</sup>, estudio de la mínima cantidad detectable<sup>7,8</sup>, uso del término independiente de la ecuación de calibrado<sup>9</sup>, cálculo de propagación de errores<sup>10</sup> o estimación aproximada por extrapolación de la recta de calibrado<sup>11</sup>. Métodos que presentan numerosos problemas de tipo práctico y determinan una gran arbitrariedad en la estimación del límite de detección.

La propuesta realizada con objeto de soslayar estos inconvenientes consiste en obtener la señal del "blanco" cromatográfico por integración directa del ruido de fondo, utilizando como límites de integración el valor extrapolado de anchura de pico ( $W_b$ ), a

<sup>4</sup> González A., Cuadros L., Alonso E. and Vilchez J.L. *Journal of Chromatography A*, **726**, 133 (1996)

<sup>5</sup> Kaiser H. H. *Analytical Chemistry*, **42**, 26A (1970).

<sup>6</sup> Sharaf M.A., Illman D.L. and Kowalski B.R. *Chemometrics*, Wiley, New York (1986).

<sup>7</sup> Snyder L.R. "Practical HPLC methods development", Wiley, Chichester (1988).

<sup>8</sup> Merken H.M and Beecher G.R. *Journal of Chromatography A*, **897**, 177 (2000).

<sup>9</sup> Miller J.M. *Analyst*, **116**, 3 (1991).

<sup>10</sup> Long G.L and Winefordner J.D. *Analytical Chemistry*, **55**, 712A (1983).

<sup>11</sup> Cuadros L., García A, Jiménez C. and Roman M., *Analytical Letter*, **26**, 1243 (1993).

concentración "cero". Necesitamos, por tanto, conocer la variación de la anchura de pico con respecto a la concentración de analito.

Para determinar esta anchura, se propone la medida de un parámetro libre de la aleatoriedad del ruido de fondo como es la anchura a mitad de pico  $W_{0.5h}$ , y a partir de este valor, calcular  $W_b$  considerando que el pico cromatográfico tiene un perfil Gaussiano<sup>12</sup>.

Partiendo de la expresión de una Gaussiana, adaptada al caso de los parámetros cromatográficos (figura II.1.2), la altura del pico a su tiempo de retención viene dada por la ecuación 7.

$$h = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \frac{(t-t_R)^2}{s^2}} \quad (7)$$

donde  $h$  es la altura de pico al tiempo de retención  $t_R$ , y  $s^2$  es la varianza del pico.

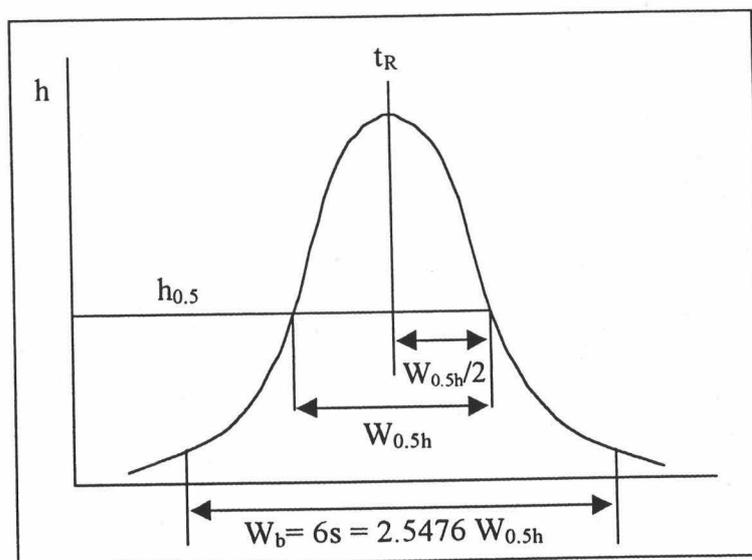


Figura II.1.2. Parámetros característicos de un pico Gaussiano.

<sup>12</sup> Klinkenberg A. And Sjenitzer F. *Chemical Engineering Science*, 5, 258 (1956).

Aplicando la expresión 7 a los parámetros de pico correspondientes se demuestra que la desviación estándar de pico viene dada por la expresión:

$$s = \frac{W_{0.5h}}{2} \sqrt{\frac{1}{2 \ln \frac{1}{\sqrt{2\pi}h_{0.5}}}} \quad (8)$$

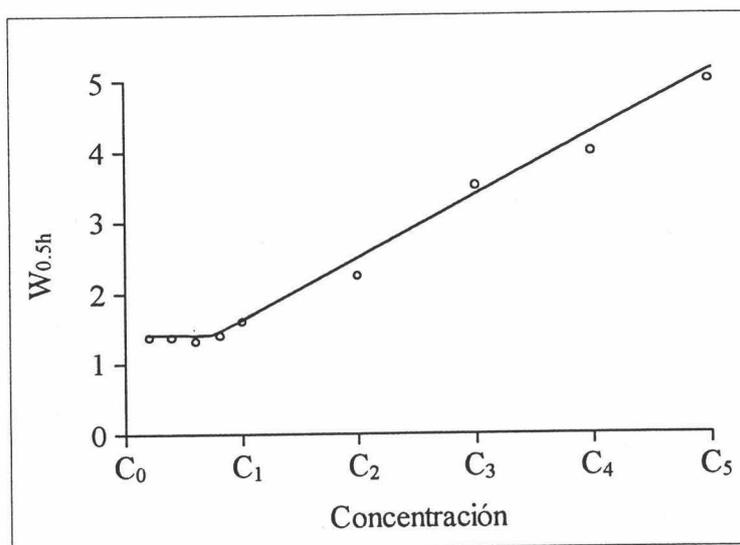
donde  $W_{0.5h}$  es la anchura a mitad de pico y  $h_{0.5}$  es la mitad de la altura del pico Gausianno.

$W_b$  para un 99.73% del área de pico<sup>13</sup>, vendrá dada por un valor igual a  $6 \cdot s$ :

$$W_b = 6 \cdot s = 2,548W_{0.5h} \quad (9)$$

Para calcular la anchura de base a concentración "cero" ( $W_{b0}$ ), dado que las dimensiones del pico cromatográfico, altura y anchura, dependen de la concentración del compuesto, se extrapola la curva resultante de representar gráficamente los valores medidos de  $W_{0.5h}$  frente a la concentración correspondiente. En la figura II.1.3 se muestra la representación gráfica del comportamiento típico de esta variable.

<sup>13</sup>Dyson N. *Chromatographic Integration Methods*, Royal Society of Chemistry, Cambridge (1990).



*Figura II.1.3. Variación de la anchura de pico con la concentración.*

El procedimiento a seguir es el siguiente: En primer lugar se calcula la anchura a mitad de pico ( $W_{0.5h}$ ). Se determina el valor de la anchura correspondiente a concentración "cero" extrapolando la curva resultante de representar gráficamente los valores medidos de  $W_{0.5h}$  de diferentes picos frente a las correspondientes concentraciones de analito (figura II.1.3). Se calcula el valor de  $W_{b0}$  aplicando la ecuación 9 y finalmente, se mide la señal del blanco para cada compuesto por integración sobre la línea del cromatograma del blanco en el intervalo  $t_R \pm 0.5W_{b0}$ , donde  $t_R$  es el tiempo de retención correspondiente a cada compuesto considerado. Para realizar réplicas se requiere una nueva inyección y el establecimiento de un nuevo cromatograma.

#### *1.1.3.3. Precisión.*

Este parámetro mide el grado de incertidumbre que podemos esperar de los resultados analíticos obtenidos a partir del calibrado.

Para evaluar la precisión del método analítico se estudió la reproducibilidad de la señal analítica correspondiente a una serie de diez disoluciones de concentración igual al punto central del rango dinámico lineal. De forma que la precisión vendrá estimada por el

valor de la desviación estándar relativa (*D.E.R.*) de dicha señal, calculada según la ecuación 10.

$$D.E.R. = \left( \frac{s_c}{c} \right) \times 100 \quad (10)$$

donde  $s_c$ , es la desviación estándar para cada concentración y  $c$  es la concentración.

#### 1.1.3.4. *Sensibilidad.*

La sensibilidad de un método analítico se puede definir como la derivada de la magnitud analítica dependiente de la concentración de analito, respecto de dicha concentración. Así, se acepta como valor de la sensibilidad el de la pendiente de la función de calibrado, el cual se denomina según la IUPAC *sensibilidad del calibrado*<sup>3</sup>.

Sin embargo, la medida de la sensibilidad no debe limitarse únicamente al cálculo de la pendiente de la función de calibrado, ya que las dispersiones originadas en el proceso de calibración, influirán notablemente en la misma. Así, Mandel y Stiehler<sup>14</sup> proponen que la sensibilidad analítica vendrá definida por el cociente entre la desviación estándar de la regresión ( $s_{RC}$ ) y la pendiente del calibrado ( $b$ ), según se muestra en la ecuación 11.

$$S_{analitica} = \left( \frac{s_{RC}}{b} \right) \quad (11)$$

<sup>14</sup>Mandel J. and Stiehler R.D. *Journal of Res. Natl. Bur. Std.*, **As 3**, 155 (1964)

## 1.2. Métodos multivariantes.

El tratamiento a que son sometidos los datos generados en los procedimientos analíticos depende en gran parte de la naturaleza de dichos datos, de la información analítica que se requiere y del conocimiento previo del sistema material que se tenga. Cuando se mide en función de una única variable (señales univariantes), la información que se extrae es limitada. Esta limitación ha sido superada con la introducción de métodos que permiten obtener datos en función de dos o más variables controladas, obteniéndose de este modo señales multivariantes<sup>15</sup>. Por tanto, la introducción de métodos multivariantes en el campo de la Química Analítica surge como consecuencia de la limitada información aportada por los métodos univariantes y ante la incapacidad de resolver mezclas, cuando al valor de la señal analítica contribuye más de un componente. Estos métodos multivariantes<sup>16,17</sup> presentan, mediante un tratamiento global, los distintos datos en función de dos o más variables, ofreciendo la ventaja de determinar constituyentes de una forma simultánea, obteniéndose una información cuantitativa y selectiva a partir de datos que no lo son. Con estos procedimientos, por tanto se podrán llevar a cabo análisis que requieran un tratamiento de muestra mínimo, lo cual repercute también en tiempos de análisis mucho más cortos.

La elección de un método de calibración multivariante adecuado depende del propio sistema, del conocimiento previo del mismo y de los datos de que se disponga. Se han propuesto numerosos métodos de calibración multivariante, aunque los más utilizados son los siguientes:

- 1.- Análisis multicomponente clásico (CLS)<sup>18,19</sup>
- 2.- Regresión inversa por mínimos cuadrados (ILS)<sup>20,21</sup>

<sup>15</sup>Tauler R., Izquierdo A. y Casasas E. *Anales de Química*, **87**, 571 (1991).

<sup>16</sup>Haaland D.M. and Easeling. *Applied Spectroscopy*, **36**, 665 (1982).

<sup>17</sup>Garthwhite P.H. *Journal of American Statistical Association*, **89**, 122 (1994).

<sup>18</sup>Ni Y., Bai J. and Jin L. *Analytical Letter*, **30**, 176 (1997).

<sup>19</sup>Hart, B. K. and Griffiths P.R. *Environmental Science and Technology*, **34** (7), 1337 (2000).

<sup>20</sup>Thomas D.V. and Haaland D.M., *Analytical Chemistry*, **62**, 1091 (1990).

<sup>21</sup>Guiteras J., Beltrán J. L. and Ferrer *Chimica Acta*, **361** (3), 233 (1998).

- 3.- Regresión lineal sobre componentes principales (PCR)<sup>22,23</sup>
- 4.- Regresión lineal por mínimos cuadrados parciales (PLS)<sup>24, 25</sup>
- 5.- Filtrado de Kalman<sup>26,27</sup>
- 6.- Redes neurales<sup>28,29</sup>

En todos los casos, es necesaria la construcción de un modelo o matriz de calibrado, formado por un conjunto de patrones que son mezclas de compuestos puros que constituyen el problema y que barren un intervalo de concentraciones predeterminado. De estos patrones, se registra el espectro completo y se utiliza, no sólo la señal obtenida bajo unos parámetros determinados, sino que también se emplea la variación de la señal analítica producida al variar algunos de esos parámetros. Una vez establecida esta matriz de calibración, la usamos para predecir concentraciones de los distintos componentes en un problema

Cuando aplicamos este tipo de calibración en espectrofluorimetría, partimos de dos conjuntos de datos. El primero,  $I$ , correspondiente al conjunto de intensidades de fluorescencia medidas a  $n$  longitudes de onda de  $m$  disoluciones patrón. Estos datos se disponen en forma matricial, dando lugar a una *matriz*  $I$  de dimensiones  $(m \times n)$ , en ella las filas corresponden al espectro de cada una de las disoluciones patrón seleccionadas. El otro conjunto de datos,  $C$ , está formado por las concentraciones conocidas de los  $l$  analitos en las  $m$  disoluciones patrón, tenemos por tanto una nueva *matriz*  $C$  de dimensiones  $(m \times l)$ , donde las filas son las concentraciones de los diferentes analitos en cada patrón seleccionado.

<sup>22</sup>Lorber A., Wangen L.E and Kowalski B.R. *Journal of Chemometrics*, **1**, 19 (1987).

<sup>23</sup>Marbach R. and Heise H.M.. *Chemometrics and Intelligence Laboratory. Systems*, **9**, 45 (1990).

<sup>24</sup>Navarro-Villoslada, Pérez-Arribas, León and Polo-Díez L.M. *Analytica Chimica Acta*, **313**, 93 (1995)

<sup>25</sup>del Olmo M., Díez C., Molina A., de Orbe I and Vilchez J.L. *Analytica Chimica Acta*, **335**, 23 (1995).

<sup>26</sup>Ni Y., KoKot S, Selby M and Hodgkinson M. *Analytica Chimica Acta*, **316**, 233 (1995).

<sup>27</sup>Martín M.E., García J.M, Jiménez A.I and Arias J.J. *Química. Analítica*, **14**, 218 (1995).

<sup>28</sup>Todeschini R., Galvani, J.L, Vilchez J.L. del Olmo M. and Navas N. *Trends in Analytical Chemistry* **18**, 93 (1999)

<sup>29</sup>Despaigne F. and Massart D.L *Analyst*, **123**, 157R (1997).

A continuación se busca la relación existente entre estas dos matrices con el fin de que una vez conocida, pueda ser utilizada en la predicción de las concentraciones de los analitos en disoluciones problema de las cuales solo se tiene su espectro.

De los modelos citados, el método PLS es el que presenta mayor robustez, entendiendo como tal, el hecho de que los parámetros que definen o caracterizan el sistema no se ven fuertemente modificados por el número de muestras utilizadas en la etapa de calibración<sup>30,31</sup>. Además, con él se evitan todos los problemas de inversiones matriciales que presenta CLS e ILS derivados del problema de colinealidad<sup>32</sup>, de información repetida. Además, generalmente, este método presenta una mayor capacidad predictiva que el resto.

En esta Memoria, se ha optado por tanto por el método de calibración multivariante basado en regresión por mínimos cuadrados parciales, PLS para la resolución de mezclas a partir de sus espectros de fluorescencia.

### 1.2.1. Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS).

PLS, es uno de los métodos de calibración multivariante más empleados. Se ha aplicado al análisis de datos en numerosos problemas químicos, entre los que se incluyen datos espectroscópicos, e incluso cromatográficos. El método fue introducido por H. Wold en 1975<sup>33</sup> y ha tenido desde entonces una gran aceptación en el campo del análisis químico. Existen diferentes modalidades de PLS, en función de los diferentes planteamientos posibles en cuanto a los algoritmos que se aplican. En esta Memoria se ha optado por los algoritmos PLS-1 y PLS-2.

<sup>30</sup>Wold S., Rushe A., Wold H. and Dunn W. *Journal of Science and Statistical Computing*, **5**, 735 (1984).

<sup>31</sup>Otto M. and Wegscheider W. *Analytical Chemistry*, **57**, 63 (1985).

<sup>32</sup>Geladi P. and Kowalski B.R. *Analytica Chimica Acta*, **185**, 1 (1986)

<sup>33</sup>Wold H. "Research Papers in Statistics", F. David, Ed. Wiley, New York, London (1975).

El método PLS se basa en el cálculo de los componentes principales o factores a partir de las matrices  $I$  y  $C$ . Estos componentes principales son combinaciones lineales de las variables originales del sistema en estudio, que son diferentes entre sí y tienen distinto porcentaje de varianza, de manera que con cada factor, se obtiene una varianza inferior a la obtenida con el anterior.

Es por tanto importante seleccionar correctamente el número de factores necesarios para modelar el sistema, con ello excluiríamos factores cuya información aportada sea irrelevante, como pueden ser los debidos a errores experimentales o debida a ruido experimental.

Si se elige un número de factores pequeño para modelar los datos, dará lugar a una predicción pobre del modelo, ya que se usa un número de términos insuficiente para modelar las variaciones espectrales importantes a la hora de calcular la concentración. Si por el contrario el número de factores es demasiado elevado, es posible que estemos utilizando información no deseada, como sería el ruido del sistema.

### *1.2.2. Selección de la matriz de calibrado.*

Una de las partes más importantes en la aplicación de PLS, como en cualquier técnica de análisis multicomponente, es la adecuada selección de la matriz de calibración. Esta, requiere de una matriz de espectros que sea representativa de la muestra a analizar, para ello debe cumplir una serie de requisitos, como son:

- 1.- Se deben emplear mezclas en la calibración. Aunque en teoría es posible calibrar con los componentes puros, las mezclas son más parecidas a los problemas reales. Además, con el empleo de mezclas se evita el peligro de que el espectro de una mezcla desconocida pueda parecer bastante diferente al correspondiente a la combinación matemática de los espectros de los componentes puros, debido a la aparición de interacciones químicas entre ellos.

- 2.- La matriz de calibrado debe contener muestras que superen el rango de concentraciones esperado para las muestras desconocidas. Es decir, concentraciones por encima y por debajo de las esperadas.
- 3.- El número de muestras empleado en la calibración, debe ser al menos igual al número de componentes analizados. En la práctica, se suelen utilizar muchas mas muestras que componentes a analizar se tengan y elegidas al azar.
- 4.- Finalmente, se debe evitar que exista colinealidad entre cualquier par de los componentes, ya que se obtendría información repetida.

### *1.2.3. Tratamientos previo de los datos del calibrado.*

El programa informático permite la aplicación de diferentes pretratamientos en el procesado de los datos obtenidos. Los evaluados en esta Memoria han sido.

#### *1.2.3.1. Datos sin tratar.*

Los datos no son modificados antes del proceso de modelado.

#### *1.2.3.2. Datos centrados respecto de la media.*

En este caso, se calcula el valor medio de cada variable del conjunto de calibración y se resta a cada punto este valor medio. El valor medio corresponde al centro del modelo, y los valores de todas las variables están ahora referidos a dicho centro. Es decir, se resta el espectro medio a cada uno de los espectros correspondientes a cada patrón. Este tratamiento permite seguir manteniendo las unidades originales y equivale a trabajar con la matriz de varianza-covarianza de los datos originales. Con el se consigue una gran exactitud en el modelo de calibración.

### 1.2.3.3. Datos autoescalados y centrados respecto de la media.

Este pretratamiento consiste en que después de centrar cada columna, se divide el resultado por la desviación estándar de la misma, de esta forma la varianza de cada variable vale la unidad. Este tratamiento debe ser utilizado cuando las variables originales están expresadas en unidades distintas o cuando sus varianzas son muy distintas. Equivale a trabajar con la matriz de correlación de los datos originales.

### 1.2.4. Selección del número óptimo de factores.

La forma más efectiva de seleccionar el número de factores es mediante el cálculo de la suma de los cuadrados de los errores residuales pronosticados, valor que se denomina PRESS y que viene definido por la expresión 11.

$$\text{PRESS} = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^m (\bar{c}_i - c_i)^2 \quad (11)$$

Donde  $n$  es el número total de muestras empleadas en la etapa de calibración,  $m$  el de componentes de la mezcla,  $\bar{c}_i$  la concentración calculada para el compuesto  $i$  por el modelo, y  $c_i$  la concentración real del compuesto.

Para obtener el valor del *PRESS*, el programa opera mediante el procedimiento de validación cruzada<sup>34,35</sup>, en el cual en cada ajuste se deja un patrón fuera del cálculo del modelo. A partir de la matriz de calibración resultante con todas las muestras patrón menos una, se predice la concentración de la muestra no utilizada en la obtención del modelo. Finalmente se calcula el valor del *PRESS* para esta muestra y para el primer factor. Esta operación se repite para cada muestra patrón, obteniéndose un valor *PRESS* por cada nuevo factor añadido al modelo. Este valor da idea de la capacidad de la matriz de calibración para predecir la concentración para cada número de factores utilizado.

<sup>34</sup>Wold S., *Technometrics*, **20**, 397 (1978).

<sup>35</sup>D.M. Haaland y D.V. Thomas, *Analytical Chemistry*, **60**, 1193 (1988).

Cuantos más factores sean tenidos en cuenta, menor será el error en la predicción de los resultados. Ahora bien, como ya se ha indicado este número de factores no puede ser ilimitado ya que a partir de un cierto valor, el modelo incorpora factores de ruido que dan lugar a un sobreajuste. Por tanto, para evitar este problema, se debe tomar el número de factores que den lugar al *PRESS* mínimo, aunque aún para este valor se puede producir un sobreajuste.

La solución a este problema fue propuesta por Haaland y Thomas<sup>35</sup> en 1988. Los autores propusieron como criterio para el cálculo del número de factores la comparación de los valores de *PRESS* obtenidos para cada factor con el valor de *PRESS* mínimo encontrado. Esta comparación se realiza mediante la utilización del estadístico *F*, calculado como cociente entre los valores de *PRESS* encontrados y el mínimo. Este estadístico es función del número total de patrones usados en la calibración siendo este número algo totalmente arbitrario. Por este motivo, Haaland y Thomas demuestran empíricamente que el número verdadero de factores deberá ser aquel al que le corresponda un *PRESS* que dividido entre el mínimo *PRESS*, proporcione un valor de probabilidad menor de 0.75. Es decir, se selecciona como número de factores óptimo aquel primer modelo al que le corresponde una probabilidad de la relación de *F* menor o igual del 75%.

Dentro del método PLS hay dos planteamientos diferentes en cuanto a los algoritmos que hay que aplicar para el cálculo del valor del *PRESS*. Cada uno de estos dos algoritmos da lugar a una modalidad diferente de PLS a los que se denomina PLS-1 y PLS-2. En el primero, se asigna un factor para cada uno de los componentes de la muestra y por tanto se calcula un valor de *PRESS* para cada uno de los componentes, mientras que el algoritmo PLS-2, calcula un solo valor para todos los componentes de la mezcla y calcula el *PRESS* una sola vez.

Normalmente no se conoce de forma exacta la naturaleza de los factores implicados, salvo los relacionados con la concentración de los componentes de la mezcla, y en general se atribuyen a variaciones espectrales de origen instrumental no aleatorio y a variaciones de origen químico.

### 1.2.5. Calidad en el ajuste del modelo.

El grado de ajuste entre los valores calculados y los teóricos de un modelo se expresa mediante diferentes parámetros estadísticos. Los que hemos utilizados en esta Memoria son:

#### 1.2.5.1. Coeficiente de correlación o detección.

Es un estimador del ajuste de los datos a la regresión lineal y viene dado por la expresión siguiente:

$$r^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\bar{c}_i - \bar{c})^2}{\sum_{i=1}^n (c_i - \bar{c})^2} \quad (12)$$

Siendo  $c_i$  la concentración teórica del compuesto en la muestra,  $\bar{c}_i$  la concentración calculada por el modelo,  $\bar{c}$  el valor medio de las concentraciones teóricas y  $n$  el número de muestras patrón empleadas en la calibración.

#### 1.2.5.2. Desviación estándar media residual (DEMRA).

Este parámetro mide el error medio cometido en el análisis. Viene dado por la raíz cuadrada de las desviaciones medias:

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\bar{c}_i - c_i)^2} \quad (13)$$

Teniendo  $c_i$  y  $\bar{c}_i$  el mismo significado que en la expresión 12.

### 1.2.5.3. Error relativo de predicción (ERP).

Este parámetro nos proporciona la capacidad de predicción de cada modelo para cada componente. Se calcula como la raíz cuadrada del cuadrado de los errores en la predicción de cada componente, expresada como un porcentaje de la media de las concentraciones teóricas:

$$ERP (\%) = \frac{100}{c} \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\hat{c}_i - c_i)^2} \quad (14)$$

### 1.2.5.4. Detección de muestras desechables.

La detección y eliminación de muestras erróneas a la hora de construir la matriz de calibración, es una etapa importante en el análisis químico por calibración multivariante. Hay varios métodos basados en tratamientos matemáticos complejos, como son el análisis clúster o el de residuos.

En esta Memoria se aprovecha el proceso de cálculo del *PRESS*, en el cual el modelo deja sucesivamente una muestra fuera de la calibración, y con el modelo obtenido, predice la concentración para dicha muestra. La diferencia entre la concentración puesta y obtenida puede darnos una idea de si se trata o no de una muestra errónea y por tanto desechable a la hora de obtener la matriz de calibración.

## 2. VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS QUÍMICO.

Para llevar a cabo la validación de los diferentes métodos analíticos propuestos en esta Memoria se han aplicado dos protocolos estadísticos distintos. Por una parte se han llevado a cabo estudios de comparación de dos rectas de calibrado<sup>36</sup> y ensayos de recuperación y por otra el protocolo estadístico propuesto por Cuadros y colaboradores y denominado metodología de adición de patrón<sup>37</sup> en el que, además de comparar el calibrado con patrones y con adición de patrón, se introduce el concepto de blanco de Youden.

### 2.1. Comparación de dos rectas de regresión y ensayos de recuperación.

#### 2.1.1. Test de comparación de dos rectas de regresión.

Esta metodología implica la realización de dos experiencias de calibrado: un calibrado con patrones (*CP*) y un calibrado de adición de patrón (*CA*). A continuación se comparan ambas funciones de calibrado para conocer la existencia o no de diferencias significativas.

Para llevar a cabo la comparación, se realiza un test de evaluación de la igualdad de pendientes y ordenadas en el origen. El estadístico a calcular en cada caso dependerá de la existencia o no de diferencia significativa entre la varianza estimada de los residuos de ambas rectas. El procedimiento a seguir es el siguiente:

#### 2.1.1.1. Comparación de las varianzas de ambos calibrados.

Se comparan mediante un test de *F de Snedecor*. Este test compara un valor del estadístico *F calculado* según la ecuación 15 con un valor tabulado para  $n_1-2$  y  $n_2-2$  grados

<sup>36</sup>Martín Andrés A. Y Luna del Castillo J de D. "Bioestadística para Ciencias de la Salud". Ediciones Norma, 3ª Edición (1990).

<sup>37</sup>Cuadros Rodríguez L., García Campaña A., Alés Barrero F., Jiménez Linares C. and Roman Ceba M. *Journal of AOAC International*, 78, 471 (1995).

de libertad, con un nivel de significación del 5%, siendo  $n_1$  y  $n_2$  el número de puntos experimentales de cada una de las funciones de calibrado.

$$F_{\text{cal}} = \frac{s_1^2}{s_2^2}; (s_1 > s_2) \quad (15)$$

donde  $s_1^2$  y  $s_2^2$  representan las varianzas de los residuos para ambas rectas de calibrado (con patrones y adición de patrón).

Las hipótesis consideradas en este test son:

<i>Varianzas iguales</i>	$s_1^2 = s_2^2$	$F_{\text{cal}} < F_{\text{tab}}$	hipótesis nula ( $H_0$ )
<i>Varianzas distintas</i>	$s_1^2 \neq s_2^2$	$F_{\text{cal}} \geq F_{\text{tab}}$	hipótesis alternativa ( $H_1$ )

#### 2.1.1.2. Comparación de pendientes.

Se realiza mediante un test de *t-Student*. Las hipótesis a tener en cuenta son las siguientes:

<i>Pendientes iguales</i>	$b_1 = b_2$	$t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$	hipótesis nula ( $H_0$ )
<i>Pendientes distintas</i>	$b_1 \neq b_2$	$t_{\text{cal}} \geq t_{\text{tab}}$	hipótesis alternativa ( $H_1$ )

El estadístico  $t_{\text{cal}}$  es diferente en función de la existencia o no de una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de los residuos:

**A.- Si existe diferencia estadísticamente significativa** entre las varianzas de los residuos  $t$  será calculado según la ecuación 16.

$$t_{\text{cal}} = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{\frac{s_{b_1}^2}{\sum (c_1 - \bar{c}_1)^2} + \frac{s_{b_2}^2}{\sum (c_2 - \bar{c}_2)^2}}} \quad (16)$$

donde  $s_{b_1}$  y  $s_{b_2}$  representan los valores de la desviación estándar de la pendiente para CP y CA respectivamente.

El valor de  $t$  *calculado* se compara con un valor de  $t$  *tabulado* para un nivel de significación del 5% y  $f$  grados de libertad, calculados según la expresión 17.

$$f = \frac{\frac{s_{b_1}^2}{\sum (c_1 - \bar{c}_1)^2} + \frac{s_{b_2}^2}{\sum (c_2 - \bar{c}_2)^2}}{\frac{s_{b_1}^2 / \sum (c_1 - \bar{c}_1)^2}{n_1 - 2} + \frac{s_{b_2}^2 / \sum (c_2 - \bar{c}_2)^2}{n_2 - 2}} \quad (17)$$

**B.- Si no existe diferencia significativa** entre las varianzas, el estadístico a calcular, es el mostrado a continuación.

$$t_{\text{cal}} = \frac{|b_1 - b_2|}{s_{b_{1,2}} \sqrt{\frac{1}{\sum (c_i - \bar{c}_1)^2} + \frac{1}{\sum (c_2 - \bar{c}_2)^2}}} \quad (18)$$

donde

$$s_{b_{1,2}}^2 = \frac{(n_1 - 2)s_{b_1}^2 + (n_2 - 2)s_{b_2}^2}{n_1 + n_2 - 4} \quad (19)$$

el valor de  $t$  *calculado* se compara con el valor de  $t$  *tabulado* con  $n_1+n_2-4$  grados de libertad y con un nivel de significación del 5%, siendo  $n_1$  y  $n_2$  el número de patrones empleados en la preparación de las rectas de calibrado comparadas.

### 2.1.1.3. Comparación de los términos independientes.

El estadístico a calcular es función, así mismo, de la existencia o no de una diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de los residuos estimadas en cada caso, comparadas al igual que en el caso anterior mediante un test de F-Snedecor:

- A.- Si existe diferencia estadísticamente significativa entre las varianzas de los residuos, se calcula un estadístico  $z$  de probabilidad normal ya que en tal caso, la ordenada en el origen no sigue un modelo de distribución normal.

$$z_{\text{cal}} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{\frac{s_{a1}^2}{n_1} + \frac{s_{a2}^2}{n_2} + \frac{(\bar{c}_1 - \bar{c}_2)^2}{\frac{\sum (c_i - \bar{c}_1)^2}{s_{a1}^2} + \frac{\sum (c_2 - \bar{c}_2)^2}{s_{a2}^2}}} \quad (20)$$

donde  $s_{a1}$  y  $s_{a2}$  representan los valores de las desviaciones estándar de la ordenada en el origen para el calibrado con patrones y el de adición de patrón respectivamente.

El valor de  $z$  *calculado* se compara con un valor  $z$  *tabulado* con un nivel de significación del 5%.

Las hipótesis a tener en cuenta en este caso son las siguientes:

<i>ordenadas iguales</i>	$a_1 = a_2$	$z_{\text{cal}} < z_{\text{tab}}$	hipótesis nula ( $H_0$ )
<i>ordenadas distintas</i>	$a_1 \neq a_2$	$z_{\text{cal}} \geq z_{\text{tab}}$	hipótesis alternativa ( $H_1$ )

- B.- Si no existe diferencia significativa entre las varianzas, el estadístico a calcular es una *t-student* dada por la ecuación 21.

$$t_{\text{cal}} = \frac{|a_1 - a_2|}{\sqrt{s_{a1,2}^2 \left( \frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} + \frac{(\bar{c}_1 - \bar{c}_2)^2}{\sum (c_i - \bar{c}_1) + \sum (c_2 - \bar{c}_2)} \right)}} \quad (21)$$

donde

$$s_{a1,2}^2 = \frac{(n_1 - 2)s_{a1}^2 + (n_2 - 2)s_{a2}^2}{n_1 + n_2 - 4} \quad (24)$$

el valor de  $t$  calculado se compara con el valor de  $t$  tabulado con  $n_1+n_2-3$  grados de libertad y con un nivel de significación del 5%, siendo  $n_1$  y  $n_2$  el número de patrones empleados en la preparación de las rectas de calibrado comparadas.

Las hipótesis a tener en cuenta en este caso son las siguientes:

<i>ordenadas iguales</i>	$a_1 = a_2$	$t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$	hipótesis nula ( $H_0$ )
<i>ordenadas distintas</i>	$a_1 \neq a_2$	$t_{\text{cal}} \geq t_{\text{tab}}$	hipótesis alternativa ( $H_1$ )

### 2.1.2. Ensayos de recuperación.

A continuación se lleva a cabo un estudio de recuperación en el que se calcula el porcentaje de recuperación ( $R$ ) obtenido en muestras reales en las que se ha comprobado previamente la no existencia de los compuestos estudiados y a las que se ha adicionado una cierta cantidad del compuesto en estudio. Tras aplicar el método analítico, se comparan las concentraciones encontradas en la muestra e inicialmente puestas. El cálculo se realiza según la ecuación 23.

$$R(\%) = \frac{C_{\text{puesta}} - C_{\text{encontrada}}}{C_{\text{puesta}}} \times 100 \quad (23)$$

## 2.2. Metodología de adición de patrón.

Esta metodología propuesta por Cuadros y colaboradores<sup>2</sup> implica la realización de tres experiencias de calibrado, un calibrado con patrones (*CP*), un calibrado de adición de patrón (*CA*) y otro calibrado empleando porciones crecientes de muestra, calibrado de Youden (*CY*).

La metodología de adición de patrón se puede aplicar para resolver diferentes problemáticas:

- 1.-Determinación de analitos en muestras en las que las interacciones analito-matriz conducen a resultados inexactos al emplear la calibración con patrones.
- 2.-Determinación de analitos, cuyo contenido en muestra es inferior al límite de cuantificación del método, pero superior a su sensibilidad analítica.
- 3.-Comprobación de la exactitud de un resultado analítico cuando no se dispone de una muestra de referencia.

En nuestro caso se emplea esta metodología por la tercera razón descrita, ya que no disponemos de ningún material de referencia adecuado.

### 2.2.1. Comprobación de la exactitud del método.

Para verificar la exactitud del método hay que desarrollar el cálculo estadístico que se esquematiza a continuación:

- 1.-Se realiza un **ajuste por mínimos cuadrados de los tres calibrados** (*CP*, *CA* y *CY*). De todos los parámetros estadísticos derivados de este ajuste

seleccionamos  $n$  (número de parejas de datos),  $a$  (ordenada en el origen),  $b$  (pendiente) y  $s_{RC}$  (desviación estándar del calibrado).

- 2.- Se calcula la **desviación estándar ponderada de regresión** ( $s_p$ ) a partir de las correspondientes desviaciones estándar del calibrado con patrones ( $s_{RC,S}$ ) y adición de patrón ( $s_{RC,A}$ ). Este cálculo es necesario para realizar el test de comparación de pendientes.

$$s_p = \sqrt{\frac{(n_s - 2)s_{RC,S}^2 + (n_A - 2)s_{RC,A}^2}{n_s + n_A - 4}} \quad (24)$$

donde  $n_s$  y  $n_A$  son el número de datos experimentales de cada uno de los calibrados.

- 3.- Se realiza el test de comparación de pendientes para comprobar si la adición de patrón provoca un error sistemático constante, o sea que la recta de adición de patrón está desplazada paralelamente respecto a la recta de patrones. Para lo cual se realiza un test de *t-Student*. Se calcula el estadístico  $t_{calc}$  con  $(n_s + n_A - 4)$  grados de libertad. Se acepta la hipótesis nula para un nivel de significación mayor del 5%.

$$t(b) = \frac{|b_s - b_A|}{s_p \sqrt{\frac{1}{\sum (c_i - \bar{c})_S^2} + \frac{1}{\sum (c_i - \bar{c})_A^2}}} \quad (25)$$

- 4.- Una vez comprobado que la pendiente del calibrado con patrones es igual a la pendiente del calibrado con adición de patrón, se calcula la pendiente promedio de ambas.

$$b_p = \frac{\sum (c_i - \bar{c})_S (R_i - \bar{R})_S + \sum (c_i - \bar{c})_A (R_i - \bar{R})_A}{\sum (c_i - \bar{c})_S^2 + \sum (c_i - \bar{c})_A^2} \quad (26)$$

5.- Se calculan las nuevas alturas en el origen ( $a'$ ) para el calibrado con patrones ( $a'_S$ ) y para el calibrado con adición de patrón ( $a'_A$ ), a partir del valor de pendiente promedio. A continuación se compara la nueva altura en el origen del calibrado con patrones con la altura en el origen del calibrado de Youden ( $a_Y$ ), si hay diferencia entre ambas será debida a la existencia de error sistemático por efecto matriz de la muestra. En este caso no se puede realizar un test de comparación de  $a_S$  y  $a_Y$  porque ambas están obtenidas a partir de variables independientes distintas. Para compararlas se comprueba que  $a_Y$  está incluida en el intervalo de confianza de  $a_S$ . Se utiliza un valor de *t-Student* con  $(n_S - 2)$  grados de libertad para un nivel de significación del 5%. Si  $a_Y$  no está incluido en el intervalo calculado, se obtiene el verdadero blanco de muestra denominado blanco de Youden.

$$a'_A = R_A - b_p C_A ; a'_S = R_S - b_p C_S \quad (27)$$

Intervalo de confianza sobre la altura,  $a'_S$

$$a_Y \in a'_S \pm t_{\alpha} s_p \sqrt{\frac{\sum c_{i,s}^2}{n \sum (c_{i,s} - \bar{c})^2}} \quad (28)$$

**BY:** blanco de Youden

$$BY = a_Y - a'_S \quad (29)$$

6.- Finalmente, se comprueba la exactitud del método analítico. Para ello se compara el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con patrones ( $C_{x,S}$ ) y el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con adición de patrón ( $C_{x,A}$ ). Ambos valores ( $C_{x,S}$  y  $C_{x,A}$ ) se comparan mediante un test de *t-Student* de comparación de dos medias con  $(n_S + n_A - 3)$  grados de libertad. Si concluimos por la hipótesis nula

con un nivel de significación mayor del 5%, ambos resultados son iguales y por tanto el método es exacto. Se calcula el estadístico:

$$t(c) = \frac{|c_{x,S} - c_{x,A}|}{\frac{s_P}{b_P} \sqrt{\frac{1}{n_S} + \frac{1}{n_A} - \frac{(R_S - R_A)^2}{b_P^2 [\sum (c_{i,S} - c_S)^2 + (c_{i,A} - c_A)^2]}}} \quad (30)$$

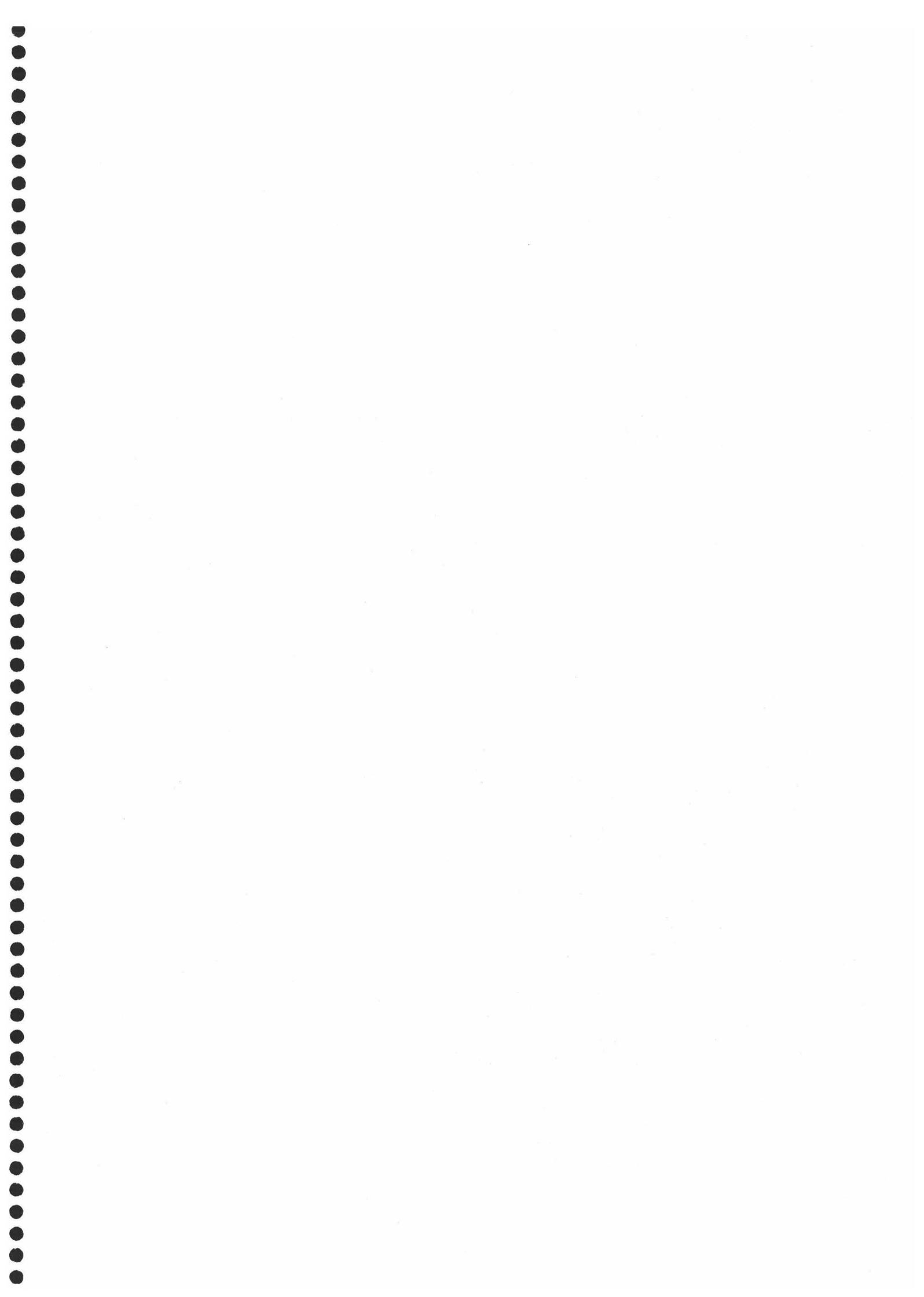
Estos parámetros fueron calculados en todos los casos con ayuda del programa informático Alamin<sup>38</sup>.

<sup>38</sup>García Campaña A.M., Cuadros L., Alés F., Jiménez C., Román M and Sierra J.L. *Trends in Analytical Chemistry*, 16, 381 (1997).

---

**CAPÍTULO III**

**APLICACIONES DE LA ESPECTROFLUORIMETRÍA  
AL ANÁLISIS DE BISFENOLES Y COMPUESTOS  
RELACIONADOS**



## 1. INTRODUCCIÓN.

Este capítulo se centra en el empleo de la espectrofluorimetría como técnica para el desarrollo de metodología analítica de buenas características que nos permita la determinación individual de bisfenol A, así como la resolución de mezclas en las que éste se encuentre presente.

La bibliografía consultada, puso de manifiesto que el bisfenol A presentaba señal fluorescente en determinados medios<sup>1,2</sup>, pero no existían antecedentes bibliográficos sobre su análisis directo en medio acuoso. Un estudio previo demostró que el bisfenol A presentaba una señal muy débil en este medio, hecho inicialmente atribuido a que la solvatación de la molécula de bisfenol A creaba un entorno químico que favorecía la desactivación no radiativa del sistema. Se planteó por tanto el empleo de medios organizados tales como ciclodextrinas y surfactantes o de disolventes diferentes del agua con el fin de exaltar su intensidad de fluorescencia.

Los compuestos considerados para los estudios realizados en este capítulo fueron, además del bisfenol A, fenol y bisfenol A diglicidiléter (BADGE). El primero de ellos por su coexistencia con el bisfenol A, en la mayoría de las matrices en las que este último está presente y por tanto se ha de considerar para su análisis o para evitar su interferencia. El BADGE por su parte, se utiliza como base para la obtención de resinas epoxi y supone hoy día un consumo del 75 % de la producción total de bisfenol A<sup>3</sup>, hecho que justifica la necesidad de desarrollar métodos para su análisis a nivel de trazas considerando además la posibilidad de que tanto fenol como bisfenol A estén presentes en el mismo medio.

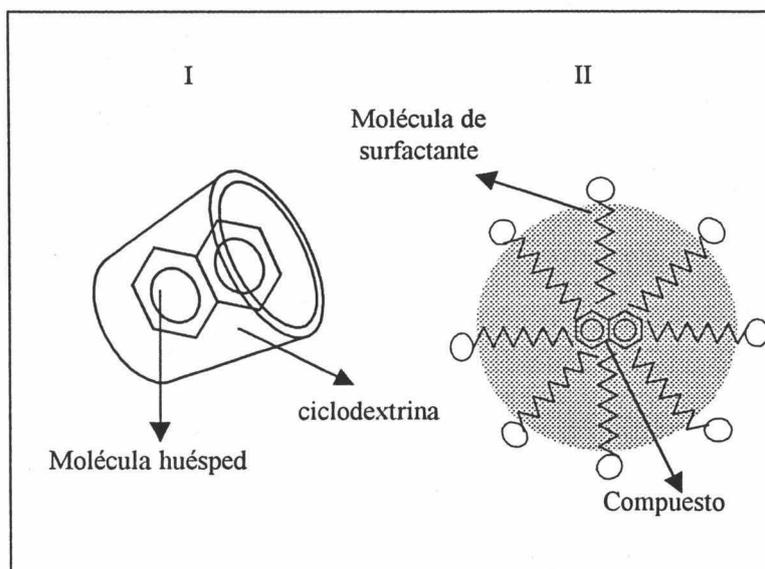
<sup>1</sup> Simal Gándara J., Paz S., Paseiro P. and Simal Lozano J. *Journal of Chromatographic Science*, **31**, 450 (1993).

<sup>2</sup> Rufus I.B, Shah H. and Hoyle C.E. *Journal of Applied Polymer Science*, **51**, 1549 (1994).

<sup>3</sup> Referencia de la enciclopedia

### 1.1. Empleo de medios organizados en fluorimetría.

La formación de medios organizados con ciclodextrinas<sup>4,5,6</sup> y/o surfactantes<sup>7,8,9</sup> produce una exaltación en la señal fluorescente emitida por ciertos compuestos. En el primer caso este incremento se atribuye a la formación de complejos de inclusión en los que el analito se introduce dentro de la cavidad interna de la ciclodextrina, protegiendo a los estados excitados de los procesos de atenuación de la señal de luminiscencia, según se recoge en la figura III.1.1 (I). En el caso de los surfactantes la exaltación que experimenta la señal de fluorescencia se atribuye a la formación de micelas que protegen al analito del ambiente externo, como se indica en la figura III.1.1 (II).



**Figura III.1.1.** Formación de complejos de inclusión y medios micelares.

En general, estos modificadores crean un ambiente favorable para la molécula que evita la desactivación de la misma por vías no radiativas, que conducen a una desaparición total o parcial de la luminiscencia emitida por el analito. Los

<sup>4</sup> Jules O., Scypinsky S. and Love L.J.C. *Analytica Chimica Acta*, **169**, 355 (1985).

<sup>5</sup> Márquez J.C., Hernández M. and García-Sánchez F. *Analyst*, **115**, 1003 (1990).

<sup>6</sup> Averrin G. M., Rideau A., Agbaria R. A and Warner I. M. *Talanta*, **40**, 599 (1994).

<sup>7</sup> Compano R., Granados M., Leal C. and Prats, M.D. *Analytica Chimica Acta*, **302**, 185 (1995).

<sup>8</sup> Esteve J.S., Monferrer L., Ramis G. and García M.C. *Talanta*, **42**, 737 (1995).

<sup>9</sup> Alvarez L., Monferrer L., Esteve J.S., Ramis G. and García M.C. *Analyst*, **122**, 459 (1997).

modificadores de señal por tanto minimizan estos factores y evitan la atenuación de la fluorescencia<sup>6</sup>.

Los surfactantes, también conocidos como detergentes, son moléculas constituidas por un grupo hidrofóbico (apolar), que suele ser una cadena carbonada, y un grupo hidrofílico (polar), que es un grupo iónico o neutro. Su comportamiento en disolución depende de su estructura y de la naturaleza del disolvente. En medio acuoso, las moléculas de tensioactivo se orientan de forma que la parte apolar queda aislada de las moléculas de agua y la parte polar se orienta hacia dichas moléculas, dando lugar a la formación de micelas<sup>10</sup>. Cuando una molécula se encuentra inmersa en un medio de este tipo, se produce una solubilización de la misma en la micela, de forma que queda protegida del medio acuoso, eliminando posibles interacciones entre la molécula y el disolvente. Se produce por tanto una estabilización que favorece los procesos de emisión radiativa, frente a los no radiativos.

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos que presentan una cavidad interna hidrofóbica de diámetro variable<sup>11</sup>. Los tres miembros de esta familia más utilizados actualmente son los de diámetro de cavidad interna 5.0, 7.8 y 9.5 Å respectivamente, tamaño que depende del número de moléculas de glucosa que formen el oligosacárido (6, 7 y 8 respectivamente). Este tamaño es una de las propiedades determinantes en la aplicación de estos compuestos en fluorimetría, ya que por razones estéricas cada compuesto formará un complejo de inclusión en función de su tamaño y polaridad, consiguiéndose con ello una gran selectividad en los métodos basados en este tipo de interacciones. Otro factor a tener en cuenta es la polaridad de la molécula, ya que la cavidad de las ciclodextrinas presenta un acusado carácter hidrofóbico, favoreciéndose según esto la inclusión de moléculas apolares.

El grado de formación por tanto de un complejo de inclusión, está estrechamente ligado a la compatibilidad del tamaño de la cavidad de la CDx con el de la molécula, a la hidrofobicidad del huésped potencial y a los posibles impedimentos estéricos que

<sup>10</sup>Baeyens W., Lin B. and Corbisier V. *Analyst*, **115**, 359 (1990).

<sup>11</sup>Cramer F., Saenger W. and Spatz H.Ch. *J. of American Chem. Soc.*, **89** (1), 14 (1967).

puedan tener lugar.

Con la formación de este tipo de complejos, se produce también un aumento en la sensibilidad del método analítico, regido por el aumento de señal fluorescente emitida por el fluoróforo formado.

Con objeto de conocer el comportamiento fluorescente tanto de bisfenol A como de fenol y BADGE, se realizó un estudio sistemático en diferentes medios organizados: como surfactantes se ensayaron SDS y TRITÓN-X100 y como ciclodextrinas  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ -ciclodextrina. Para ello en matraces aforados de 10 ml de capacidad, se prepararon disoluciones de bisfenol A, fenol y BADGE de concentración adecuada en cada uno de los medios mostrados en la tabla III.1.1. A continuación, se registraron los correspondientes espectros de excitación y emisión en los rangos 200 a 290 nm y 290 a 350 nm respectivamente, fijando como longitudes de onda las adecuadas en cada caso, rendijas de excitación y emisión 5 nm respectivamente, velocidad de barrido 240 nm/min y temperatura  $20.0 \pm 0.5$  °C.

En la tabla III.1.1 se muestran las longitudes de onda de medida utilizadas en cada caso así como un parámetro  $R$ , definido como el cociente entre la intensidad de fluorescencia medida y la concentración de cada compuesto expresada en  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , que nos va permitió comparar la intensidad de fluorescencia en cada uno de esos medios.

*Tabla III.1.1. Comportamiento fluorescente de bisfenol A, fenol y BADGE en medios organizados.*

Medio	Bisfenol A			Fenol			BADGE		
	$\lambda_{exc}$ nm	$\lambda_{em}$ nm	R	$\lambda_{exc}$ nm	$\lambda_{em}$ nm	R	$\lambda_{exc}$ nm	$\lambda_{em}$ nm	R
Acuoso	225	306	0.07	219	300	0.06	225	303	0.05
	276	306	0.04	270	299	0.03	274	305	0.02
$\alpha$ -ciclodextrina	225	306	0.08	220	300	0.08	225	304	0.04
	276	306	0.06	270	299	0.02	274	305	0.02
$\beta$ -ciclodextrina	225	306	0.68	219	300	0.06	225	304	0.03
	276	306	0.28	271	302	0.03	275	303	0.02
$\gamma$ -ciclodextrina	225	306	0.10	219	300	0.07	225	303	0.04
	276	306	0.09	270	299	0.03	274	305	0.02
SDS*	276	306	0.37	271	300	0.28	275	304	0.15
TRITON	---	---	Sat	---	---	sat	---	---	sat

\*Dodecil sulfato sódico

Se observa en la tabla que aunque en disolución acuosa la señal emitida por el bisfenol A es muy débil, éste muestra una emisión fluorescente importante tanto en medios acuosos modificados por la presencia de ciclodextrinas como de surfactantes

La presencia de  $\beta$ -ciclodextrina en el medio produce una exaltación notable en la señal fluorescente del bisfenol A, no observándose cambio alguno respecto a su comportamiento en agua desionizada para los otros dos compuestos estudiados. Así mismo se comprobó que la presencia de otras ciclodextrinas como la  $\alpha$  y  $\gamma$  no producen efecto significativo sobre el comportamiento fluorescente de los compuestos.

Por otra parte la formación de un medio micelar mediante el empleo de SDS produce un aumento en la señal fluorescente emitida por los tres compuestos siendo menor en el caso del BADGE y prácticamente del mismo orden para fenol y bisfenol A. Sin embargo, en el caso de TRITON, debido a su fluorescencia nativa, la elevada señal fluorescente mostrada por el blanco no permite discriminar la señal emitida por los compuestos.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la posibilidad de utilizar  $\beta$ -ciclodextrina para la determinación individual de bisfenol A en medio acuoso, ya que, además de evitar la desactivación no radiativa del bisfenol A, produce una exaltación de la señal doble a la experimentada en presencia de SDS, no parece formar complejos de inclusión con fenol ni BADGE y por tanto evita su interferencia.

### 1.2. Empleo de disolventes no acuosos. Microextracción líquido-líquido.

Se realizó así mismo un estudio sistemático con objeto de conocer el comportamiento fluorescente tanto de bisfenol A como de fenol y BADGE en diferentes disolventes no acuosos. Para ello, se llevó a cabo una experiencia similar a la realizada en el apartado anterior, pero empleando en este caso distintos disolventes orgánicos. Se registraron los correspondientes espectros de excitación y emisión fijando las mismas condiciones instrumentales que en dicha experiencia. Los resultados obtenidos son mostrados en la tabla III.1.2.

*Tabla III.1.2. Comportamiento fluorescente de bisfenol A, fenol y BADGE.*

Medio	Bisfenol A			Fenol			BADGE		
	$\lambda_{exc}$ nm	$\lambda_{em}$ nm	R	$\lambda_{exc}$ nm	$\lambda_{em}$ nm	R	$\lambda_{exc}$ nm	$\lambda_{em}$ nm	R
Acuoso	225	306	0.07	219	300	0.06	225	303	0.05
	276	306	0.04	270	299	0.03	274	305	0.02
Etanol	225	306	1.55	221	301	0.72	225	299	2.06
	275	306	0.67	269	296	0.63	276	302	0.54
Metanol	221	297	3.21	217	295	1.25	223	300	2.59
	274	298	2.14	265	295	1.98	275	301	1.65
Acetato de etilo	279	305	0.10	274	302	0.08	277	305	0.06
CCl <sub>4</sub>	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CHCl <sub>3</sub>	---	---	---	---	---	---	---	---	---
CHCl <sub>2</sub>	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Eter etílico	225	305	0.53	212	302	0.65	225	304	0.29
	278	305	0.40	275	302	0.36	276	304	0.16
Hexano	225	305	0.26	217	299	0.15	217	299	0.14
	278	305	0.18	272	297	0.20	272	297	0.09

Según se observa en la tabla, los tres compuestos presentan una emisión fluorescente importante en un gran número de disolventes orgánicos que cubren un amplio rango de polaridades desde metanol hasta éter etílico.

El empleo de disolventes miscibles con agua como metanol o etanol en los que el bisfenol A presenta un alto rendimiento de fluorescencia requeriría una separación previa del medio acuoso, paso éste que redundaría en un aumento considerable del tiempo de preparación de muestra. Por esta razón se pensó en la posibilidad de emplear un disolvente no miscible con el agua que, además de permitir la medida directa de fluorescencia emitida por el compuesto, pudiese constituir una etapa para su preconcentración. El disolvente seleccionado para tal fin fue el éter etílico ya que, como se observa en la tabla, de los disolventes no miscibles con el agua que se ensayaron: los tres clorados ejercen un efecto de atenuación anulando totalmente la señal luminiscente emitida por los compuestos, en acetato de etilo la señal es prácticamente nula y en hexano y éter etílico los tres compuestos muestran señal siendo el rendimiento de fluorescencia mayor en éste último para los tres compuestos ensayados. Por tanto, en este caso, los métodos desarrollados para el análisis de bisfenol A habrá que considerar la presencia de los otros dos compuestos bien para su análisis, bien para evitar su interferencia.

Los problemas inherentes a la introducción de esta etapa de extracción líquido-líquido en el método analítico son los derivados de la peligrosidad e impacto medioambiental por el uso de disolventes orgánicos. Es evidente que estos inconvenientes se reducen cuando se opera con pequeños volúmenes de disolvente. Este es el caso de la microextracción líquido-líquido cuyo fundamento y características se resumen a continuación.

### *1.2.1. Microextracción líquido-líquido.*

El análisis de compuestos orgánicos en aguas a nivel de trazas requiere normalmente una adecuada etapa de preconcentración, previa a la medida de la propiedad analítica. Dicha etapa se puede llevar a cabo mediante extracción con disolventes o extracción en fase sólida. En aquellos casos en los que el método

seleccionado es la extracción con disolventes, frecuentemente es necesaria una concentración de la fase orgánica lo cual puede originar pérdidas de los compuestos a analizar. Por otra parte es importante destacar el hecho de que la cantidad de disolventes y productos químicos usados en el análisis de residuos y por tanto vertidos al ambiente es del orden de  $10^8 - 10^9$  veces superior a la cantidad de especies analizadas<sup>12</sup>. Por tanto, el empleo de micro-métodos que necesitan un volumen muy pequeño de fase orgánica son preferibles para la recuperación de pequeñas concentraciones de compuestos orgánicos presentes en muestras acuosas ya que se evita la etapa de preconcentración del disolvente orgánico y se reduce el riesgo de contaminación ambiental, así como el tiempo de análisis empleado.

El principio de la microextracción es la extracción de un gran volumen de agua con un volumen muy pequeño de disolvente orgánico, el cual se utiliza directamente para el análisis sin necesidad de ningún tratamiento previo, en particular una evaporación del mismo. El requisito necesario para su aplicación es encontrar las condiciones en las cuales la solubilidad del disolvente y de los analitos en fase acuosa es mínima. La microextracción es por tanto esencialmente un proceso simultáneo de extracción y preconcentración.

Por otra parte, la solubilidad de muchos compuestos orgánicos en agua decrece al aumentar la fuerza iónica de la disolución, aunque la saturación de las muestras con sal es necesaria no sólo para producir un efecto de "salting out", desplazando el coeficiente de partición de la mayoría de los compuestos a favor del disolvente orgánico, sino también para minimizar la solubilidad del extractante orgánico en agua y permitir así la recuperación de un volumen adecuado para su posterior análisis.

Para la realización práctica del procedimiento de microextracción se han usado diferentes dispositivos experimentales a lo largo de la historia.

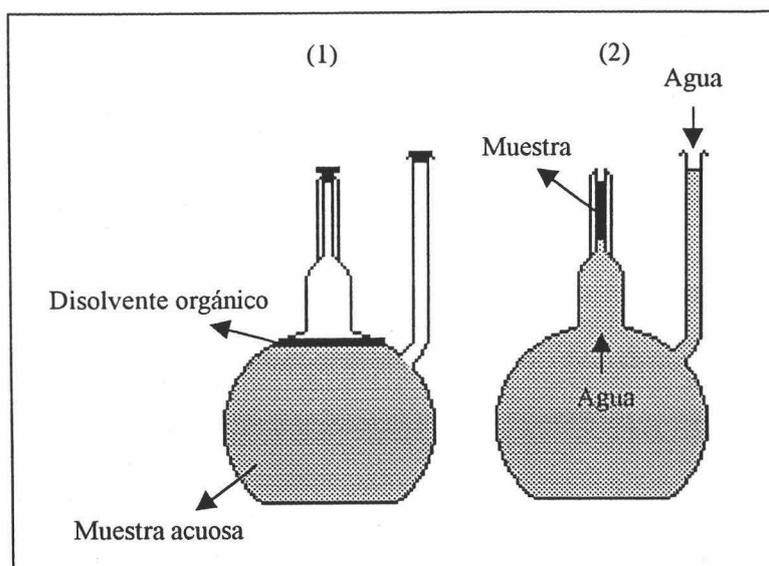
---

<sup>12</sup>H. Steinwandter, *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **343**, 604 (1992).

### 1.2.1.1. Dispositivos empleados para microextracción.

A continuación se recogen los distintos dispositivos propuestos en bibliografía para la realización experimental del proceso de microextracción:

A. En 1979 *Murray* propone un micro método para la extracción de bajos niveles de pesticidas empleando un disolvente menos denso que el agua como es el hexano<sup>13</sup>. En la figura III.1.2 se muestra el dispositivo propuesto.



*Figura III.1.2. Dispositivo de Murray.*

El frasco, que contiene 980 ml de agua y 200  $\mu$ l de hexano, se agita manualmente durante dos minutos (1). A continuación, inclinando el frasco de extracción y adicionando agua a través del brazo lateral, se sitúa la capa de disolvente en la porción central del tubo capilar (2), tal como se muestra en la figura. Finalmente, se recuperan alrededor de 50  $\mu$ L de hexano y el extracto puede ser analizado directamente. Teniendo en cuenta los volúmenes de partida y el volumen final recogido, el factor de preconcentración ha sido de 20.000, suponiendo una recuperación total de los compuestos en la fase orgánica.

<sup>13</sup>Murray A.J. *Journal of Chromatography*. 177, 133 (1979).

B. Stan y colaboradores<sup>14,15</sup> proponen otro dispositivo para disolventes menos densos que el agua en el que emplean tolueno como agente extrantante. La figura III.1.3 muestra el montaje empleado en este caso.

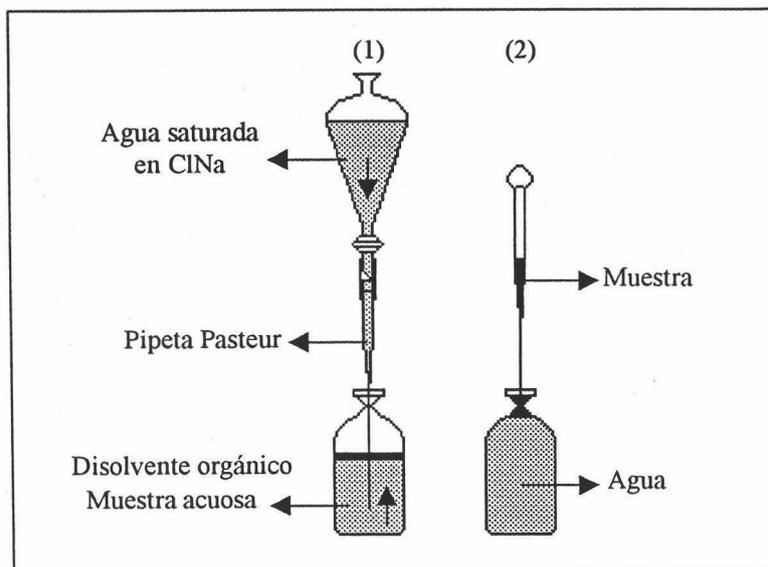


Figura III.1.3. Dispositivo de Stan para microextracción.

La muestra acuosa saturada en NaCl se introduce en un bote de cuello estrecho, se adiciona el disolvente, se cierra y se agita. Una vez separadas las fases, el disolvente orgánico se lleva hasta el estrechamiento del bote por adición de agua saturada en NaCl usando una pipeta Pasteur conectada a un embudo de decantación (1). Finalmente, la fase orgánica se recoge con la ayuda de otra pipeta Pasteur y se transfiere directamente a un vial para su análisis (2). Para mejorar la reproducibilidad del método, la agitación se llevó a cabo mediante el empleo de un agitador mecánico.

C. En otros trabajos<sup>16</sup> el dispositivo propuesto es un matraz aforado en el que se introduce la muestra acuosa y, tras saturar ésta en NaCl, se adiciona un pequeño volumen de disolvente orgánico. El matraz se agita vigorosamente de forma manual

<sup>14</sup>R. Heyer, A. Zapf, H and H. J Stan. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **351**, 752 (1995).

<sup>15</sup>A. Zapf, R. Heyer, H. J. Stan. *Journal of Chromatography*, **694**, 453 (1995).

<sup>16</sup>D.R. Thielen, G. Olsen and A. Davis. *Journal of Chromatographic Science*, **25** (1987).

durante unos cinco minutos y tras la separación de las fases, la capa orgánica se transfiere a un vial para su análisis.

D. La empresa *Cromlab.S.L*<sup>17</sup> ha patentado un nuevo dispositivo destinado también al uso de disolventes menos densos que el agua. Este consiste en un recipiente de vidrio que finaliza en un capilar en el que se introduce la muestra acuosa, además lleva acoplado otro tubo en el lateral que se introduce hasta el fondo del recipiente (1). A continuación, se adiciona un pequeño volumen de un disolvente orgánico menos denso que el agua y se agita vigorosamente durante el tiempo necesario. Tras la separación de las fases, la fase orgánica es empujada hacia el capilar con agua introducida a través del tubo lateral (2) de forma que puede ser recogida con una jeringa o una pipeta Pasteur. El dispositivo es mostrado en la figura III.1.4.

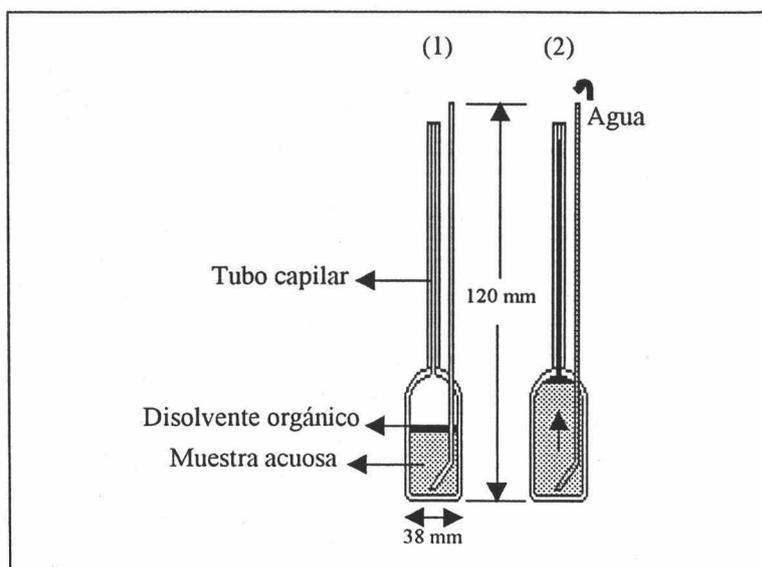


Figura III.1.4. Dispositivo diseñado por Cromlab.

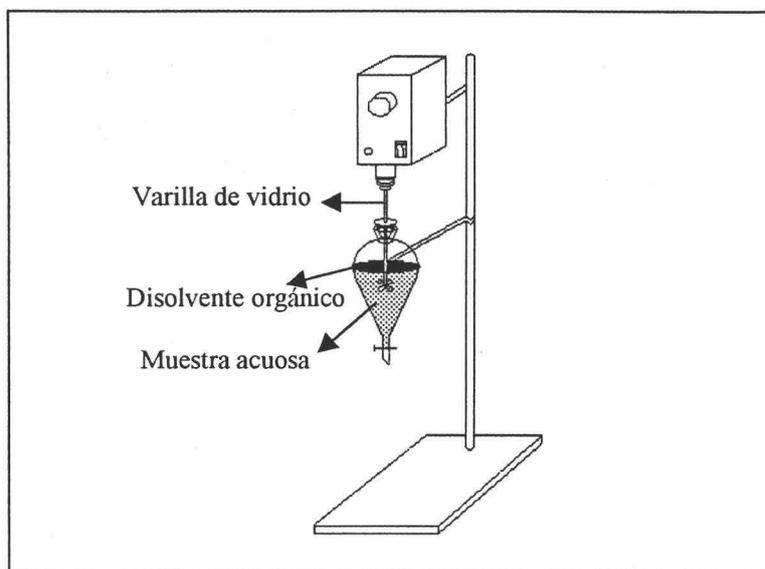
E. Finalmente, ante la falta de reproducibilidad de los procedimientos encontrados en bibliografía y como resultado tanto de los ensayos realizados en el laboratorio, se propuso un nuevo dispositivo para la extracción de muestras acuosas con disolventes orgánicos menos y más densos que el agua. Estos dispositivos en los que se prescinde

<sup>17</sup>Cromlab S.L. Liquid-liquid Extractor 310-1000.

de la agitación manual, constan de dos partes, el sistema de agitación mecánica y el sistema de separación de las fases.

*E.1. Sistema de agitación mecánica.*

La agitación del sistema fase acuosa-fase orgánica para la microextracción en los diferentes disolventes se realizó en un embudo de decantación empleando para ello el esquema que se muestra en la figura III.1.5. El montaje consta de un agitador mecánico que agita a velocidades comprendidas entre 50 y 2000 r.p.m., un embudo de decantación y un agitador de vidrio.



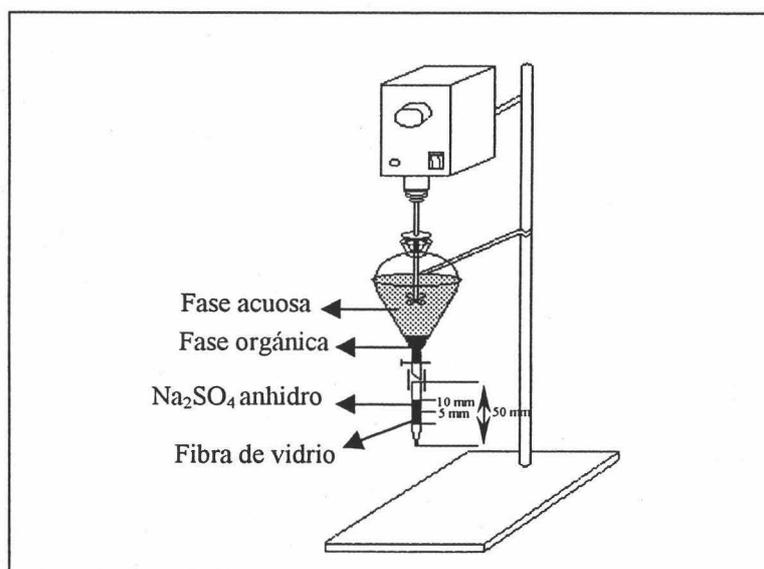
*Figura III.1.5. Montaje para agitación mecánica.*

La muestra acuosa introducida en el embudo de decantación es agitada mecánicamente a la velocidad adecuada durante un tiempo optimizado. Finalmente, se deja decantar el sistema durante el tiempo apropiado y se recoge la fase orgánica siguiendo dos procedimientos diferentes en función de la densidad del disolvente orgánico empleado en el proceso de microextracción.

### E.2. *Sistema de separación de fases.*

Se han propuesto dos según se empleen disolventes más o menos densos que el agua:

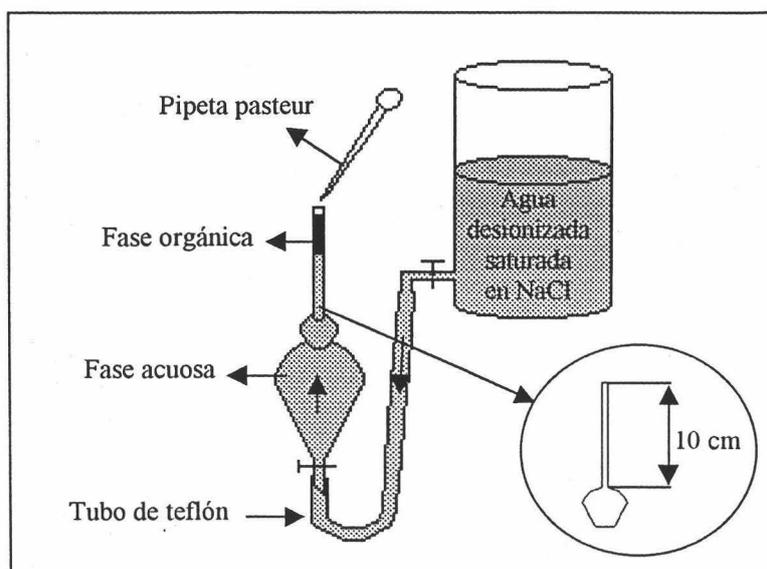
- Disolventes más densos que el agua. La separación se realiza por gravedad haciendo pasar el disolvente orgánico a través de una minicolumna de vidrio rellena de un agente desecante (sulfato sódico anhidro) acoplada al embudo de decantación tal y como se indica en la figura III.1.6.



*Figura III.1.6. Sistema de separación de fases para disolventes más densos que el agua.*

- Disolventes menos densos que el agua. En el caso de disolventes menos densos que el agua la separación de la fase orgánica se realiza haciendo uso del montaje que se muestra en la figura III.1.7. En él se conecta, mediante un tubo de teflón, el embudo de decantación a un depósito de vidrio que contiene agua saturada en cloruro sódico. El depósito se sitúa a mayor altura que el embudo de decantación por lo que la fase orgánica asciende, por el efecto de vasos comunicantes, hasta situarse en la pieza de vidrio colocada al efecto en la parte superior del embudo

de decantación y que se detalla en la figura. Con la ayuda de una pipeta Pasteur la fase orgánica puede ser fácilmente transferida a la cubeta de medida.



*Figura III.1.7. Sistema de separación de fases para disolventes menos densos que el agua*

#### 1.2.1.2. Comparación con otras técnicas separativas.

##### A. Extracción convencional y de purga y trampa para compuestos volátiles.

La microextracción ha sido aplicada en combinación con la cromatografía capilar de gases al análisis rutinario de los vertidos de fábricas<sup>18</sup>. Esta combinación permitió reducir considerablemente la preparación de la muestra puesto que la microextracción reemplaza tanto al método de extracción de purga y trampa para compuestos volátiles como al de extracción convencional para sustancias no volátiles, permitiendo de esta forma extraer cualquier tipo de sustancias mediante un único procedimiento. En este trabajo se lleva a cabo un estudio estadístico para demostrar que la microextracción era equivalente tanto a los métodos de extracción convencional como al método de purga y trampa. Los datos obtenidos demostraron que los resultados eran esencialmente iguales al comparar la extracción de compuestos volátiles por purga

<sup>18</sup>Thielen D.R., Olsen G., David A., Bajor E., Stofanovski J. and Chodkowski J. *Journal of Chromatographic Science*, 25, 12 (1987).

y trampa y por microextracción y la de compuestos no volátiles por extracción y microextracción. Así mismo, se puso de manifiesto que la microextracción era más precisa que la extracción por purga y trampa, aunque algo menos que la extracción convencional. En la tabla III.1.3 se muestran algunos datos de recuperación y reproducibilidad de compuestos orgánicos obtenidos a partir de un vertido industrial.

*Tabla III.1.3. Recuperación y reproducibilidad en microextracción*

Compuesto	*Recuperación (%)	Desviación estándar (DS)
Triclorobenceno	99.14	10.64
Hexaclorobutadieno	82.59	8.79
Tetraclorobenceno	98.92	10.41
Hexaclorociclopentadieno	99.27	18.94
Hexaclorociclohexano	94.20	14.17
Endosulfan	92.80	11.45
Tricloroetileno	80.80	9.56
Monoclorobenceno	84.48	9.86
Diclorobenceno	93.85	8.23

\*Media de 44 determinaciones

La menor reproducibilidad del proceso de microextracción con respecto a la extracción convencional era previsible teniendo en cuenta que en la segunda se utiliza una alta relación disolvente orgánico/agua.

#### B. *Extracción en fase sólida*

Para establecer la comparación entre ambos procesos de extracción se utilizó la determinación de un alachlor y dos de sus metabolitos a partir de muestras de agua subterránea para su posterior determinación por cromatografía de gases<sup>14</sup>.

La primera diferencia se obtiene por simple observación de los cromatogramas obtenidos en ambos casos. Mediante extracción en fase sólida se obtienen un mayor número de co-extractantes procedentes de los materiales empleados como soporte sólido y por tanto mayor riesgo de interferencias.

Los límites de detección y determinación obtenidos por ambos procedimientos fueron muy similares así como el resultado del análisis para el alachlor no volátil; pero en el caso de sus metabolitos, al tratarse de compuestos volátiles, la recuperación de los mismos mediante extracción en fase sólida no fue suficiente debido a la etapa de evaporación necesaria después de la elución.

Otra gran diferencia entre ambos métodos radica en el tiempo y costo del análisis. Mediante la extracción en fase sólida una persona puede analizar entre 10 y 15 muestras en un día, mientras que con micro-extracción se puede llegar a realizar más de 50 extracciones. Por otra parte, el costo global de un análisis con extracción en fase sólida es aproximadamente de 4 a 5 veces mayor que el correspondiente al mismo análisis empleando microextracción.

La microextracción por tanto parece presentar un enorme potencial y versatilidad para la extracción y concentración de una gran variedad de compuestos orgánicos en muestras acuosas de diversa naturaleza. En la presente Memoria se pretende combinar por primera vez la microextracción líquido-líquido con la determinación espectrofluorimétrica de bisfenol A, fenol y BADGE.

### **1.3. Propuesta de trabajo.**

Como conclusión estos estudios previos y considerando que nuestro objetivo es proponer métodos sensibles y selectivos para la determinación de bisfenol A, fenol y BADGE en medios acuosos mediante espectrofluorimetría, se propusieron dos metodologías de trabajo diferentes:

- A. Exaltación de la señal fluorescente en medio acuoso mediante la formación de complejos de inclusión entre bisfenol A y  $\beta$ -ciclodextrina. El método propuesto se desarrolla ampliamente en el apartado 2 de este capítulo.
- B. Determinación de los analitos en éter etílico, previa microextracción líquido líquido a partir de la muestra acuosa.

Siguiendo esta última metodología de trabajo, se proponen dos métodos diferentes: el primero para la determinación de bisfenol A en presencia de fenol mediante espectrofluorimetría derivada, y el segundo para la resolución de la mezcla formada por fenol, bisfenol A y bisfenol A diglicidil éter haciendo uso para ello de calibración multivariante (PLS). Estos métodos analíticos son ampliamente desarrollados en los apartados 3 y 4 de este capítulo, respectivamente.

## 2. DETERMINACIÓN ESPECTROFLUORIMÉTRICA DE BISFENOL A EN AGUAS MEDIANTE FORMACIÓN DE COMPLEJOS DE INCLUSIÓN.

Dada la escasez de métodos fluorimétricos existentes en bibliografía para el análisis de bisfenol A en muestras acuosas y su elevado interés como contaminante ambiental, en este apartado se propone el desarrollo de un método analítico para la determinación de este compuesto a nivel de trazas en muestras de agua de distinta procedencia. Para ello se hace uso de la espectrofluorimetría en combinación con la formación de complejos de inclusión mediante el empleo de ciclodextrinas, con objeto de mejorar dos aspectos claves en cualquier método analítico, sensibilidad y selectividad.

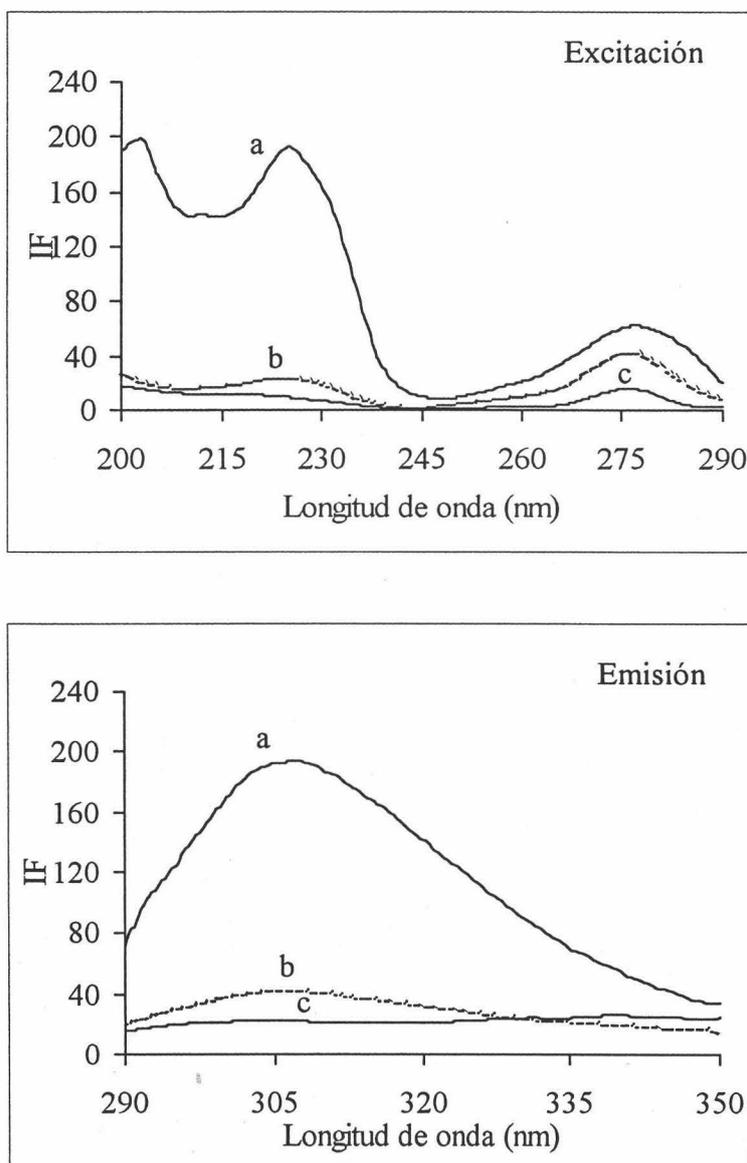
### 2.1. Comportamiento fluorescente del bisfenol A en presencia de $\beta$ -ciclodextrina. Establecimiento de los parámetros instrumentales.

Una vez seleccionada la  $\beta$ -ciclodextrina como agente modificador, se estudió el comportamiento fluorescente del bisfenol A en este medio y se optimizaron los principales parámetros instrumentales que afectan a la señal fluorescente emitida.

#### 2.1.1. *Espectros de excitación y emisión del complejo de inclusión formado. Selección de las longitudes de onda de medida.*

Para llevar a cabo esta experiencia, se prepararon dos disoluciones de bisfenol A, una en ausencia y otra en presencia de  $\beta$ -ciclodextrina siguiendo el procedimiento operatorio que a continuación se indica: En dos matraces aforados de 100 ml de capacidad se introdujeron 5 ml de una disolución acuosa de bisfenol A de  $5.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de concentración, se añadió en uno de ellos 1 ml de disolución acuosa de  $\beta$ -ciclodextrina de concentración  $5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  y se enrasaron ambas disoluciones al volumen final con agua desionizada. Así mismo, se preparó el blanco correspondiente. A continuación, se registraron los espectros de emisión y excitación fluorescentes de las disoluciones así preparadas, fijando como rendijas de excitación 5 nm y de emisión 10 nm respectivamente,

una velocidad de barrido de 240 nm/min y una temperatura de  $20.0 \pm 0.5$  °C. Los espectros obtenidos se muestran en la figura III.2.1.



**Figura III.2.1.** Espectros de excitación a  $\lambda_{em}=306$  nm y emisión a  $\lambda_{exc}=225$  nm del bisfenol A ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) en presencia de  $\beta$ -ciclodextrina ( $10^{-4}M$ ) (a), bisfenol A en ausencia de  $\beta$ -ciclodextrina (b) y blanco (c).

Como se observa en la figura, el espectro de excitación del bisfenol A en presencia de  $\beta$ -ciclodextrina, presenta dos máximos a longitudes de onda de 225 nm y 276 nm respectivamente, siendo el más intenso el de menor longitud de onda. Por el contrario, en medio acuoso la molécula sólo presenta el máximo de excitación localizado a 276 nm, que coincide con el menos intenso cuando la  $\beta$ -CDx está presente. El espectro de emisión presenta un único máximo en ambos medios localizado a 306 nm.

Fueron seleccionadas por lo tanto como longitudes de onda de excitación y emisión 225 nm y 306 nm respectivamente, para experiencias posteriores.

### 2.1.2. Rendijas de excitación y emisión.

Para optimizar los valores correspondientes a las rendijas de excitación y emisión, se preparó una disolución de bisfenol A de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de concentración siguiendo el procedimiento analítico descrito anteriormente y se registraron los espectros de emisión fluorescente en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 300 y 350 nm. Las aberturas de las rendijas de excitación y emisión se modificaron según los valores recogidos en la tabla III.2.1. La intensidad de fluorescencia emitida se midió a las longitudes de onda ya establecidas y a una temperatura de  $20.0\pm 0.5$  °C. Los resultados son mostrados en la tabla.

*Tabla III.2.1. Rendijas de excitación y emisión.*

Rendijas (exc/em)	IF*	Rendijas (exc/em)	IF*
2.5/2.5	---	10.0/2.5	---
2.5/5.0	35.54	10.0/5.0	32.49
2.5/10.0	172.99	10.0/10.0	166.89
2.5/15.0	388.75	10.0/15.0	396.40
5.0/2.5	---	15.0/2.5	---
5.0/5.0	25.88	15.0/5.0	14.89
5.0/10.0	185.30	15.0/10.0	147.72
5.0/15.0	386.60	15.0/15.0	350.92

\* Restada la señal del blanco

Se observa en la tabla que, al aumentar el tamaño de rendija de emisión aumenta la señal fluorescente, sin embargo, se produce un descenso en la intensidad de fluorescencia al aumentar la anchura de la rendija de excitación debido a la configuración instrumental del espectrofluorímetro. No obstante, al aumentar la rendija de excitación se produce también una disminución del ruido de fondo evitando así la necesidad de un posterior suavizado del espectro, teniendo en cuenta estos factores, se seleccionaron rendijas de 5 y 10 nm para excitación y emisión respectivamente, ya que a pesar de que en principio se podría pensar que existen otras combinaciones más favorables, el empleo de una rendija de emisión mayor supondría un acortamiento en el posterior establecimiento del rango dinámico lineal.

## **2.2. Optimización de variables experimentales. Establecimiento de constantes.**

Se describe a continuación la influencia ejercida por las principales variables experimentales que afectan o pueden afectar al comportamiento fluorescente del bisfenol A en presencia de  $\beta$ -ciclodextrina. Las variables objeto de nuestro estudio fueron:

### ***2.2.1. Influencia de la concentración de $\beta$ -ciclodextrina. Cálculo de la estequiometría y constante de formación del complejo de inclusión.***

Se optimizó la concentración de  $\beta$ -ciclodextrina con objeto de obtener la máxima señal fluorescente del bisfenol A, sin que se produjera un incremento considerable en la señal emitida por el blanco, problema habitual cuando se trabaja con este tipo de medios.

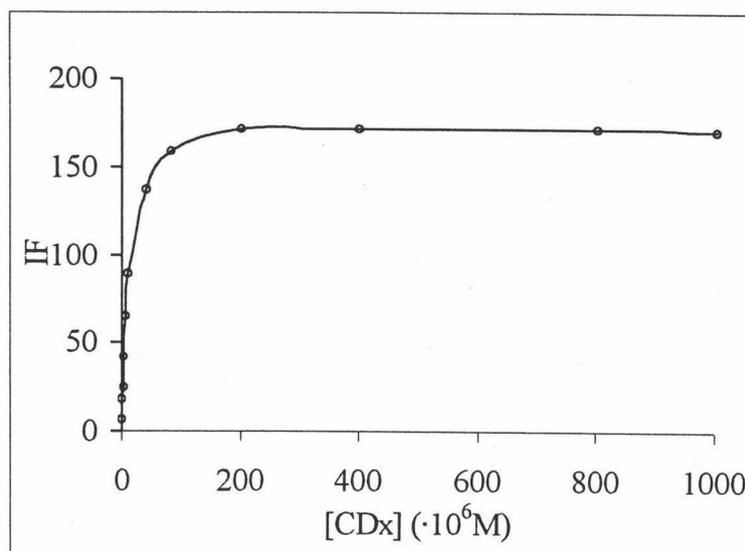
Para llevar a cabo esta experiencia se preparó una serie de disoluciones con una concentración constante de bisfenol A de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  y se modificó la concentración de  $\beta$ -ciclodextrina en el rango comprendido entre 0.00 M y 0.01 M. Paralelamente se preparó otra serie de disoluciones blanco que contenían la misma concentración de  $\beta$ -ciclodextrina. La intensidad de fluorescencia de cada una de las disoluciones se midió a  $\lambda_{\text{exc}}=225 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}}=306 \text{ nm}$ , con rendijas de excitación y emisión de 5 y 10 nm respectivamente,

velocidad de barrido 240 nm/minuto y temperatura  $20.0 \pm 0.5$  °C. Los resultados experimentales se recogen en la tabla III.2.2 y se representan en la figura III.2.2.

*Tabla III.2.2. Influencia de la concentración de  $\beta$ -ciclodextrina*

$[\beta\text{-CDx}]$	$IF_{\text{BFA}}$	$IF_{\text{Blanco}}$	$IF^*$	$[\beta\text{-CDx}]$	$IF_{\text{BFA}}$	$IF_{\text{Blanco}}$	$IF^*$
0.00	26.97	20.01	6.96	$4 \cdot 10^{-5}$	163.51	26.83	136.68
$10^{-6}$	46.33	28.41	17.92	$8 \cdot 10^{-5}$	190.51	31.79	158.73
$2 \cdot 10^{-6}$	56.09	31.23	24.86	$10^{-4}$	202.48	30.52	171.86
$4 \cdot 10^{-6}$	83.25	35.86	42.39	$4 \cdot 10^{-4}$	227.42	55.48	171.94
$8 \cdot 10^{-6}$	105.83	30.96	64.87	$8 \cdot 10^{-4}$	250.82	79.54	171.28
$10^{-5}$	118.09	28.51	89.58	$10^{-3}$	292.92	121.32	170.60

\* Restada la señal del blanco.



*Figura III.2.2. Influencia de la concentración de  $\beta$ -ciclodextrina.*

Según los datos mostrados se concluye que la concentración mínima de  $\beta$ -ciclodextrina necesaria para obtener la máxima señal con la concentración de bisfenol A ensayada es  $10^{-4}$  M, pues a esta concentración la intensidad de fluorescencia obtenida alcanza su valor máximo, manteniéndose constante para concentraciones superiores como queda reflejado en la figura.

A partir de los datos obtenidos en la experiencia anterior, se estableció así mismo la estequiometría y la constante de formación del complejo de inclusión. Se emplearon para ello los métodos propuestos por Benesi-Hildebrand<sup>6,19</sup> y Scatchard<sup>20</sup>.

### 2.2.1.1. Método de Benesi-Hildebrand

Este método presupone diferentes estequiometrías para el complejo de inclusión, y a partir de éstas deduce una expresión válida para el cálculo de la estequiometría real, confirmándose a partir de los resultados obtenidos si la estequiometría presupuesta es cierta o por el contrario hay que ensayar otra.

Si suponemos una **estequiometría 1:1**, la constante de formación del complejo viene dada por la expresión:

$$K = \frac{[BFA \cdot \beta - CDx]}{[BFA][\beta - CDx]} \quad (1)$$

donde  $[BFA \cdot \beta - CDx]$  es la concentración del complejo en el equilibrio, y  $[BFA]$  y  $[\beta - CDx]$  representan las concentraciones de bisfenol A y ciclodextrina libres en el equilibrio.

El método parte de la suposición de que  $[\beta - CDx]$  es mucho mayor que  $[BFA \cdot \beta - CDx]$  en el equilibrio, por tanto se puede afirmar que  $[CDx] = [CDx]_0$ . Operando sobre la ecuación (1) se llega a la expresión:

$$\frac{1}{[BFA \cdot \beta - CDx]} = \frac{1 + K [BFA]_0}{K [BFA]_0 [\beta - CDx]_0} \quad (2)$$

donde  $[BFA]_0 = [BFA] + [BFA \cdot \beta - CDx]$  y  $[\beta - CDx]_0 = [\beta - CDx] + [BFA \cdot \beta - CDx] = [\beta - CDx]$

<sup>19</sup>Benesi H.A and Hilderbrand J.H. *Journal of American Chemical Society*, **71**, 2703 (1949).

<sup>20</sup>Durán-Merás I., Muñoz de la Peña A., Salinas F. and Rodríguez I., *Analyst*, **119**, 1215 (1994).

La intensidad de fluorescencia del bisfenol A en ausencia ( $I_0$ ) y presencia ( $I_\infty$ ) de ciclodextrina es proporcional a las concentraciones en el equilibrio de bisfenol A y de complejo respectivamente, y la ecuación anterior queda:

$$\frac{1}{(I - I_0)} = \frac{1}{(I_\infty - I_0)K[\beta - CDx]_0} + \frac{1}{(I_\infty - I_0)}$$

donde  $I$  representa la intensidad de fluorescencia a cada concentración de  $\beta$ -ciclodextrina.

Si la estequiometría del complejo es 1:1, la representación de  $1/(I - I_0)$  vs  $1/[\beta - CDx]$  será una línea recta (figura III.2.3 (I)).

Si se supone ahora una **estequiometría 1:2**, en este caso la constante de formación del complejo vendría dada por la expresión:

$$K = \frac{[BFA \cdot \beta - CDx]}{[BFA][\beta - CDx]^2} \quad (4)$$

y operando de una forma similar a la anterior, se llega a la expresión

$$\frac{1}{(I - I_0)} = \frac{1}{(I_\infty - I_0)K[\beta - CDx]_0^2} + \frac{1}{(I_\infty - I_0)} \quad (5)$$

En este caso si la estequiometría del complejo es 1:2, la representación de  $1/(I - I_0)$  vs  $1/[\beta - CDx]^2$  será una línea recta (figura III.2.3 (II)). Si se obtiene, por el contrario, una curva se confirma que la estequiometría no es 1:2.

En la tabla III.2.3 se muestran los datos calculados a partir de los resultados experimentales mostrados en la tabla III.2.2, necesarios para la realización de ambas representaciones, así mismo, en la figura III.2.3 se recogen ambas representaciones.

Tabla III.2.3. Estequiometría y constante de formación del complejo de inclusión.

$[\beta\text{-CD}_x]$ M	$1/[\beta\text{-CD}_x]$	$1/[\beta\text{-CD}_x]^2$	$(I-I_0)$	$1/(I-I_0)$	$(I-I_0)/[\beta\text{-CD}_x]$
0.00	0	0	0	0	--
$10^{-6}$	$10^6$	$10^{12}$	19.36	$5.21 \cdot 10^{-2}$	$1.93 \cdot 10^7$
$2 \cdot 10^{-6}$	$5 \cdot 10^5$	$2.5 \cdot 10^{11}$	34.13	$2.93 \cdot 10^{-2}$	$1.71 \cdot 10^7$
$4 \cdot 10^{-6}$	$2.5 \cdot 10^5$	$6.25 \cdot 10^{10}$	56.28	$1.77 \cdot 10^{-2}$	$1.41 \cdot 10^7$
$8 \cdot 10^{-6}$	$1.25 \cdot 10^5$	$1.56 \cdot 10^{10}$	78.87	$1.27 \cdot 10^{-2}$	$9.86 \cdot 10^6$
$10^{-5}$	$10^5$	$10^{10}$	91.12	$1.10 \cdot 10^{-2}$	$9.11 \cdot 10^6$
$4 \cdot 10^{-5}$	$2.5 \cdot 10^5$	$6.25 \cdot 10^8$	136.54	$7.32 \cdot 10^{-3}$	$3.41 \cdot 10^6$
$8 \cdot 10^{-5}$	$1.25 \cdot 10^4$	$1.56 \cdot 10^8$	163.55	$6.11 \cdot 10^{-3}$	$2.04 \cdot 10^6$
$10^{-4}$	$10^4$	$10^8$	175.51	$5.70 \cdot 10^{-3}$	$1.75 \cdot 10^6$

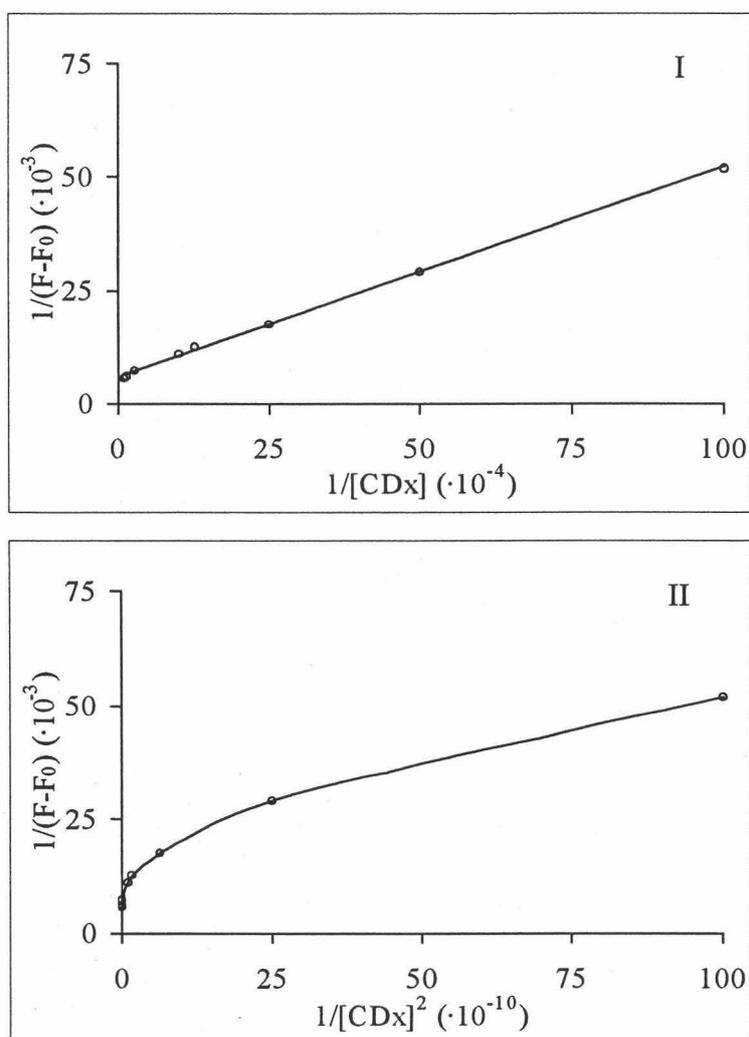


Figura III.2.3. Representaciones para el método de Benesi-Hildebrand.  
(I) Estequiometría 1:1 y (II) Estequiometría 1:2

### 2.2.1.2. Método de Scatchard.

Este segundo supone que si la estequiometría del complejo es 1:1, la relación entre la intensidad de fluorescencia observada ( $I-I_0$ ) y la concentración de ciclodextrina vendrá dada por la expresión:

$$\frac{(I-I_0)}{[\beta-CDx]} = (I_\infty - I_0) - (I-I_0)K \quad (6)$$

donde  $I_0$  es la intensidad de fluorescencia del bisfenol A en ausencia de  $\beta$ -ciclodextrina,  $I_\infty$  es la intensidad de fluorescencia cuando todas las moléculas de bisfenol A están formando complejo con la ciclodextrina,  $I$  es la intensidad a cada concentración de  $\beta$ -ciclodextrina,  $K$  es la constante de formación del complejo de inclusión y  $[\beta-CDx]$  es la concentración de ciclodextrina en cada caso.

Si al representar  $(I-I_0)/[\beta-CDx]$  vs  $(I-I_0)$  obtenemos una línea recta (figura III.2.4), se confirmará que la estequiometría (1:1) supuesta de partida, es cierta y la pendiente de esta recta nos dará la constante de formación del complejo.

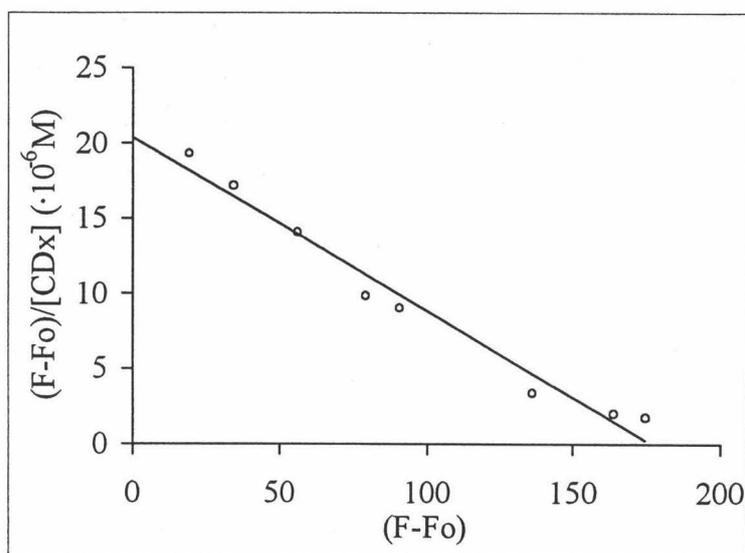


Figura III.2.4. Representación de Scatchard.

En la tabla III.2.4 se recogen los datos obtenidos por mínimos cuadrados correspondientes a las representaciones anteriores, a partir de los cuales se determinó la estequiometría y la constante de formación del complejo según ambos métodos.

*Tabla III.2.4. Cálculo de la estequiometría y la constante de formación.*

	<b>Benesi-Hildebrand (I)</b>	<b>Scatchard</b>
<b>Pendiente</b>	$4.63 \cdot 10^{-8}$	$-1.15 \cdot 10^5$
<b>Ordenada</b>	$6.04 \cdot 10^{-3}$	$2.04 \cdot 10^5$
<b>r<sup>2</sup> (%)</b>	99.9	97.4

Tanto las representaciones gráficas obtenidas como los datos correspondientes al ajuste por mínimos cuadrados en el caso del método propuesto por Benesi-Hildebrand, indican que la estequiometría del complejo de inclusión formado es 1:1. Para el caso del método de Scatchard, los datos obtenidos son menos evidentes, aunque este mismo comportamiento se ha observado en los casos encontrados en bibliografía en los que se emplea este método. Se puede concluir por tanto que *la estequiometría del complejo de inclusión es 1:1*.

Finalmente, se calculó la constante de formación del complejo, haciendo uso de ambos métodos. En el método de Scatchard, la constante viene dada por la pendiente de la recta obtenida; en el caso del método de Benesi-Hildebrand, la constante se determina dividiendo la ordenada en el origen entre la pendiente de la recta obtenida en la representación I. Los valores calculados por ambos métodos son  $1.15 \cdot 10^5$  y  $1.30 \cdot 10^5$   $l \cdot mol^{-1}$  respectivamente.

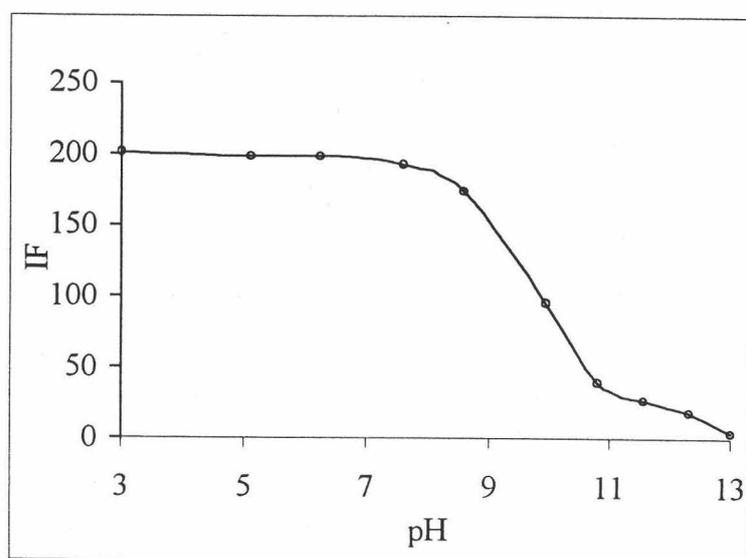
### **2.2.2. Influencia del pH del medio. Cálculo de la constante de acidez del complejo de inclusión.**

Se estudió la Influencia que ejerce el pH del medio sobre la intensidad de fluorescencia emitida por el complejo de inclusión BFA·β-CDx. Así mismo, con los datos experimentales obtenidos, se calculó la constante de acidez del complejo.

Para llevar a cabo esta experiencia se preparó una serie de disoluciones en matraces aforados de 10 ml de capacidad se prepararon disoluciones que contenían 0.5 ml de disolución acuosa de bisfenol A de  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de concentración y 1 ml de disolución de  $\beta$ -ciclodextrina de concentración  $10^{-3} \text{ M}$ . Se adicionó agua desionizada hasta un volumen próximo al enrase y mediante la adición de HCl o NaOH de diferente concentración se fijó el pH deseado. A continuación se enrasó al volumen final de 10 ml con agua desionizada y se volvió a realizar la medida de pH. Finalmente, se registraron los espectros de emisión a las disoluciones así preparadas fijando las condiciones instrumentales habituales, es decir:  $\lambda_{\text{exc}} = 225 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 306 \text{ nm}$ , rendijas de excitación y emisión 5 y 10 nm respectivamente, velocidad de barrido 240 nm/minuto y temperatura  $20.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Los resultados obtenidos se muestran en la tabla III.2.5 y se representan en la figura III.2.5.

*Tabla III.2.5. Influencia del pH.*

pH	IF	pH	IF
3.00	200.82	9.93	95.23
5.10	198.35	10.80	39.91
6.25	198.67	11.54	27.57
7.60	193.17	12.31	18.24
8.57	174.06	13.00	3.94

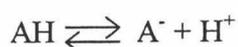


*Figura III.2.5. Influencia del pH del medio.*

La representación gráfica de los datos demuestra que la intensidad de fluorescencia emitida por el complejo de inclusión permanece prácticamente constante para valores de pH inferiores a 8.0, mientras que a partir de este valor, la señal fluorescente disminuye rápidamente haciéndose despreciable. Se concluye, por tanto, la forma protonada del complejo formado por la  $\beta$ -ciclodextrina y el bisfenol A es la que presenta fluorescencia, no haciéndolo la forma disociada.

A partir de los datos mostrados en la tabla anterior, se calculó la constante de acidez del complejo de inclusión. Se aplicó para ello el método propuesto por Wilson y Lester<sup>21</sup> a los datos correspondientes a la curva de valoración espectrofluorimétrica. El método se basa en los siguientes aspectos:

Supongamos un ácido débil que se ioniza según el proceso:



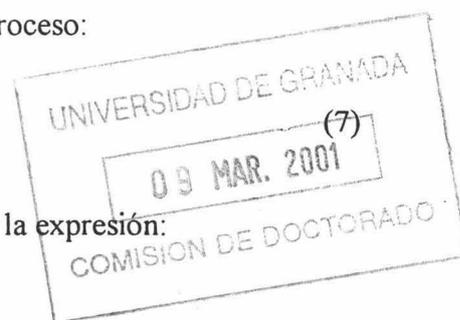
En este caso, la constante de acidez vendrá dada por la expresión:

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[AH]} \quad (8)$$

donde  $[A^-]$  es la concentración de la forma desprotonada del ácido en el equilibrio,  $[H^+]$  la concentración de protones y  $[AH]$  la concentración del ácido.

Para la realización práctica del método, se estudia la variación que sufre la intensidad de fluorescencia del complejo de inclusión en función del pH. Para ello, se mide la señal debida a las especies AH y  $A^-$ , de forma que la intensidad de fluorescencia relativa media se puede expresar como la suma de ambas contribuciones, la debida a la forma AH ( $I_{AH}$ ) y la emitida por la forma  $A^-$  ( $I_{A^-}$ ), es decir:

<sup>21</sup> Wilson R.F. and Lester G.W.. *Talanta*, 10, 319 (1963).



$$I_m = I_{AH} + I_{A^-} \quad (9)$$

Si el medio es básico, el equilibrio estará desplazado hacia la derecha ( $C_{A^-} \sim C_T$ ), y en este caso es correcto suponer que la fluorescencia se debe únicamente a la forma básica ( $I_m = I_{A^-}$ ).

Análogamente, cuando el medio es suficientemente ácido, ( $C_{AH} \sim C_T$ ) podemos suponer que ahora la fluorescencia se debe sólo a la especie protonada ( $I_m = I_{AH}$ ).

Si operamos sobre la ecuación (9) y llamamos R al cociente

$$R = \frac{(I_{AH} - I_m)}{(I_m - I_{A^-})} \quad (10)$$

se obtienen las expresiones

$$pKa = -\log R + pH \quad \text{y} \quad \log R = pH - pKa \quad (11)$$

Por tanto si se representa  $\log R$  frente al  $pH$  se obtiene una recta, donde en el punto  $\log R = 0$ , se cumple que  $pH = pKa$ , lo cual nos permite calcular el valor de  $K_a$ .

En la tabla III.2.6 se muestran los valores calculados para la obtención de la constante de acidez del complejo de inclusión. Dichos datos son representados en la figura III.2.6.

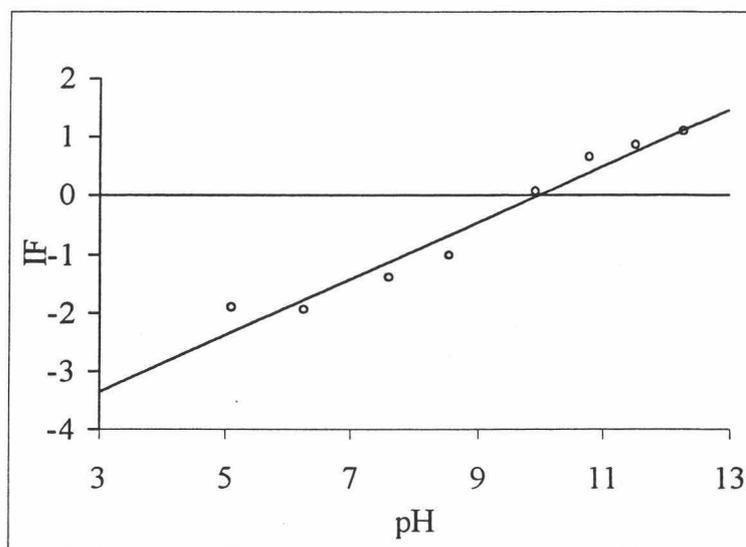
El ajuste por mínimos cuadrados de los datos calculados permite obtener los valores siguientes:

<i>a</i> (ordenada en el origen)	-4.086
<i>b</i> (pendiente)	0.491
<i>r</i>	0.9638

El valor de  $pH$  para el cual  $\log R = 0$  es 9.8, por tanto este es el valor correspondiente a  $pK_a$  siendo  $K_a = 6,31 \cdot 10^9 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ .

*Tabla III.2.6. Determinación de la constante de acidez del complejo.*

pH	R	Log R	pH	R	Log R
3.00	---	---	9.93	1.156	0.630
5.10	0.012	-1.896	10.80	4.470	0.651
6.25	0.011	-1.957	11.54	7.330	0.865
7.60	0.040	-1.393	12.31	12.760	1.107
8.57	0.093	-1.031	13.00	---	---



*Figura III.2.6. Determinación de  $K_a$  del complejo.*

### 2.2.3. Influencia de la fuerza iónica del medio sobre la señal fluorescente.

Se estudió la influencia de la fuerza iónica del medio sobre la intensidad de fluorescencia emitida por el complejo de inclusión, para lo cual se emplearon tres sales diferentes: cloruro, acetato y perclorato sódico.

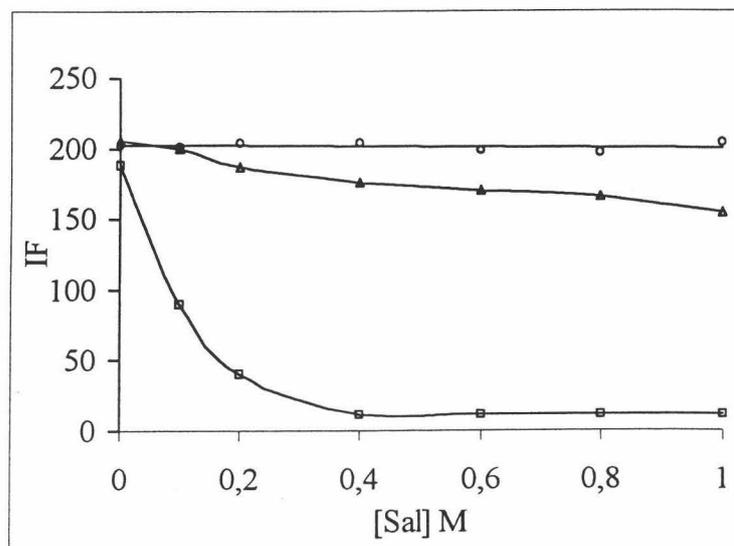
Siguiendo el procedimiento operatorio habitual, se prepararon tres series de disoluciones en matraces aforados de 10 ml de capacidad en los cuales se introdujeron 0.5 ml de disolución acuosa de bisfenol A de concentración  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , 1 ml de  $\beta$ -ciclodextrina de concentración  $10^{-3} \text{ M}$  y cantidades crecientes de NaCl,  $\text{NaClO}_4$  o  $\text{CH}_3\text{COONa}$  respectivamente, para conseguir concentraciones en el rango 0.0 a 1.0 M. Se registró el espectro de emisión de cada disolución en un intervalo de longitudes de onda comprendido entre 300 y 350 nm fijando una longitud de onda de excitación de 225 nm. La intensidad de fluorescencia emitida se midió a 306 nm, con rendijas de excitación/emisión de 5/10 nm y a temperatura de  $20.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ . Se prepararon así mismo los respectivos blancos para cada serie.

Los datos experimentales obtenidos son mostrados en la tabla III.2.7 y representados en la figura III.2.7.

Se observa que la presencia de NaCl no afecta a la señal emitida por el complejo de inclusión BFA $\cdot\beta$ -CDx. Sin embargo, los otros dos electrolitos ejercen una influencia negativa sobre la emisión fluorescente del complejo. De ellos el acetato ejerce una mayor influencia llegando a producir la práctica desaparición de la misma para una concentración aproximada 0.4 M, debido probablemente a la competencia que ejerce el  $\text{AcO}^-$  con el bisfenol A por penetrar en la cavidad de la ciclodextrina.

*Tabla III.2.7. Influencia de la fuerza iónica del medio*

[Sal] ( $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	IF			[Sal] ( $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )	IF		
	NaCl	$\text{NaClO}_4$	AcONa		NaCl	$\text{NaClO}_4$	AcONa
0.00	203.41	206.27	189.05	0.60	198.81	170.00	10.95
0.10	201.42	200.00	90.01	0.80	196.59	165.43	10.95
0.20	204.08	187.17	40.68	1.00	204.36	154.87	10.95
0.40	204.46	175.62	10.95	1.20	--	--	



**Figura III.2.7.** Influencia de la fuerza iónica.  
*NaCl (o), NaClO<sub>4</sub> (Δ) y CH<sub>3</sub>COONa (□).*

#### 2.2.4. Influencia de la temperatura sobre la señal fluorescente.

Uno de los factores que ejerce mayor influencia sobre la emisión fluorescente es la temperatura a la que se realiza la medida de fluorescencia de la muestra. Un incremento en dicha variable puede llegar incluso a hacer desaparecer la señal ya que al aumentar la temperatura se favorece la desactivación no radiativa.

Para estudiar la influencia de esta variable se diseñó la siguiente experiencia: En un matraz aforado de 10 ml de capacidad se adicionó 0.5 ml de una disolución acuosa de bisfenol A de concentración  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  y 1 ml de disolución de  $\beta$ -ciclodextrina de concentración  $10^{-3} \text{ M}$ , se enrasó hasta el volumen final con agua desionizada y a continuación se registró el espectro de emisión fluorescente de la disolución modificando la temperatura del sistema en el intervalo comprendido entre 10 y 65 °C, anotándose la intensidad de fluorescencia emitida cada 5 °C.

En la tabla y figura III.2.8 se recogen y representan los resultados obtenidos al calentar el sistema y posteriormente enfriarlo con ayuda de un termostato.

Tabla III.2.8. Influencia de la temperatura del sistema.

Temperatura creciente				Temperatura decreciente			
T (°C)	IF	T (°C)	IF	T (°C)	IF	T (°C)	IF
10.1	271.16	40.0	170.21	66.7	110.58	35.0	181.70
15.0	243.83	45.0	156.68	60.1	123.10	27.6	200.86
20.0	226.48	49.9	147.71	54.8	136.67	25.0	206.39
25.1	210.93	55.5	134.40	50.1	145.16	20.0	224.32
30.0	194.37	60.6	124.07	45.2	157.0	15.1	241.54
34.9	181.52	66.7	110.58	40.2	169.41	10.2	269.02

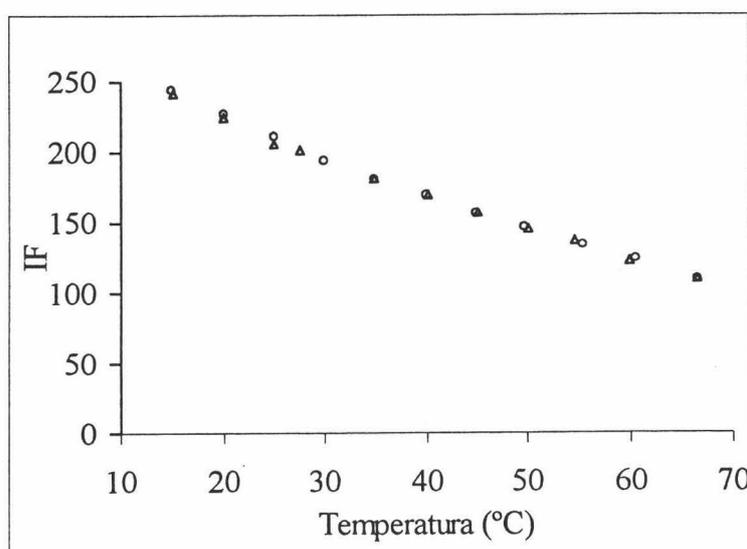


Figura III.2.8. Influencia de la temperatura: creciente (o) y decreciente (Δ).

Se observa en la figura que la intensidad de fluorescencia disminuye al aumentar la temperatura, correspondiendo este decrecimiento a un 16.5 % hasta 20 °C, a un 37.2 % hasta 40 °C y a un 54.2 % hasta 60 °C. Igualmente se comprobó que se obtenían prácticamente los mismos valores para la intensidad de fluorescencia al enfriar el sistema previamente calentado, lo que indica que se trata de un proceso reversible. Este comportamiento nos obliga a fijar la temperatura de trabajo para experiencias posteriores. Se eligió la temperatura de 20 °C, próxima a la ambiente, fácil de conseguir mediante el empleo de un termostato y a la cual la pérdida de señal no es significativa

### 2.3. Resumen de la optimización de variables.

En la siguiente tabla se incluyen los valores óptimos establecidos para las variables experimentales e instrumentales en las experiencias desarrolladas a lo largo de los apartados anteriores.

*Tabla III.2.9. Resumen de variables experimentales e instrumentales.*

Variable	Óptimo	Variable	Óptimo
$\lambda_{exc}$ (nm)	225	T <sup>a</sup> (°C)	20.0±0.5
$\lambda_{em}$ (nm)	306	V <sub>barrido</sub> (nm/min)	240
Rend exc (nm)	5	[ $\beta$ -CDx] (M)	10 <sup>-4</sup>
Rend em (nm)	10	pH	---

### 2.4. Parámetros analíticos.

#### 2.4.1. Establecimiento y verificación del modelo.

El modelo de regresión seleccionado en este caso fue el univariante. Como ya se señaló en el capítulo II de esta Memoria, la estimación de los parámetros  $a$  y  $b$  del modelo es la primera operación a realizar, con objeto de obtener la función lineal de calibración. Partimos de una serie de  $n$  pares de datos experimentales correspondientes a valores de concentración y señal analítica a los que se aplica el método de regresión por mínimos cuadrados.

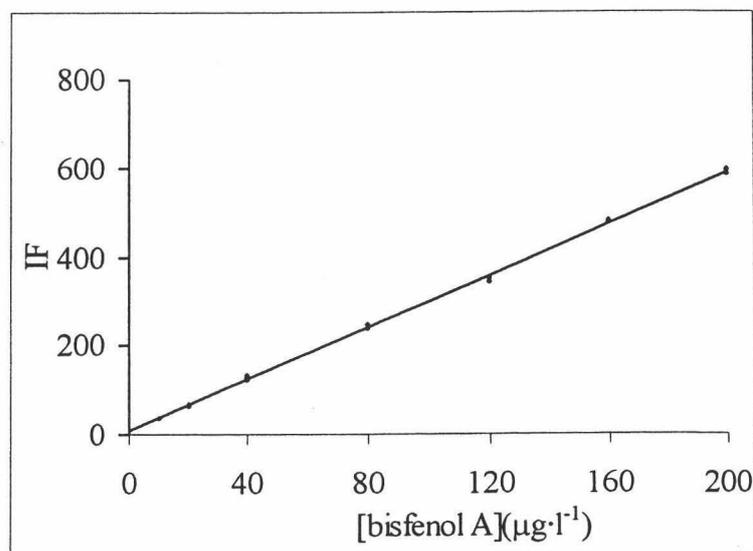
Para ello, una serie de matraces aforados de 10 ml de capacidad se prepararon de disoluciones que contenían volúmenes crecientes de disolución acuosa de bisfenol A de concentración 1 mg·l<sup>-1</sup>, para conseguir concentraciones finales comprendidas en el rango 10.0 a 200.0  $\mu$ g·l<sup>-1</sup>. A continuación, se adicionó 1 ml de disolución acuosa de  $\beta$ -ciclodextrina de concentración 10<sup>-3</sup> M, y se enrasó hasta el volumen final con agua desionizada. Se realizaron tres réplicas experimentales de cada una de las concentraciones

empleadas y se preparó además una disolución blanco. Finalmente, se midió la señal fluorescente correspondiente a cada disolución, fijando las condiciones experimentales e instrumentales previamente establecidas:  $\lambda_{exc}=225$  nm,  $\lambda_{em}=306$  nm, rendijas (exc/em)=5/10 nm, velocidad de barrido 240 nm/min y temperatura  $20.0 \pm 0.5$  °C.

Los parámetros del modelo estimados a partir de los resultados experimentales así como sus correspondientes intervalos de incertidumbre son los mostrados en la tabla III.2.10 y se representan en la figura III.2.9.

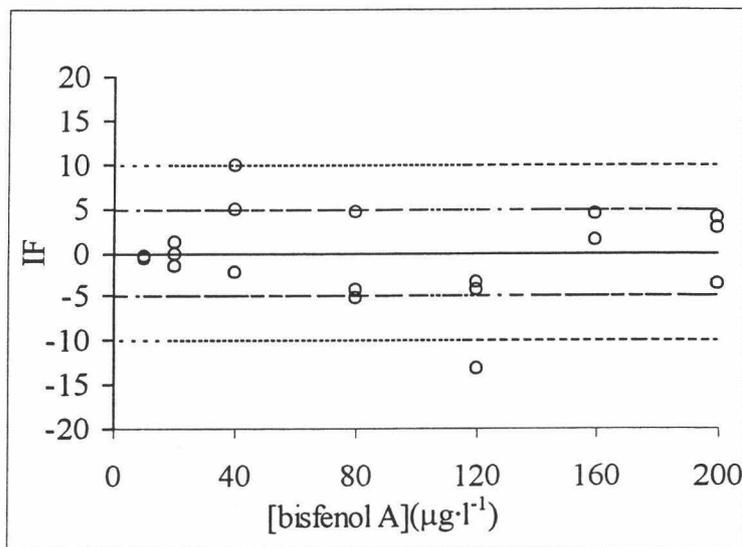
*Tabla III.2.10. Parámetros del calibrado.*

Parámetro	Valor
<b>a (UF)</b>	$1.82 \pm 0.84$
<b><math>s_a</math> (UF)</b>	1.833
<b>b (<math>l \cdot \mu g^{-1}</math>)</b>	$2.91 \pm 0.03$
<b><math>s_b</math> (<math>l \cdot \mu g^{-1}</math>)</b>	0.0161
<b><math>r^2</math> (%)</b>	99.94
<b><math>s_{RC}</math></b>	5.035
<b><math>P_{lack\ of\ fit}</math> (%)</b>	5.0



*Figura III.2.9. Función de calibrado del complejo de inclusión bisfenol A- $\beta$ -ciclodextrina.*

Finalmente, para evaluar el cumplimiento de la condición de homocedasticidad en los datos, se hizo uso del análisis gráfico de los residuales. La representación gráfica de dichos residuales es mostrada en la figura III.2.10.



*Figura III.2.10. Evaluación de la condición de homocedasticidad.*

En ella se observa el cumplimiento de las tres premisas establecidas para la condición de homocedasticidad según el criterio adoptado. Mediante este gráfico también se puede detectar la presencia de valores anómalos.

#### *2.4.2. Parámetros de calidad del método analítico.*

Los parámetros de calidad establecidos según las recomendaciones especificadas por la IUPAC y desarrollados en el capítulo II de esta Memoria fueron: Rango dinámico lineal y linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión y sensibilidad analítica.

##### *2.4.2.1. Rango dinámico lineal y linealidad.*

El rango lineal de trabajo seleccionado fue  $10.0$  a  $200.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Por otra parte, la linealidad calculada según la expresión mostrada en el capítulo II fue  $99.45 \%$ .

#### 2.4.2.2. Límites de detección y cuantificación.

Para calcular el límite de detección se siguió el criterio desarrollado en el capítulo II. La experiencia realizada fue la siguiente: En 10 matraces aforados de 10 ml de capacidad se prepararon disoluciones blanco que contenían 1 ml de  $\beta$ -ciclodextrina y agua destilada hasta el enrase. El espectro de emisión fluorescente de estas disoluciones fue registrado fijando las condiciones instrumentales habituales. Los resultados obtenidos son mostrados en la tabla III.2.11.

*Tabla III.2.11. Señales obtenidas para las diez disoluciones blanco.*

Blanco	IF	Blanco	IF
1	20.59	6	20.57
2	21.57	7	20.50
3	20.25	8	19.96
4	21.26	9	21.23
5	21.05	10	21.08

La desviación estándar de la señal del blanco calculada es 0.508, la pendiente de la recta de calibrado obtenida fue  $2.91 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , por tanto el límite de detección del método analítico será de  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

Si la señal fluorescente encontrada en una muestra es  $IF > (20.8 \pm 3 \cdot 0.506) = 22.3$ , podemos afirmar con una certeza del 99.86% que el bisfenol A está presente en dicha muestra.

El límite de cuantificación calculado según el criterio desarrollado en el capítulo II fue de  $1.7 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

#### 2.4.2.3. Precisión.

La precisión del método analítico propuesto se ha evaluado a partir de la reproducibilidad de la señal analítica emitida por 10 disoluciones de concentración constante e igual a  $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de bisfenol A valor correspondiente al punto central del

rango dinámico lineal establecido. En la tabla III.2.12 se recoge la señal luminiscente medida a  $\lambda_{exc}= 225$  nm,  $\lambda_{em}= 306$  nm, con rendijas de excitación y emisión 5 y 10 nm respectivamente, velocidad de barrido 240 nm/min y temperatura  $20.0\pm 0.5^\circ\text{C}$ .

*Tabla III.2.12. Reproducibilidad del método analítico.*

<b>Patrón</b>	<b>IF</b>	<b>Patrón</b>	<b>IF</b>
<b>01</b>	421.07	<b>06</b>	427.90
<b>02</b>	424.30	<b>07</b>	418.25
<b>03</b>	418.25	<b>08</b>	418.56
<b>04</b>	427.90	<b>09</b>	426.38
<b>05</b>	423.09	<b>10</b>	425.41

La desviación estándar de la señal es 3.878, teniendo en cuenta que el valor medio de la señal fluorescente es 423.0. Por tanto, el valor calculado para la desviación estándar relativa (*DSR*) es 0.92%, por lo tanto se concluye que el método propuesto para la determinación de bisfenol A es reproducible en las condiciones de trabajo empleadas.

#### 2.4.2.4. *Sensibilidad.*

De acuerdo con las definiciones propuestas en el capítulo II, la sensibilidad del calibrado es  $2.91 \text{ l}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ , que corresponde al valor obtenido para la pendiente de la función de calibrado estimada y teniendo en cuenta que  $s_{RC}$  vale 5.035, la sensibilidad analítica calculada es  $1.73 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

#### 2.4.2.5. *Resumen de los parámetros analíticos.*

Los parámetros analíticos calculados son resumidos en la tabla III.2.13.

*Tabla III.2.13. Parámetros de calidad del método analítico.*

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
<b>b</b> ( $\text{l}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ )	$2.91 \pm 0.03$	<b>C<sub>L</sub></b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	0.5
<b>a</b> (uf)	$1.82 \pm 0.84$	<b>C<sub>Q</sub></b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	1.7
<b>r<sup>2</sup></b> (%)	99.94	<b>DER</b> (%)	0.92
<b>s<sub>RC</sub></b>	5.035	<b>S<sub>analítica</sub></b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	1.73
<b>RDL</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	10.0-200.0	---	---

## 2.5. Estudio de interferencias.

Se llevó a cabo un estudio de las posibles interferencias debidas a la presencia de distintas especies iónicas.

### 2.5.1. Composición de las aguas objeto de estudio.

En primer lugar, se determinó el contenido iónico de cada una de las muestras objeto de estudio, previamente a la aplicación del método.

#### 2.5.1.1. Agua de pozo

El agua de pozo empleada en este estudio procede de la huerta Santa María, situada en la localidad de Vegas del Genil (Granada). El contenido iónico de este agua es mostrado en la tabla II.2.20.

*Tabla III.2.20. Composición iónica del agua de pozo.*

Especie	mg·l <sup>-1</sup>	Especie	mg·l <sup>-1</sup>	Especie	μg·l <sup>-1</sup>
<b>CO<sub>3</sub><sup>-2</sup></b>	59.6	<b>SiO<sub>3</sub><sup>-2</sup></b>	0.10	<b>Pb<sup>+2</sup></b>	10.0
<b>CO<sub>3</sub>H<sup>-</sup></b>	25.6	<b>Cl<sup>-</sup></b>	---	<b>Cu<sup>+2</sup></b>	20.1
<b>SO<sub>4</sub><sup>-2</sup></b>	69.5	<b>Ca<sup>+2</sup></b>	92.4	<b>Mn<sup>+2</sup></b>	19.5
<b>SO<sub>3</sub><sup>-2</sup></b>	28.3	<b>Mg<sup>+2</sup></b>	42.3	<b>Cr<sup>+3</sup></b>	< 1.00
<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	62.4	<b>Zn<sup>+2</sup></b>	0.10	<b>Fe<sup>+3</sup></b>	90.5
<b>PO<sub>4</sub><sup>-3</sup></b>	12.2	<b>Cd<sup>+2</sup></b>	0.03	<b>Al<sup>+3</sup></b>	18.9

### 2.5.1.2. Agua de río.

Las muestras de agua de río fueron tomadas en el río Manzanil situado en la localidad de Loja (Granada). El contenido iónico de este agua es mostrado en la tabla III.2.21.

*Tabla III.2.21. Composición iónica del agua de río.*

Especie	mg·l <sup>-1</sup>	Especie	mg·l <sup>-1</sup>	Especie	µg·l <sup>-1</sup>
CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	28.1	SiO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	6.30	Pb <sup>+2</sup>	1.1
CO <sub>3</sub> H <sup>-</sup>	85.9	Cl <sup>-</sup>	22.4	Cu <sup>+2</sup>	0.3
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	65.6	Ca <sup>+2</sup>	64.1	Mn <sup>+2</sup>	1.3
SO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	25.3	Mg <sup>+2</sup>	19.4	Cr <sup>+3</sup>	< 1.00
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	32.8	Zn <sup>+2</sup>	0.08	Fe <sup>+3</sup>	0.20
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	0.50	Cd <sup>+2</sup>	0.01	Al <sup>+3</sup>	13.6

### 2.5.1.3. Agua de mar.

Las muestras de agua de mar fueron tomadas en la playa de Poniente, Motril (Granada). La composición iónica de este agua es la mostrada en la tabla III.2.22.

*Tabla III.2.22. Composición iónica del agua de mar.*

Especie	mg·l <sup>-1</sup>	Especie	mg·l <sup>-1</sup>	Especie	µg·l <sup>-1</sup>
CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	9.00	SiO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	20.0	Pb <sup>+2</sup>	0.03
CO <sub>3</sub> H <sup>-</sup>	17.0	Cl <sup>-</sup>	2·10 <sup>4</sup>	Cu <sup>+2</sup>	0.50
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	78.6	Ca <sup>+2</sup>	0.40	Mn <sup>+2</sup>	0.20
SO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	15.3	Mg <sup>+2</sup>	1.30	Cr <sup>+3</sup>	0.30
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.60	Zn <sup>+2</sup>	5.0 µg	Fe <sup>+3</sup>	2.00
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	0.06	Cd <sup>+2</sup>	0.1 µg	Al <sup>+3</sup>	2.00

### 2.5.2. Estudio de interferentes.

Para abordar este estudio, se tuvo en cuenta tanto la naturaleza como la concentración aproximada de las especies existentes en las diferentes matrices a las que se

aplicó el método analítico y que pueden ejercer influencia sobre la señal de fluorescencia. Considerando que nuestro objetivo es la determinación de bisfenol A en agua de diferente procedencia (pozo, mar y río), se seleccionaron una serie de especies presentes habitualmente tanto a nivel mayoritario como minoritario en este tipo de matrices. Las especies seleccionadas fueron:  $CO_3^{-2}$ ,  $CO_3H$ ,  $SO_4^{-2}$ ,  $SO_3^{-2}$ ,  $NO_3^-$ ,  $PO_4^{-3}$ ,  $SiO_3^{-2}$ ,  $Cl^-$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Al^{+3}$ ,  $Fe^{+3}$  y  $Cr^{+3}$ .

Para obtener las disoluciones de cada una de estas especies se partió de la sal correspondiente y se preparó una disolución acuosa de  $1.0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$  del ion a ensayar.

El procedimiento experimental seguido es el mostrado a continuación. En una serie de matraces aforados de 10 ml de capacidad, se introdujeron 0.5 ml de disolución acuosa de bisfenol A de concentración  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , se adicionó 1.0 ml de disolución acuosa de  $\beta$ -ciclodextrina de concentración  $10^{-3} \text{ M}$ , y concentraciones crecientes de la sal que contenía al posible interferente. Por último, se enrasó con agua desionizada y se midió la señal fluorescente emitida por la disolución fijando las condiciones instrumentales habituales, es decir  $\lambda_{\text{exc}} = 225 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 306 \text{ nm}$ , rendijas de excitación y emisión 5 y 10 nm respectivamente, velocidad de barrido  $240 \text{ nm}/\text{minuto}$  y temperatura  $20.0 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ .

A partir de la medida de la intensidad de fluorescencia de cada disolución y con la ayuda de la función de calibrado se determinó en cada caso el error relativo que originaba la presencia del interferente. Se fijó como límite de tolerancia la concentración de ésta que producía un error relativo del 5%. No se consideró como tal interferencia aquella concentración que producía un error inferior al indicado. Este valor, al ser suficientemente mayor que el error inherente a nuestro método analítico, nos asegura que la desviación observada en la medida de la intensidad de fluorescencia en cada caso es debida a la presencia del ion y no al propio método.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas III.2.14 a 19 y se representan en las figuras anexas.

Tabla III.2.14. Interferencia debida a  $CO_3^{2-}$ ,  $CO_3H^-$ ,  $SO_3^{2-}$  y  $SO_4^{2-}$

$C_I$ (mg·l <sup>-1</sup> )	Log C/C <sub>BFA</sub>	$\epsilon$ (%)			
		$CO_3^{2-}$	$CO_3H^-$	$SO_4^{2-}$	$SO_3^{2-}$
1.0	1.30	0.15	-0.56	-0.80	1.81
10.0	2.30	0.51	-1,28	-0.59	-2.60
50.0	3.00	7.60	-1,31	0.26	2.02
100.0	3.30	9.20	-3,71	1.59	2.96

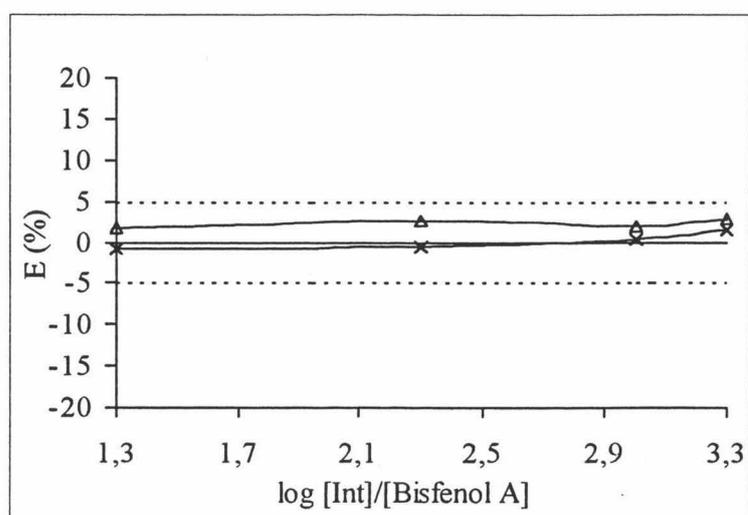
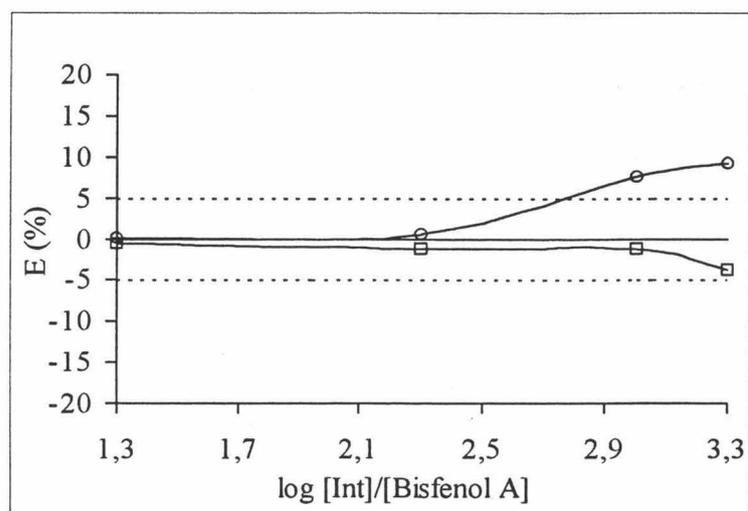


Figura III.2.11. Interferencia debida a los aniones  $CO_3^{2-}$  (○),  $CO_3H^-$  (□),  $SO_4^{2-}$  (x) y  $SO_3^{2-}$  (Δ).

Tabla III.2.15. Interferencia debida a  $PO_4^{-3}$ ,  $SiO_3^{-2}$ ,  $Cl^-$  y  $NO_3^-$ .

$C_I$ (mg·l <sup>-1</sup> )	Log C/C <sub>BFA</sub>	$\epsilon$ (%)			
		$PO_4^{-3}$	$SiO_3^{-2}$	$Cl^-$	$NO_3^-$
0.5	1.00	--	--	--	0.28
1.0	1.30	-0.30	2.96	--	2.10
5.0	2.00	--	--	0.01	12.01
10.0	2.30	3.20	3.10	0.04	14.35
50.0	3.00	7.30	2.66	-1.09	--
100.0	3.30	10.0	2.30	0.28	--

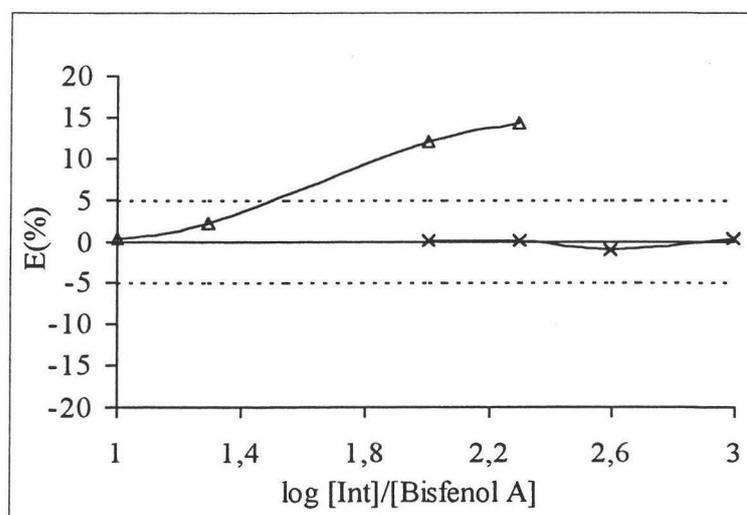
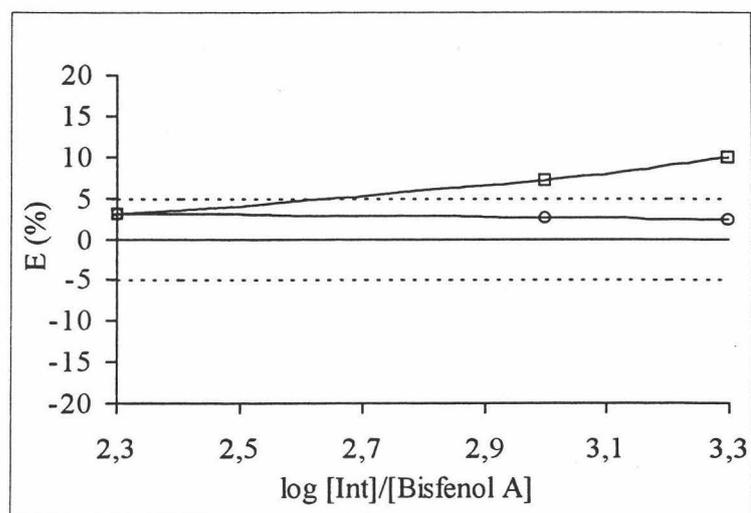


Figura III.2.12. Interferencia debida a los aniones  $SiO_3^{-2}$  (o),  $PO_4^{-3}$  (□),  $Cl^-$  (x) y  $NO_3^-$  (Δ).

Tabla III.2.16. Interferencia debida a  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  y  $Zn^{+2}$ .

$C_I$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Log C/ $C_{\text{BFA}}$	$\epsilon$ (%)				
		$Pb^{2+}$	$Cu^{+2}$	$Mn^{+2}$	$Cd^{+2}$	$Zn^{+2}$
10.0	-0.70	---	2.37	-1.89	---	---
50.0	0.00	0.33	0.14	-0.81	-1.91	-2.12
100.0	0.30	1.09	3.21	-0.26	-3.56	-3.87
150.0	0.48	1.67	3.62	-0.16	-3.60	-3.77
200.0	0.60	2.87	3.45	---	-2.79	-3.82

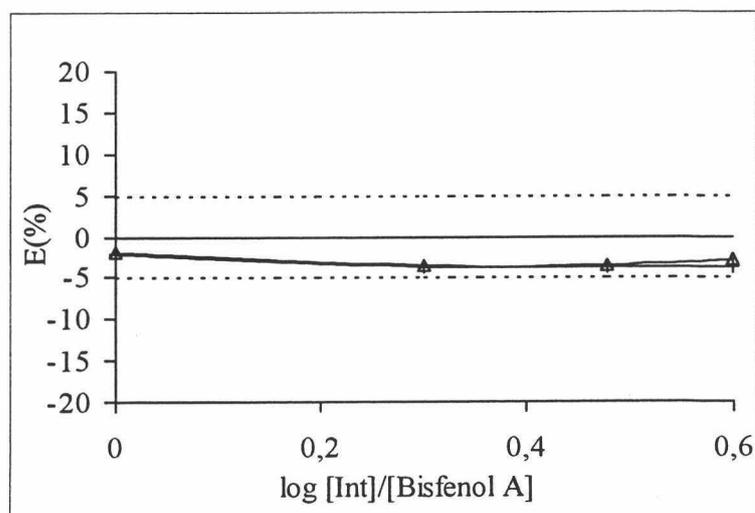
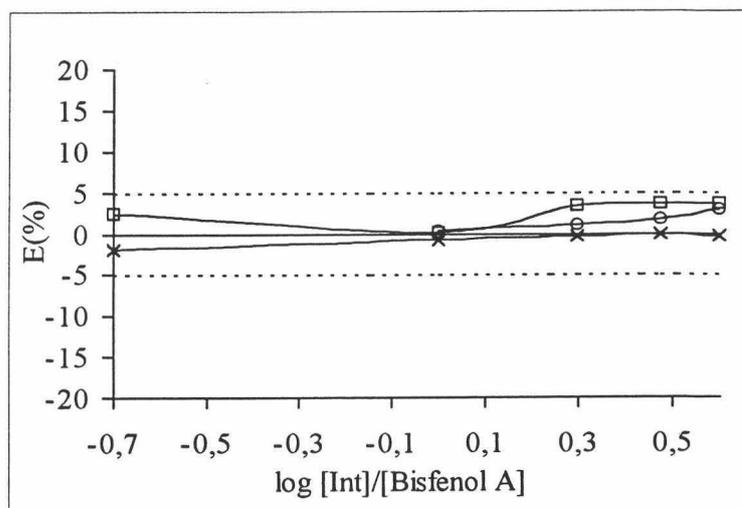


Figura III.2.13. Interferencia debida a los cationes  $Pb^{+2}$  (o),  $Cu^{+2}$  (□),  $Mn^{+2}$  (x),  $Cd^{+2}$  (Δ) y  $Zn^{+2}$  (+)

Tabla III.2.17. Interferencia debida a  $Al^{3+}$ ,  $Cr^{+3}$  y  $Fe^{+3}$

$C_I$ ( $\mu g \cdot l^{-1}$ )	Log C/ $C_{BFA}$	$\epsilon$ (%)		
		$Al^{+3}$ I	$Cr^{+3}$	$Fe^{+3}$
50.0	0.00	0.09	-0.41	2.15
100.0	0.30	-0.03	-2.37	2.10
150.0	0.48	---	-2.16	2.58
200.0	0.60	---	-2.79	2.76
300.0	0.78	0.09	---	---

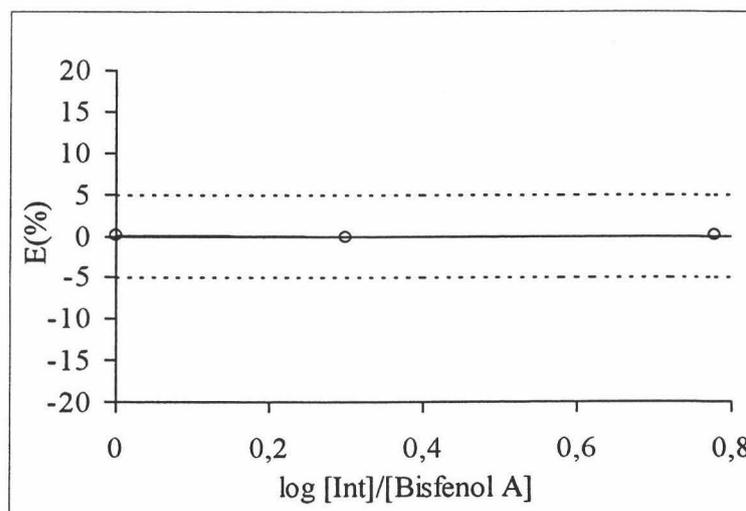
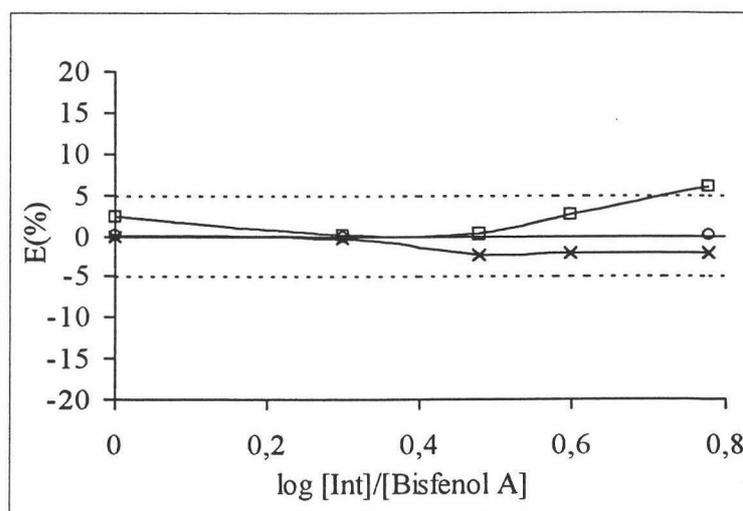


Figura III.2.14. Interferencia debida a los cationes  $Al^{+3}$  I (o),  $Al^{+3}$  II (□),  $Al^{+3}$  III (x),  $Cr^{+3}$  (Δ) e  $Fe^{+3}$  (+)

Tabla III.2.18. Interferencia debida a  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ .

$C_I$ ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Log C/ $C_{\text{BFA}}$	$\epsilon$ (%)	
		$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Mg}^{2+}$
10.0	2.30	1.48	2.28
50.0	3.00	-1.69	2.64
100.0	3.30	-2.74	1.72

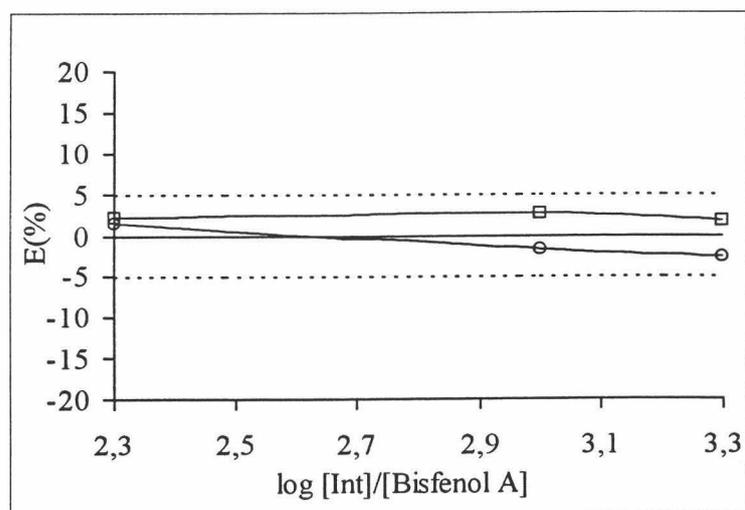


Figura III.2.15. Interferencia debida a los cationes  $\text{Ca}^{+2}$  (o) y  $\text{Mg}^{+2}$  (□)

Tabla III.2.19. Tolerancia para las especies ensayadas como posibles interferentes

Especie	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	Especie	$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$	Especie	$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Especie	$\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
$\text{CO}_3^{-2}$	35	$\text{PO}_4^{-3}$	20	$\text{Pb}^{+2}$	>200	$\text{Al}^{+3}$	250
$\text{CO}_3\text{H}^-$	>100	$\text{SiO}_3^{-2}$	>100	$\text{Cu}^{+2}$	>100	$\text{Fe}^{+3}$	>100
$\text{SO}_4^{-2}$	>70	$\text{Cl}^-$	>50	$\text{Cd}^{+2}$	>200	$\text{Cr}^{+3}$	>200
$\text{SO}_3^{-2}$	>70	$\text{Ca}^{+2}$	>100	$\text{Zn}^{+2}$	>200	---	---
$\text{NO}_3^-$	1.5	$\text{Mg}^{+2}$	>100	$\text{Mn}^{+2}$	>200	---	---

Según los datos mostrados en la anterior tabla podemos establecer que:

*No interfieren* a concentraciones suficientemente altas las especies aniónicas:  $CO_3^{2-}$ ,  $CO_3H$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $SO_3^{2-}$ ,  $SiO_3^{2-}$ ,  $Cl^-$ ; ni las especies catiónicas:  $Pb^{+2}$ ,  $Cr^{+3}$ ,  $Fe^{+3}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  y  $Cd^{+2}$ .

Destaca la *moderada tolerancia* mostrada para la especie  $PO_4^{3-}$  y la *baja tolerancia* para  $NO_3^-$ , pues su concentración en agua natural suele superar estos valores. Ambas son especies aniónicas, no habiéndose encontrado comportamientos análogos entre las especies catiónicas. Se hizo por tanto necesaria la eliminación de dicho ion de la muestra.

### 2.5.3. Eliminación de los nitratos presentes en la muestra.

La eliminación de esta especie interferente se llevó a cabo mediante el empleo de una resina de cambio aniónico en ciclo- $Cl^-$ , Sephadex QAE-A 25. Esta resina retiene los aniones que acompañan al compuesto en la muestra a analizar, introduciendo en su lugar iones  $Cl^-$ , inertes para nuestro sistema, según se comprobó en el estudio de interferencias.

Experimentalmente, se optimizaron dos variables:

#### 2.5.3.1. Cantidad de resina.

Para determinar la cantidad adecuada de resina a introducir en la columna, parámetro condicionado por la capacidad de cambio de la misma, se diseñó la siguiente experiencia: Se prepararon tres series con 4 disoluciones de bisfenol A cada una de ellas en matraces aforados de 50 ml que contenían todas ellas  $55 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de bisfenol, se enrasaron hasta el volumen final con agua de pozo, río y mar y se pasaron por columnas que contenían desde 0.1 g a 0.5 g de resina QAE SEPHADEX A-25. A continuación, en matraces aforados de 10 ml de capacidad se tomaron 9 ml de muestra, correspondientes a las últimas fracciones recogidas en cada caso a la salida de la columna y finalmente, tras añadir 1 ml de disolución acuosa de  $\beta$ -ciclodextrina de concentración  $10^{-3}$  M, se registraron

los espectros de emisión fluorescente fijando las variables experimentales e instrumentales habituales. Los resultados obtenidos son mostrados en la tabla III.2.23.

*Tabla III.2.23. Influencia de la cantidad de resina QAE-Sephadex*

Cantidad (g)	IF		
	Pozo	Río	Mar
0*	199.79	199.79	199.79
0.10	94.35	107.29	99.86
0.20	150.23	147.07	160.22
0.30	192.25	194.28	200.81
0.40	194.98	195.30	201.02
0.50	195.31	195.39	201.98

\* *Disolución de referencia*

Se observa que 0.3 g de resina aniónica son suficientes para obtener una recuperación de señal cercana al 100 % respecto a la disolución de referencia preparada en agua desionizada, cuando se emplea un volumen de muestra de 50 ml de estos tres tipos de agua.

#### 2.5.3.2. *Fracción de muestra tomada para las medidas de fluorescencia.*

Estudios previos, mostraron que la señal de emisión obtenida para las primeras fracciones de muestra recogida al pasar a través de la resina de cambio iónico era menor que la mostrada por las última. Para optimizar la fracción de disolución tomada para las medidas de fluorescencia, se diseñó la siguiente experiencia: En un matraz aforado de 50 ml de capacidad se preparó una disolución que contenía  $55 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de bisfenol A, se pasó a través de la resina y se recogieron fracciones de 9 ml en matraces aforados de 10 ml de capacidad. A estos últimos se les añadió 1 ml de  $\beta\text{-CD} \times 10^{-3} \text{ M}$  y se registraron los correspondientes espectros de emisión fijando las condiciones instrumentales y experimentales habituales. Los resultados obtenidos son mostrados en la tabla III.2.24.

*Tabla III.2.24. Fracción de disolución empleada tras pasar por resina.*

Fracción	V(ml)	IF	Fracción	V(ml)	IF
0*	---	208.56	3 <sup>a</sup>	18 a 27	213.20
1 <sup>a</sup>	0 a 9	161.66	4 <sup>a</sup>	27 a 36	210.39
2 <sup>a</sup>	9 a 18	202.86	5 <sup>a</sup>	36 a 45	215.28

\* Disolución de referencia

Se concluye por tanto que la fracción a emplear para la realización de las medidas de fluorescencia es la tercera, ya que en esta fracción la señal alcanza un valor cercano al de la disolución de referencia, permaneciendo estable para fracciones posteriores.

## 2.6. Aplicaciones y validación del método.

El método analítico propuesto para la determinación de bisfenol A por espectrofluorimetría mediante formación de complejos de inclusión, se aplicó a muestras de agua de pozo, mar y río. En todos los casos la metodología empleada fue el calibrado por adición de patrón y estudio de recuperación.

### 2.6.1. Calibrados con adición de patrón

Como método analítico de trabajo se ha empleado el de la función de calibrado con adición de patrón. Para llevar a cabo este calibrado, en matraces aforados de 50 ml de capacidad se prepararon tres series de disoluciones de concentración creciente de bisfenol A en agua objeto de estudio, y se pasaron a través de 0.3 gramos de resina aniónica QAE-SEPHADEX A-25, recogándose en todos los casos los 9 ml correspondientes a la tercera fracción. A continuación, dicha fracción se introdujo en matraces aforados de 10 ml de capacidad y se añadió 1 ml de disolución acuosa de  $\beta$ -ciclodextrina de concentración  $10^{-3}$  M, de forma que las concentraciones finales de bisfenol A fueron 0.0, 10.0, 40.0, 80.0 y 120.0  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Finalmente, se midió la señal emitida a  $\lambda_{\text{exc}}=225$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=306$  nm, rendijas de excitación y emisión 5 y 10 nm respectivamente, velocidad de barrido 240 nm/minuto y temperatura  $20.0\pm 0.5$  °C.

Con ayuda del programas informático *STATGRAPHICS*<sup>22</sup>, se realizó el ajuste por mínimos cuadrados a los datos obtenidos y se calcularon los siguientes parámetros estadísticos: ordenada en el origen ( $a$ ), pendiente ( $b$ ) desviación estándar de ambos parámetros ( $s_a$  y  $s_b$ ), desviación estándar del calibrado ( $s_{RC}$ ), y coeficiente de determinación ( $r^2$ ). En todos los casos los datos experimentales se ajustan al modelo lineal. Los parámetros del calibrado aparecen en la tabla III.2.25.

**Tabla III.2.25. Parámetros de los calibrados con adición de patrón.**

Parámetro	Pozo	Mar	Río
<b>n</b>	5	5	5
<b>b (l·μg<sup>-1</sup>)</b>	2.90±0.60	2.83±0.14	2.92±0.16
<b>s<sub>b</sub> (l·μg<sup>-1</sup>)</b>	0.020	0.045	0.049
<b>a (UF)</b>	43.2±4.1	39.3±9.5	45.4±10.6
<b>s<sub>a</sub> (UF)</b>	1,27	3.001	3.301
<b>s<sub>RC</sub></b>	1,895	4.474	4.919
<b>r<sup>2</sup> (%)</b>	99.98	99.92	99.91

Para comprobar la exactitud del método analítico se llevó a cabo un estudio de comparación de las dos rectas de regresión obtenidas mediante el calibrado con patrones y con adición de patrón siguiendo la metodología ya desarrollada en el capítulo II.

### 2.6.2. Comparación de los calibrados con patrones y adición de patrón.

En primer lugar se realizó el test de comparación de varianzas de ambos calibrados. Las conclusiones obtenidas son mostradas en la tabla III.2.26.

**Tabla III.2.26. Comparación de varianzas.**

Muestra	F <sub>cal</sub>	F <sub>tab</sub>	Conclusión
<b>Pozo</b>	7.06	8.66	H <sub>0</sub>
<b>Mar</b>	1.26	8.66	H <sub>0</sub>
<b>Río</b>	1.04	8.66	H <sub>0</sub>

<sup>22</sup> Statgraphics versión 3.1 para Windows. *Statistical Graphics Corporation, USA (1997).*

En todos los casos se concluye por la hipótesis nula, es decir, no existe diferencia significativa entre las varianzas de ambos calibrados.

Una vez comparadas las varianzas se aplicó el test de *t-student* correspondiente al supuesto de que no existe diferencia significativa entre las varianzas de ambos calibrados, para la comparación de las pendientes y ordenadas en el origen. Los valores de *t* calculados se comparan con el valor de *t* tabulado con un nivel de significación del 5% y 23 grados de libertad para las ordenadas y 22 para las pendientes. Las conclusiones obtenidas son mostradas en la tabla III.2.27.

*Tabla III.2.27. Comparación de pendientes y ordenadas en el origen.*

Muestra	Pendiente			Ordenada en el origen		
	$t_{cal}$	$t_{tab}$	Conclusión	$t_{cal}$	$t_{tab}$	Conclusión
Pozo	0.046	2.074	$H_0$	0.157	2.069	$H_0$
Mar	0.309	2.074	$H_0$	1.380	2.069	$H_0$
Río	0.038	2.074	$H_0$	1.000	2.069	$H_0$

En los tres casos se concluye por la hipótesis nula, es decir, no existen diferencias significativas entre las pendientes y las ordenadas en el origen de ambas rectas de calibrado, ya que en todos los casos se cumple que  $t_{cal} < t_{tab}$  para el nivel de significación del 5%. Por tanto, se puede concluir que las rectas de calibrado con patrones y adición de patón son iguales en todos los tres casos considerados y consecuentemente el método propuesto conduce a resultados exactos.

### 2.6.3. Estudio de recuperación.

Por último, se llevó a cabo un estudio de recuperación en muestras de agua a las que se adicionó una cierta cantidad de bisfenol A.

En matraces aforados de 50 ml de capacidad se tomaron muestras de los distintos tipos de agua sembradas con concentraciones de 40, 80 y 120  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  respectivamente; se

pasaron a través de la resina de cambio iónico, desechándose los primeros 18 ml. A continuación, en matraces aforados de 10 ml de capacidad, se introdujeron 9.0 ml de muestra y 1 ml de  $\beta$ -ciclodextrina de concentración  $10^{-3}$  M, se midió la emisión fluorescente de las disoluciones fijando las condiciones experimentales e instrumentales habituales y finalmente, se determinó la concentración de analito presente en cada muestra por interpolación en los correspondientes calibrados. A continuación se compararon los resultados obtenidos con la cantidad real adicionada a la muestra, expresando el resultado como porcentaje de recuperación.

Los resultados se recogen en la tabla III.2.28 donde se muestran los porcentajes de recuperación respecto a la cantidad inicialmente añadida a la muestra.

*Tabla III.2.28. Estudio de recuperación.*

Muestra	[bisfenol A] $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	% Rec (CP) *
<b>Pozo</b>	40	101.1
	80	97.9
	120	95.0
<b>Río</b>	40	105.0
	80	102.0
	120	99.5
<b>Mar</b>	40	96.0
	80	97.9
	120	95.0

\* Promedio de tres determinaciones.

Se observa que el error cometido en las determinaciones no supera en ningún caso el 5%, por tanto se puede afirmar que el método analítico propuesto para la determinación de bisfenol A en aguas naturales basado en la formación de un complejo de inclusión con  $\beta$ -ciclodextrina es exacto.

### **3. DETERMINACIÓN DE BISFENOL A EN PRESENCIA DE FENOL MEDIANTE ESPECTROFLUORIMETRIA DERIVADA PREVIA MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO.**

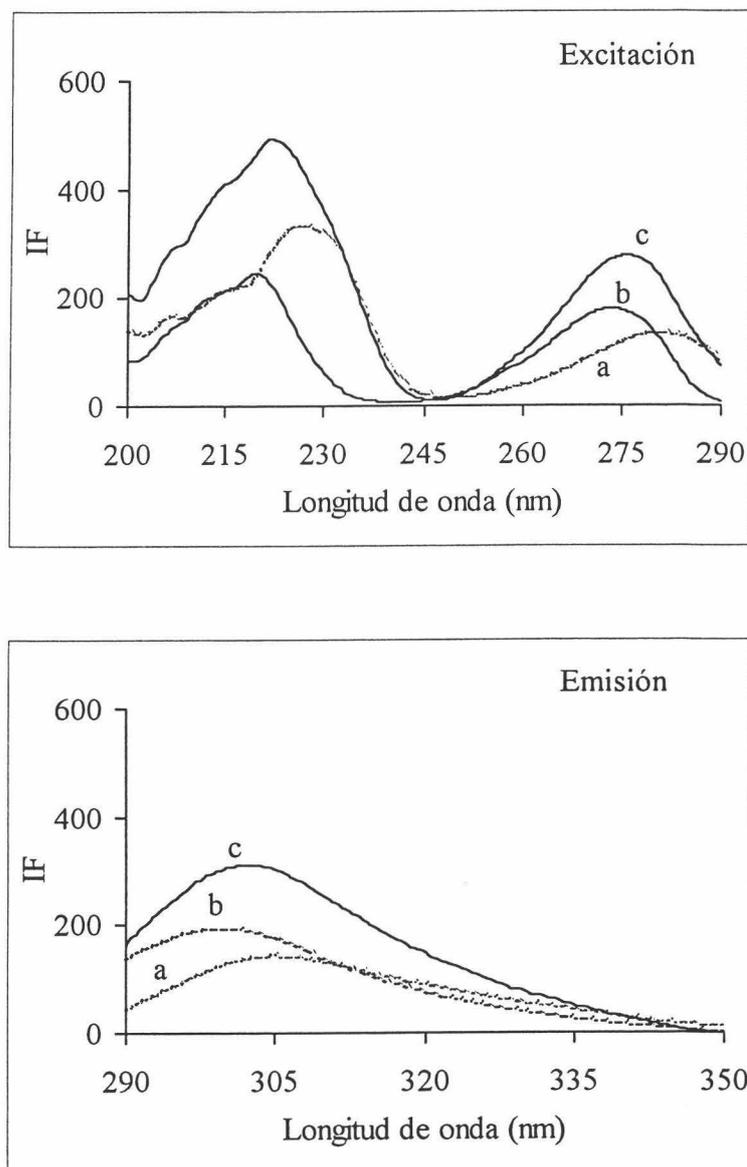
En este apartado nos proponemos desarrollar un nuevo método para la determinación de trazas de bisfenol A en muestras de agua de diferente procedencia en las que también está presente el fenol, utilizando la espectrofluorimetría derivada para evitar su interferencia. Para ello vamos a llevar a cabo previamente una microextracción líquido-líquido de las muestras acuosas, basándonos en el alto rendimiento de fluorescencia que presenta el bisfenol A en éter etílico, como se recoge en la introducción de este capítulo.

#### **3.1. Comportamiento fluorescente de bisfenol A y fenol en éter etílico. Establecimiento de los parámetros instrumentales.**

Se abordó en primer lugar la caracterización del comportamiento fluorescente tanto del analito de interés como del fenol en éter etílico, con el fin de seleccionar unas condiciones instrumentales que nos permitieran la determinación de bisfenol A anulando, o al menos minimizando, la interferencia debida a la presencia de fenol.

##### ***3.1.1. Espectros fluorescentes de bisfenol A y fenol en éter etílico.***

Para registrar los espectros de fluorescencia de ambos compuestos, en tres matraces aforados de 10 ml de capacidad se prepararon disoluciones de bisfenol A y fenol de 1.0 y 1.5 mg·l<sup>-1</sup> de concentración respectivamente y una mezcla de ambos de igual concentración. A continuación se registraron los espectros de excitación y emisión en los rangos comprendidos entre 200 y 290 nm y 290 a 350 nm respectivamente, fijando como longitudes de onda de excitación 278 nm y de emisión 305 nm para bisfenol A, fenol y mezcla de ambos. Se emplearon rendijas de excitación y emisión de 5 nm, velocidad de barrido 240 nm/min y temperatura 10.0±0.5°C. En la figura III.3.1 se muestran los espectros correspondientes a ambos compuestos, así como el de la mezcla



**Figura III.3.1** Espectros de excitación y emisión de bisfenol A (a), fenol(b) y mezcla de ambos (c) en éter etílico.

Se observa que el bisfenol A presenta dos máximos de excitación localizados a 225 nm y 278 nm respectivamente y un máximo de emisión a 305 nm. Así mismo el fenol presenta otros dos máximos de excitación a 219 y 273 nm respectivamente y un sólo máximo de emisión a 302 nm.

Debido al gran solapamiento existente tanto en excitación como en emisión, la determinación mediante medidas directas de fluorescencia de bisfenol A en presencia de fenol fue imposible. Para soslayar este problema se planteó el empleo de espectros derivados que permitieran seleccionar una longitud de onda a la cual la señal medida fuera debida únicamente a la presencia de bisfenol A

### 3.1.2. *Establecimiento de las longitudes de onda analíticas.*

Los antecedentes bibliográficos nos indican que el empleo de derivadas permite en ocasiones la determinación de un compuesto en presencia de una o varias sustancias cuyos espectros de fluorescencia están fuertemente solapados<sup>23</sup>. Para la resolución de este tipo de problemas se calcula la primera, segunda o derivadas de orden superior de la señal luminiscente, respecto a la longitud de onda. Un espectro derivado se obtiene calculando, en el intervalo de longitudes de onda seleccionado, el cociente diferencial  $dA/d\lambda$  para la primera derivada,  $d^2A/d^2\lambda$  para la segunda y así sucesivamente. En la presente Memoria se ha hecho uso sólo de espectros derivados de primer orden, ya que órdenes de derivada superiores producen una disminución en la sensibilidad del método.

La técnica seguida para la selección de las longitudes de onda analíticas fue el algoritmo propuesto por Savitzky y Golay<sup>24</sup>. Este consiste en localizar aquellas longitudes de onda del espectro derivado en los cuales la señal medida depende únicamente de la concentración del compuesto a determinar –técnica de zero crossing-. Mediante esta técnica, se eligen las longitudes de onda adecuadas para poder realizar medidas proporcionales a la concentración de bisfenol A y poder así establecer las correspondientes rectas de calibrado. Consiste en medir el valor absoluto del espectro derivado total a un valor de longitud de onda correspondiente al punto de corte con el eje de abscisas del espectro del componente que interfiere<sup>25</sup>, fenol en este caso.

<sup>23</sup>O'haver R.C. *Clinical Chemistry*, **25**, 1548 (1979).

<sup>24</sup>A. Savitzky and M.J.E. Golay, *Analytical Chemistry*, **36** 1627(1964).

<sup>25</sup>Morelli B. *Analyst*, **113**, 1077 (1988)

Asumiendo que la derivada de un espectro es equivalente a la suma de las derivadas de los espectros individuales, cuando la magnitud de la derivada del espectro del fenol es cero, la contribución de éste es nula y consecuentemente, el bisfenol A puede medirse libre de la interferencia del fenol.

Por otro lado, es importante seleccionar correctamente el factor de filtrado en la obtención de los espectros derivados. Matemáticamente, puede demostrarse que la relación entre la señal analítica y el ruido, se hace más pequeña a medida que aumenta el orden de derivación<sup>26</sup>. Por ello, para usar como técnica de trabajo la derivación, es necesario llevar a cabo un filtrado de la señal para controlar el incremento en el ruido que es un resultado inevitable de la derivación de un espectro. El filtrado es un factor muy importante en fluorimetría derivada, pues el incremento en el ruido causado por el proceso de diferenciación es fundamentalmente debido a un incremento en el ruido de “alta frecuencia”. Así, este ruido es especialmente fácil de reducir mediante un proceso de filtrado de “baja frecuencia”.

En el proceso de filtrado se hace una convolución de la serie de datos con una función de filtrado consistente en una serie de coeficientes “proporcionales”. Cada punto de la serie de datos filtrados es una combinación lineal de un grupo de puntos adyacentes de la serie de datos sin filtrar, multiplicando cada uno por un coeficiente proporcional.

En esta Memoria, para la obtención tanto del espectro derivado como para el posterior suavizado del mismo, se empleó el programa FL Data Manager suministrado por la casa Perkin Elmer para controlar el espectrofluorímetro LS-50. Este programa aplica el método de filtrado y diferenciación de datos basado en el procedimiento de mínimos cuadrados simplificado de Savitzky-Golay<sup>27,28</sup>.

---

<sup>26</sup>Fell A.F. and Smith G. *Analytical Procedures*, **19**, 42 (1982).

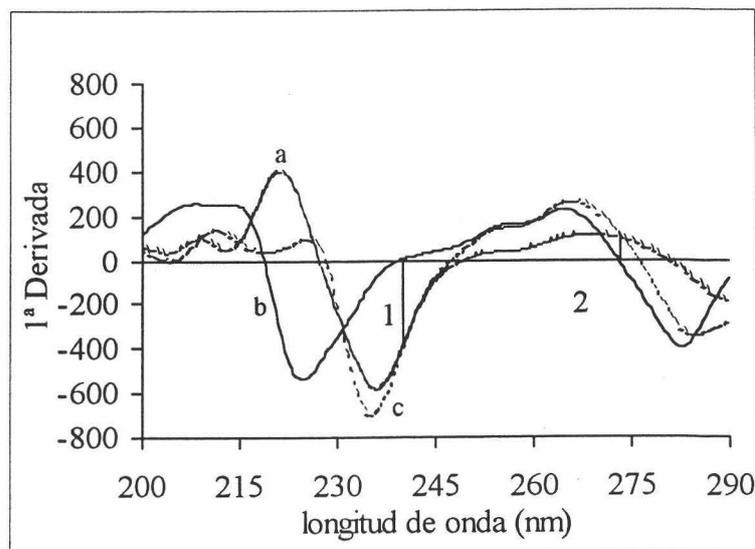
<sup>27</sup>Bialkowski S.E. *Analytical Chemistry*, **61**, 1808 (1989).

<sup>28</sup>Gorry P.A. *Analytical Chemistry*, **62**, 570 (1990).

Se pueden emplear factores comprendidos entre 5 y 149 puntos, que ajustan cada punto a un polinomio cuadrático o cúbico a través de sucesivas ventanas de datos que se utilizan para determinar el mejor punto central.

A medida que se aumenta el factor de filtrado, el proceso de filtración es más efectivo, pero se pierde resolución. El factor de filtrado utilizado en esta Memoria fue de 12 puntos.

Finalmente se seleccionaron las longitudes de onda de medida. En el caso del espectro de emisión, al obtener la derivada de primer orden no se observó ninguna longitud de onda a la cual la señal dependiese únicamente de la concentración de bisfenol A y fuese independiente de la de fenol. Sin embargo, cuando se obtuvo la primera derivada del espectro de excitación se encontraron dos longitudes de onda que permitían la medida de la señal correspondiente únicamente a bisfenol A, sin contribución alguna por parte del fenol. En la figura III.3.2 se muestran los espectros de excitación en primera derivada de fenol y bisfenol A, así como el correspondiente a la mezcla de ambos compuestos.



**Figura III.3.2.** Espectros de excitación derivados de bisfenol A (a), fenol (b) y mezcla de ambos (c) en éter etílico.

En la figura se han señalado los valores de longitud de onda seleccionados según la técnica de “zero crossing”. Estos dos valores son 239 nm y 273 nm respectivamente.

Como longitud de onda de medida fue seleccionada la primera, ya que la sensibilidad que presentaba era mayor.

### 3.1.3. Rendijas de excitación y emisión.

Para optimizar los valores correspondientes a las rendijas de excitación y emisión, en un matraz aforado de 10 ml de capacidad se preparó una disolución de bisfenol A de  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  en éter etílico y se registró el espectro de excitación fluorescente fijando las condiciones instrumentales mostradas en la experiencia anterior y variando la anchura de las rendijas de excitación y emisión. En la tabla III.3.1 se muestran los resultados obtenidos para los distintos valores de rendijas ensayadas.

*Tabla III.3.1. Influencia del tamaño de rendija.*

<b>Rendija (exc/em)</b>	<b>IF</b>	<b>Rendija (exc/em)</b>	<b>IF</b>
2.5/2.5	225.61	10.0/2.5	198.56
2.5/5.0	700.26	10.0/5.0	590.09
2.5/10.0	Sat	10.0/10.0	Sat
2.5/15.0	Sat	10.0/15.0	Sat
5.0/2.5	125.69	15.0/2.5	98.35
5.0/5.0	490.25	15.0/5.0	280.36
5.0/10.0	Sat	15.0/10.0	Sat
5.0/15.0	Sat	15.0/15.0	Sat

Se seleccionaron rendijas de 5 nm para excitación y emisión respectivamente, ya que el uso de otras rendijas de emisión mayores o de excitación menores supondría un acortamiento en el posterior establecimiento del rango dinámico lineal.

### 3.2. Optimización de variables experimentales.

En este apartado se estudian las principales variables experimentales que afectan a la extracción del bisfenol A con éter etílico a partir de muestras acuosas.

### 3.2.1. *Influencia del volumen de disolvente.*

Se optimizó el volumen de disolvente orgánico, necesario para llevar a cabo la microextracción líquido-líquido en función del volumen de muestra acuosa utilizada.

La relativamente alta solubilidad del éter etílico, disolvente seleccionado para realizar la microextracción y medida de la intensidad de fluorescencia del bisfenol A, en agua nos indujo a emplear una fuerza iónica elevada con objeto de recuperar el volumen necesario de disolvente orgánico que permitiera realizar las medidas de fluorescencia, empleando en la extracción el mínimo volumen de éter etílico. Además, el empleo de concentraciones salinas elevadas produce un efecto de “salting out” en la extracción del compuesto, ya que el equilibrio que se establece entre la concentración de éste en ambas fases se desplaza hacia la fase orgánica, obteniéndose un mayor rendimiento en la extracción. En esta memoria se ha antepuesto la importancia de utilizar pequeños volúmenes de fase orgánica a este segundo aspecto.

Por otra parte, una de las ventajas más destacadas que presenta la microextracción líquido-líquido consiste en que una adecuada elección del volumen de muestra acuosa a tratar permite incrementar notablemente la sensibilidad del análisis. En esta experiencia, se estudió la relación entre los volúmenes de fase orgánica y acuosa adecuada para recuperar el volumen mínimo de la primera necesario para la realización de las medidas de fluorescencia y obtener una sensibilidad máxima posible.

Para llevar a cabo el estudio, se prepararon tres series de matraces aforados de 100, 250 y 500 ml de capacidad respectivamente que contenían todos ellos agua desionizada. A continuación se transvasaron a los embudos de decantación adecuados y se adicionaron 30, 75 y 150 g de cloruro sódico respectivamente, cantidades cercanas a la saturación (33.5 g/100 ml a 25 °C) y fáciles de disolver. Se extrajeron con volúmenes crecientes de éter etílico midiéndose el volumen de fase orgánica recuperado en cada caso. En la tabla III.3.2 se muestran los resultados obtenidos en función del volumen de disolvente inicialmente adicionado.

*Tabla III.3.2. Relación fase acuosa/fase orgánica.*

$V_{\text{adicionado}}(\text{ml})$	$V_{\text{recuperado}}$		
	100 ml	250 ml	500 ml
0.5	0.0 $\mu\text{l}$	0.0 $\mu\text{l}$	0.0 $\mu\text{l}$
1.0	50 $\mu\text{l}$	0.0 $\mu\text{l}$	0.0 $\mu\text{l}$
1.5	410 $\mu\text{l}$	0.0 $\mu\text{l}$	0.0 $\mu\text{l}$
2.0	900 $\mu\text{l}$	120 $\mu\text{l}$	0.0 $\mu\text{l}$
2.5	1.4 ml	430 $\mu\text{l}$	0.0 $\mu\text{l}$
3.0	2.0 ml	1.0 ml	20.0 $\mu\text{l}$
4.0	2.9 ml	2.3 ml	160 $\mu\text{l}$
5.0	3.8 ml	3.2 ml	400 $\mu\text{l}$
6.0	5.0 ml	4.1 ml	1.8 ml

Considerando que la cubeta utilizada en el desarrollo de este método presenta un volumen de 400  $\mu\text{l}$ , se observa que el volumen de disolvente orgánico a adicionar para recoger la cantidad necesaria que permita realizar las medidas de fluorescencia es 1.5 ml para 100 ml, 2.5 ml para 250 ml y 5.0 ml para 500 ml de disolución acuosa respectivamente. Por tanto, al aumentar el volumen de fase acuosa a extraer, el volumen de agente extractante necesario también aumenta, pero en menor proporción, lo cual permite aumentar notablemente la sensibilidad del método como se verá a posteriori.

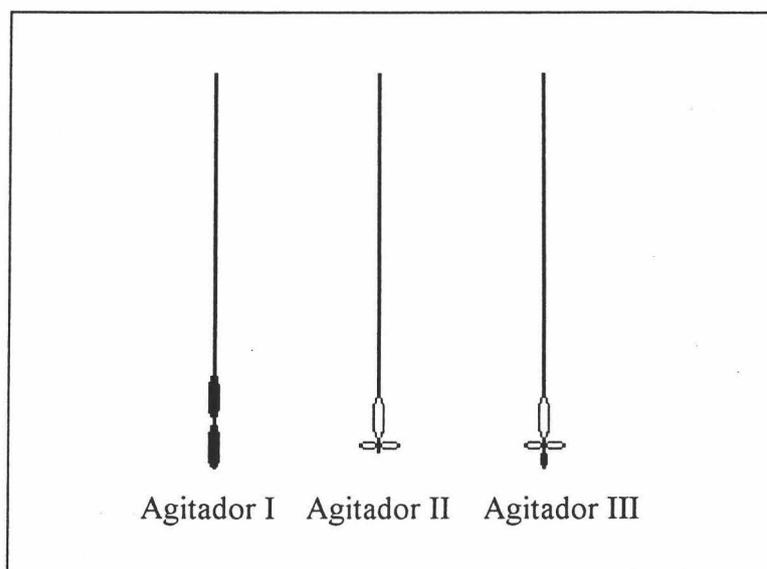
### 3.2.2. Estudio de la agitación del sistema.

Experiencias previas pusieron de manifiesto la falta de reproducibilidad en las medidas de fluorescencia realizadas en fase orgánica, tras la aplicación del proceso de microextracción a las muestras acuosas. Este hecho, descrito por diversos autores<sup>14,15</sup> y que probablemente ha limitado el uso de la microextracción en la etapa de tratamiento de la muestra, puede ser atribuido al proceso de extracción manual de las muestras acuosas, dado el pequeño volumen de disolvente orgánico implicado en el proceso.

Con objeto de mejorar las características del método, se realizó un estudio sistemático de las principales variables que afectan al proceso de extracción. Considerando en primer lugar la agitación mecánica del sistema se optimizó además el tipo de agitador, tiempo de agitación y velocidad de agitación. Dicha optimización se realizó para los tres volúmenes de muestra ya indicados: 100 ml, 250 ml y 500 ml.

### 3.2.2.1. Tipo de agitador.

Se ha estudiado la influencia que la geometría de la varilla de vidrio empleada en el agitador mecánico, tiene sobre el proceso de extracción, comparándose con la agitación manual. Para ello se emplearon tres tipos de agitadores de vidrio diseñados en el laboratorio y que se muestran en la figura III.3.3.



*Figura III.3.3. Tipos de agitadores diseñados.*

El agitador I consta de una varilla de vidrio finalizada en dos ensanchamientos planos de vidrio de tamaño adecuado para poder ser introducidos en los distintos embudos de decantación. El agitador II consta de una varilla de vidrio finalizada en tres aros, uno de los cuales (el superior) es fijo y dos de ellos móviles, estos últimos por efecto de la fuerza centrípeta al girar a velocidades elevadas se elevan quedando en posición perpendicular a la varilla de vidrio; con ello conseguimos una agitación más

homogénea y a su vez se facilita la entrada y salida del agitador en el embudo de decantación. Finalmente, el agitador III, es una modificación del anterior donde se añade una espiral de vidrio en la zona inferior con la que se consigue alcanzar las zonas más bajas de la disolución, se consiguiendo así una agitación más homogénea de la muestra.

Para seleccionar el tipo de agitador, se prepararon en matraces aforados de 100 ml de capacidad, cuatro series de tres disoluciones que contenían cada una de ellas una concentración de bisfenol A de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Se adicionaron 30 gramos NaCl y se extrajeron con 1.5 ml de éter etílico agitando mecánicamente durante 2 minutos con los diferentes agitadores. Finalmente, se registraron los espectros de excitación y emisión en los rangos 200 a 290 nm y 290 a 350 nm respectivamente fijando como longitudes de onda de excitación 278 nm y de emisión 305 nm respectivamente. Se emplearon rendijas de excitación y emisión de 5 nm, velocidad de barrido 240 nm/min y temperatura  $10.0\pm 0.5^\circ\text{C}$ . En la tabla III.3.3 se muestran los resultados obtenidos.

*Tabla III.3.3. Influencia del tipo de agitador.*

Agitacion	IF*	DER (%)
Manual	502.0	8.36
Agitador I	506.8	1.64
Agitador II	493.0	1.82
Agitador III	548.4	1.45

*\*Promedio de tres determinaciones.*

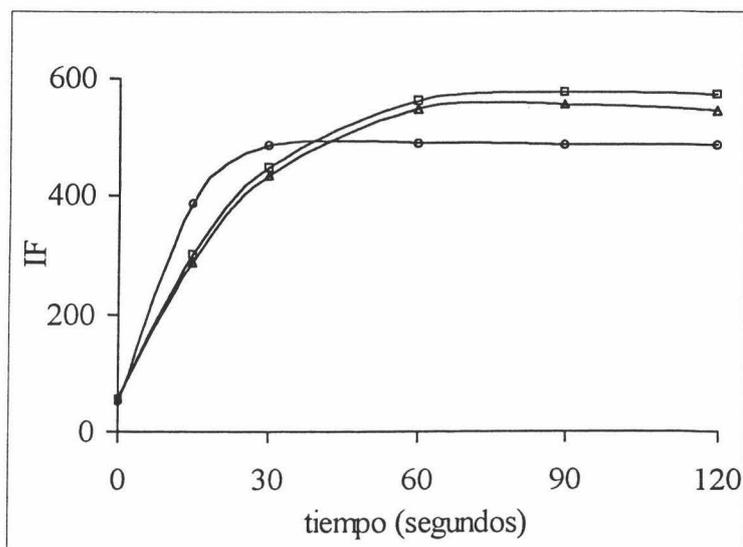
Se observa que el mayor rendimiento de extracción se consigue con el agitador número III. Por otra parte, la reproducibilidad, evaluada como desviación estándar relativa de las tres medidas, es prácticamente la misma para los tres agitadores mecánicos y aproximadamente 5 veces más pequeña que la desviación obtenida mediante agitación manual. Por tanto, el agitador III fue el seleccionado para la realización de las siguientes experiencias.

### 3.2.2.2. Tiempo de agitación.

Con objeto de estudiar la influencia que el tiempo de agitación ejerce en la extracción del compuesto, se prepararon tres series de disoluciones acuosas en matraces aforados de 100, 250 y 500 ml de capacidad que contenían  $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de bisfenol A en 100 ml y  $4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de muestra acuosa en 250 y 500 ml de bisfenol A respectivamente. Seguidamente se trasvasaron a los correspondientes embudos de decantación y se disolvieron 30, 75 y 150 gramos de NaCl en cada una de las series. A continuación, se añadió 1.5, 2.5 y 5 ml de éter etílico respectivamente y se agitó durante tiempos crecientes manteniendo una velocidad de agitación máxima de 2000 r.p.m. mediante el uso del agitador mecánico provisto del agitador de vidrio seleccionado con anterioridad. Finalmente, se registraron los espectros de excitación fluorescente fijando las condiciones instrumentales habituales. En la tabla III.3.4 y en la figura III.3.4 se muestran los resultados obtenidos

*Tabla III.3.4. Influencia del tiempo de agitación.*

Tiempo (s)	IF <sub>100 ml</sub>	IF <sub>250 ml</sub>	IF <sub>500 ml</sub>
0	50.23	59.36	54.26
15	386.03	289.05	300.02
30	486.05	435.53	450.24
60	490.28	549.99	563.23
90	486.70	555.11	575.20
120	487.96	546.43	571.35



**Figura III.3.4.** Influencia del tiempo de agitación: 100 ml (○), 250 ml (Δ) y 500 ml (□) de muestra acuosa.

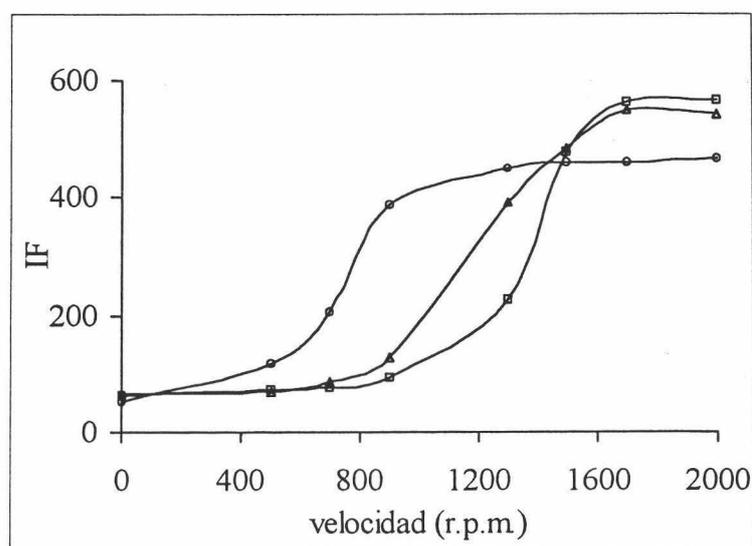
La observación de los resultados pone de manifiesto que la intensidad de fluorescencia crece hasta alcanzar su valor máximo para un tiempo de agitación de 30 segundos cuando el volumen de muestra es 100 ml y 60 segundos cuando es 250 o 500 ml. A partir de estos tiempos, la señal permanece prácticamente constante. Se fijó por tanto el tiempo de agitación en 60 segundos, común para los tres volúmenes, en la realización de experiencias posteriores.

### 3.2.2.3. Velocidad de agitación.

Se ha estudiado la influencia que ejerce la velocidad de agitación sobre el sistema en estudio. Para ello se llevó a cabo una experiencia análoga a la realizada en el apartado anterior pero en este caso la extracción se realizó agitando a velocidades crecientes y manteniendo un tiempo de agitación de 60 segundos. Tras extraer, se registraron los correspondientes espectros de excitación fluorescente fijando las condiciones instrumentales habituales. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla III.3.5 y se representan en la figura III.3.5.

*Tabla III.3.5. Influencia de la velocidad de agitación.*

Velocidad (r.p.m.)	IF <sub>100 ml</sub>	IF <sub>250 ml</sub>	IF <sub>500 ml</sub>
0	50.26	66.61	60.21
500	117.53	70.25	70.52
700	206.26	84.22	76.22
900	388.76	125.36	94.25
1300	447.83	391.69	225.36
1500	457.76	483.03	475.23
1700	460.35	550.19	562.30
2000	466.30	540.54	565.32

*Figura III.3.5. Influencia de la velocidad de agitación: 100 ml (○), 250 ml (Δ) y 500 ml (□) de muestra acuosa.*

La observación de los resultados pone de manifiesto que la intensidad de fluorescencia aumenta al aumentar la velocidad de agitación hasta alcanzar el valor de 1300 r.p.m. cuando el volumen de muestra empleado es 100 ml y 1700 r.p.m. cuando es 250 o 500 ml. A partir de estos valores la señal permanece prácticamente constante. Se fijó, por tanto, una velocidad de agitación común de 1700 r.p.m. para experiencias posteriores. A esta velocidad de agitación cualquier pequeña fluctuación no afecta al resultado y es de mantener por el sistema de agitación utilizado.

### 3.2.3. *Tiempo de separación de las fases.*

Para llevar a cabo este estudio se prepararon tres series de cuatro matraces aforados de 100, 250 y 500 ml respectivamente en los cuales se introdujo agua desionizada. Se trasladaron a los correspondientes embudos de decantación y se adicionaron 30, 75 y 150 gramos de NaCl respectivamente. A continuación se extrajeron con 1.5, 2.5 y 5 ml de éter etílico respectivamente agitando durante un minuto a una velocidad de 1700 r.p.m. Finalmente, se dejó decantar las fases durante tiempos crecientes y se midió el volumen obtenido en cada caso. En la tabla III.3.6 se muestran los resultados.

*Tabla III.3.6. Influencia del tiempo de separación de las fases*

Tiempo (s)	V <sub>100 ml</sub> (μl)	V <sub>250 ml</sub> (μl)	V <sub>500 ml</sub> (μl)
30.0	330.0	190.0	160.0
60.0	400.0	400.0	400.0
90.0	400.0	410.0	405.0
120.0	410.0	405.0	410.0

Se observa que un minuto es suficiente en todos los casos para una adecuada separación de la fase orgánica y poder así recoger el volumen de 400 μl necesario para la realización de las medidas de fluorescencia.

### 3.2.4. *Influencia del pH sobre el rendimiento del proceso de extracción.*

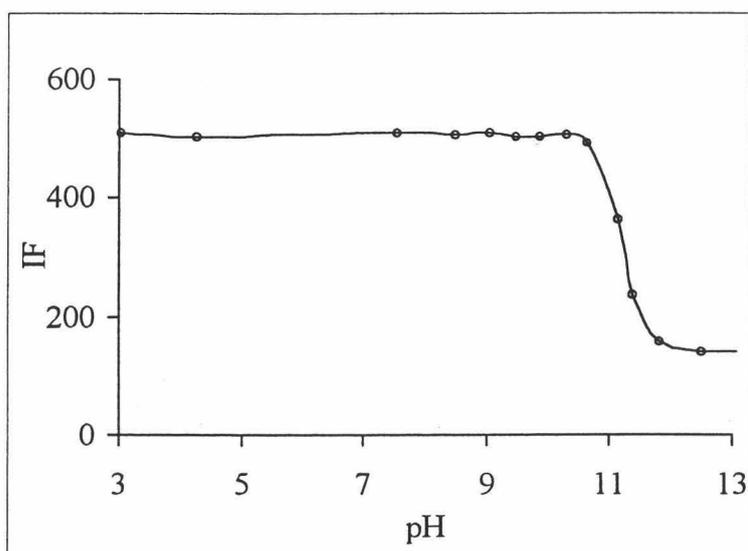
Se estudió la influencia del pH de la disolución acuosa sobre el rendimiento de extracción mediante medidas de la intensidad de fluorescencia emitida por el bisfenol A tras su microextracción líquido-líquido.

El volumen seleccionado para llevar a cabo la experiencia fue el de 100 ml ya que los resultados son totalmente extrapolables a otros volúmenes y además con él se ahorra en reactivos. Para ello en matraces aforados de 100 ml de capacidad se prepararon disoluciones que contenían 1 ml de disolución acuosa de bisfenol A de 1.0 mg·l<sup>-1</sup>. Se

adicionó agua desionizada hasta un volumen próximo al enrase y mediante la adición de HCl o NaOH de diferentes concentraciones se fijó el pH deseado, tras lo cual se enrasó con agua desionizada y se repitió la medida del pH. A continuación, las disoluciones se transvasaron a embudos de decantación de 100 ml donde se añadieron 30 g de ClNa y se extrajeron con 1.5 ml de éter etílico mediante agitación mecánica durante 1 minuto a 1700 r.p.m. Finalmente se midió la intensidad de fluorescencia fijando las condiciones instrumentales habituales. Los resultados obtenidos, se muestran en la tabla III.3.7 y se representan en la figura III.3.6.

*Tabla III.3.7. Influencia del pH.*

<b>PH</b>	<b>IF</b>	<b>pH</b>	<b>IF</b>
<b>2.04</b>	511.70	<b>10.32</b>	506.39
<b>4.28</b>	503.03	<b>10.66</b>	492.24
<b>7.55</b>	509.95	<b>11.15</b>	362.13
<b>8.50</b>	507.50	<b>11.39</b>	236.24
<b>9.06</b>	510.38	<b>11.80</b>	156.23
<b>9.50</b>	503.66	<b>12.52</b>	142.08
<b>9.91</b>	505.62	<b>13.00</b>	138.83



*Figura III.3.6. Influencia del pH.*

Se observa que la intensidad de fluorescencia emitida por el bisfenol A permanece constante y presenta un valor máximo para pH inferiores a 10, mientras que para pH superiores disminuye rápidamente haciéndose casi despreciable. Se puede concluir por tanto que la forma protonada del bisfenol A es la que se extrae en éter etílico y muestra señal fluorescente, no haciéndolo la forma disociada, hecho que coincide con los resultados obtenidos en el estudio de pH realizado en el apartado anterior, dedicado a la determinación de bisfenol A mediante formación de complejos de inclusión.

Por otra parte, el amplio intervalo de pH en el que permanece constante la intensidad de fluorescencia hace que no sea necesario fijar el pH del medio mediante el empleo de disoluciones reguladoras.

### ***3.2.5. Influencia de la temperatura.***

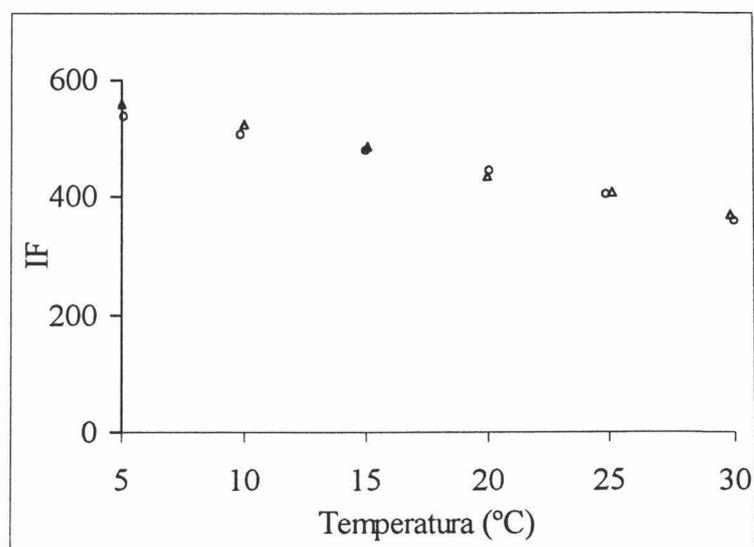
Como ya se indicó uno de los factores que ejerce mayor influencia sobre la emisión fluorescente es la temperatura de la muestra a la que se realiza la medida de la señal. Un incremento en dicha variable puede llegar incluso a hacerla. Además en este caso al emplear un disolvente altamente volátil, es fundamental el empleo de bajas temperaturas para las medidas fluorescentes.

Con objeto de estudiar el efecto de la temperatura en un matraz aforado de 100 ml de capacidad se preparó una disolución que contenía 1 ml de disolución acuosa de bisfenol A de  $1.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Se enrasó con agua desionizada y se añadieron 30 g de ClNa. A continuación se transvasó a un embudo de decantación de 100 ml donde se extrajo con éter etílico siguiendo el procedimiento descrito con anterioridad. Finalmente se registraron los espectros de emisión y excitación fluorescente fijando las condiciones instrumentales habituales, pero modificando la temperatura del sistema en el intervalo comprendido entre 5 y 30 °C, límite superior establecido por la volatilidad del disolvente.

Los resultados obtenidos son los mostrados en la tabla III.3.8 y representados en la figura III.3.7.

*Tabla III.3.8. Influencia de la temperatura del sistema.*

Temperatura creciente		Temperatura decreciente	
T (°C)	IF	T (°C)	IF
5.1	538.92	29.8	370.32
9.9	508.30	25.1	409.23
15.0	478.51	20.0	435.81
20.1	445.20	15.1	488.36
24.9	403.63	10.0	525.32
30.0	361.34	5.0	557.80

*Figura III.3.7. Influencia de la temperatura. Temperatura creciente (o) y temperatura decreciente (Δ).*

Se observa que la señal fluorescente decrece al aumentar la temperatura, siendo el efecto reversible. Se seleccionó como temperatura de trabajo  $10.0 \pm 0.5$  °C ya que, aunque en principio podría suponerse la temperatura óptima es de 5 °C, la dificultad y el tiempo necesario para alcanzar esta temperatura y mantenerla constante con el termostato empleado nos hizo optar por la temperatura de 10 °C para la realización de medidas posteriores, ya que por otra parte supone sólo un descenso del 5.6% sobre la señal emitida a 5 °C.

### 3.2.6. Resumen de la optimización de variables.

En la siguiente tabla se incluyen los valores óptimos establecidos para las variables experimentales e instrumentales en las experiencias desarrolladas a lo largo de los apartados anteriores.

*Tabla III.3.9. Resumen de variables experimentales e instrumentales.*

Variables instrumentales	Óptimo	Variables experimentales	Óptimo		
			100 ml	250 ml	500 ml
$\lambda_{exc}$ (nm)	278	$V_{disolvente}$ (ml)	1.5	2.5	5.0
$\lambda_{em}$ (nm)	305	Tipo de agitador	Agitador III		
h (nm)	239	$t_{agitación}$ (s)	30	60	60
Factor de filtrado	12	$v_{agitación}$ (r.p.m.)	1300	1700	1700
Rend exc (nm)	5	$t_{separación de fases}$ (s)	60		
Rend em (nm)	5	pH	---		
$V_{barrido}$ (nm/min)	240	$T^a$ (°C)	10.0±0.5		

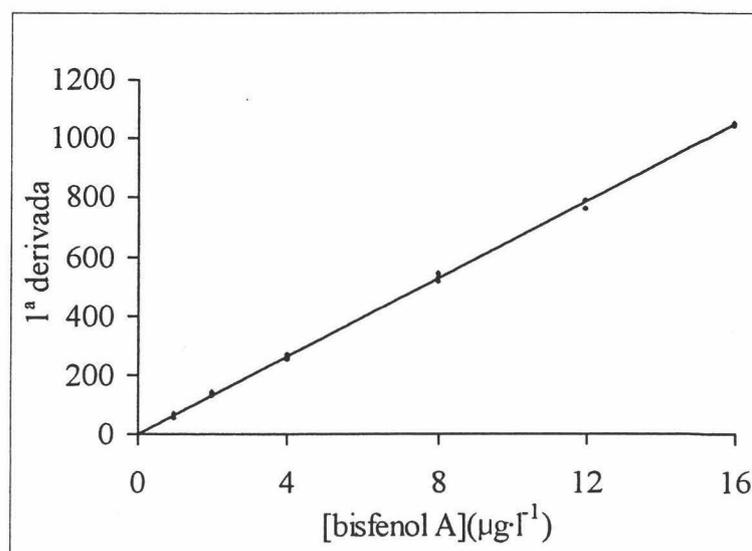
### 3.3. Parámetros analíticos.

#### 3.3.1. Establecimiento y verificación del modelo.

Según se ha señalado con anterioridad, una de las ventajas que posee la microextracción líquido-líquido es la posibilidad de incrementar la sensibilidad y reducir el límite de detección del método analítico, incrementando el volumen de disolución acuosa empleado. Por este motivo, se han obtenido las funciones de calibrado para diferentes volúmenes de disolución acuosa –100 ml, 250 ml y 500 ml- en las condiciones operatorias establecidas anteriormente y se han comparado los resultados obtenidos con objeto de seleccionar el volumen adecuado.

### 3.3.1.1. Función de calibrado para un volumen de 100 ml.

En una serie de matraces aforados de 100 ml de capacidad se introdujeron volúmenes crecientes de una disolución acuosa de bisfenol A de  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de concentración, para obtener las concentraciones finales 1.0, 4.0, 8.0, 12.0, 16.0 y  $20.0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  respectivamente. A continuación, tras enrasar, se trasvasaron a embudos de decantación de 100 ml de capacidad, se disolvieron 30 g de NaCl en cada una de ellas, y se extrajeron con 1.5 ml de éter etílico, agitando durante 1 minuto a 1700 r.p.m. Seguidamente, se registró el espectro de excitación fluorescente en el intervalo entre 200 a 290 nm, fijando  $\lambda_{\text{em}}=305 \text{ nm}$ , rendijas de excitación y emisión 5 nm, velocidad de barrido de 240 nm/min y temperatura  $10.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Finalmente se obtuvo el espectro correspondiente a la primera derivada con un factor de suavizado 12 puntos y se midió la señal a  $\lambda_{\text{exc}}=239 \text{ nm}$ . Se realizaron tres réplicas experimentales para cada concentración. Los resultados obtenidos son representados en la figura III.3.8. Así mismo, se muestran los parámetros con su correspondiente intervalo de incertidumbre.



**Figura III.3.8.** Función de calibrado para el bisfenol A (100 ml).

Los parámetros del calibrado son los mostrados a continuación.

*Tabla III.3.10. Parámetros del calibrado (100 ml).*

Parámetro	Valor
n	18
a	0.56 ± 0.8
s <sub>a</sub>	0.29
b (l·μg <sup>-1</sup> )	65.5 ± 7.3
s <sub>b</sub> (l·μg <sup>-1</sup> )	2.65
r <sup>2</sup> (%)	99.49
S <sub>RC</sub>	3.92
P <sub>lack of fit</sub> (%)	46.72

*3.3.1.2. Función de calibrado para un volumen de 250 ml.*

De forma análoga, en una serie de matraces aforados de 250 ml de capacidad se introdujeron volúmenes crecientes de una disolución acuosa de bisfenol A de 1 mg·l<sup>-1</sup> de concentración, para obtener las concentraciones finales de 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 10.0 μg·l<sup>-1</sup>. A continuación se enrasaron y se transvasaron a embudos de decantación de 250 ml de capacidad. Tras disolver 75 g de NaCl, se extrajeron con 2.5 ml de éter etílico, agitando durante 1 minuto a 1700 r.p.m. A continuación, se registró el espectro de excitación fluorescente en el intervalo entre 200 a 290 nm, fijando las condiciones instrumentales habituales. Finalmente se obtuvo la primera derivada el espectro con un factor de suavizado del 12 puntos y se midió la señal a λ<sub>exc</sub>=239 nm. Se realizaron tres réplicas experimentales de cada concentración.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura III.3.9.

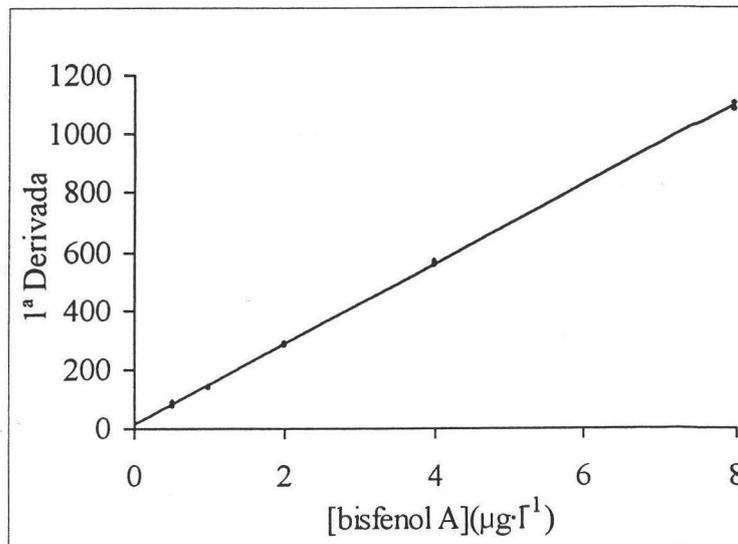


Figura III.3.9. Función de calibrado para el bisfenol A (250 ml).

Los parámetros del calibrado son los mostrados a continuación.

Tabla III.3.11. Parámetros del calibrado (250 ml).

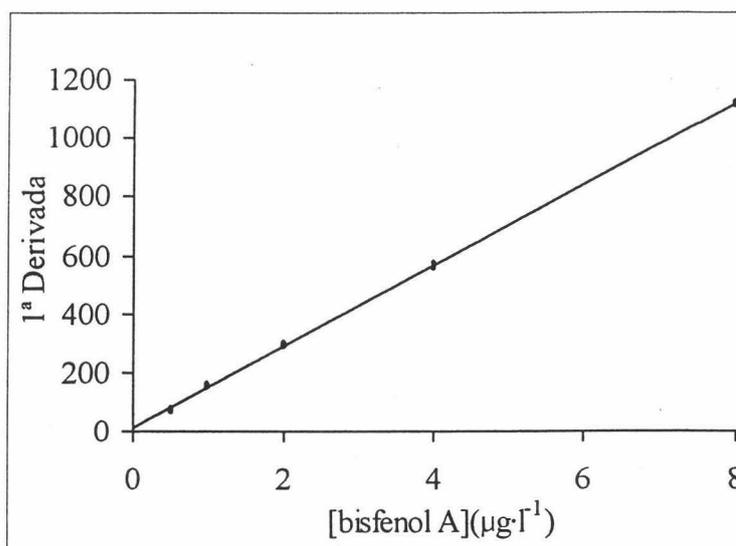
Parámetro	Valor
n	15
a	$14.9 \pm 1.0$
$s_a$	0.376
$b$ ( $\text{l}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ )	$135.0 \pm 2.5$
$s_b$ ( $\text{l}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ )	0.91
$r^2$ (%)	99.9
SRC	5.56
$P_{\text{lack of fit}}$ (%)	25,2

3.3.1.3. Función de calibrado para un volumen de 500 ml.

Finalmente, se introdujeron en una serie de matraces aforados de 500 ml de capacidad volúmenes crecientes de una disolución acuosa de bisfenol A de  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de concentración, para obtener las concentraciones finales de 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y  $8.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Tras enrasar, se transvasaron a embudos de decantación de 500 ml de capacidad donde se disolvieron 150 g de NaCl y se extrajeron con 5.0 ml de éter etílico, agitando durante 1

minuto a 1700 r.p.m. A continuación se registró el espectro de excitación fluorescente en las condiciones instrumentales habituales y tras derivar con un factor de filtrado de 12 puntos, se midió la señal a  $\lambda_{\text{exc}}=239$  nm. Se realizaron tres réplicas experimentales de cada concentración.

Los resultados obtenidos son mostrados en la figura III.3.10.



*Figura III.3.10. Función de calibrado para el bisfenol A (500 ml).*

En la tabla III.3.12 se muestran los resultados obtenidos para los parámetros del calibrado.

*Tabla III.3.12. Parámetros del calibrado (500 ml).*

Parámetro	Valor
n	15
a	$14.0 \pm 5.3$
$s_a$	1.94
b ( $\text{l}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ )	$138 \pm 1.3$
$s_b$ ( $\text{l}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ )	0.47
$r^2$ (%)	99.9
SRC	2.86
$P_{\text{lack of fit}}$ (%)	32.27

### 3.3.1.4. Comparación de la sensibilidad de los distintos volúmenes.

Con objeto de estimar el incremento en la sensibilidad del método, producido al aumentar el volumen de muestra tratado y manteniendo el volumen de fase orgánica mínimo para llevar a cabo las medidas de fluorescencia, se estudió la variación que se produce en las pendientes de las funciones de calibrado para los diferentes volúmenes. En la tabla III.3.13 se indican dichas pendientes así como el rango dinámico lineal correspondiente a cada volumen.

**Tabla III.3.13.** Comparación de la sensibilidad para los distintos volúmenes.

	100 ml	250 ml	500 ml
<b>Pendiente</b>	65.5	135.0	138.0
<b>Rango lineal</b>	1.0 – 20.0	0.5 – 10.0	0.5 – 10.0
<b>S<sub>250/100</sub></b>	2.03		
<b>S<sub>500/250</sub></b>	1.03		

Se observa que la sensibilidad se incrementa notablemente cuando se pasa de 100 a 250 ml de volumen de muestra, mientras que el aumento experimentado al pasar de 250 a 500 ml no es significativo, debido probablemente a una saturación de la fase orgánica. Así mismo se produce una disminución en los límites inferior y superior del rango dinámico lineal al incrementar el volumen de muestra acuosa. Por tanto, se seleccionó el volumen de 250 ml para la aplicación del método a matrices reales.

Finalmente, para la evaluación del cumplimiento de homocedasticidad en los datos, se ha hecho uso del análisis gráfico de los residuales, comentado en el capítulo II. La representación gráfica de dichos residuales obtenida para los tres volúmenes utilizados es la mostrada en las figuras III.3.11 a 13.

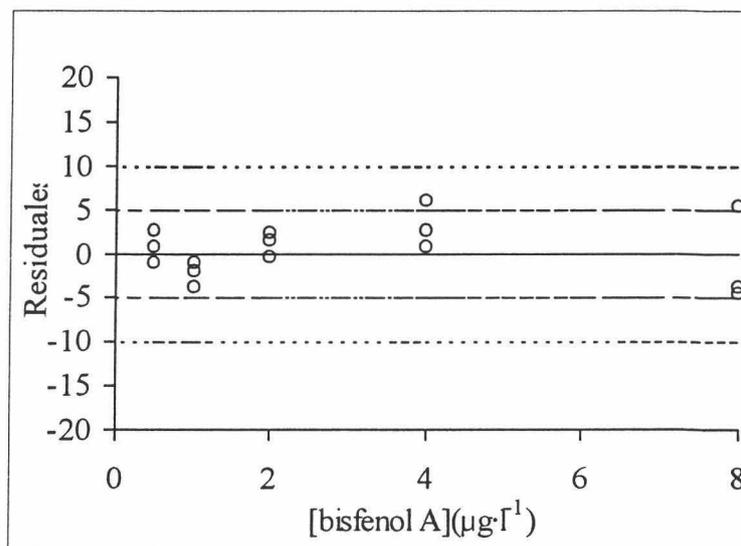


Figura III.3.11. Evaluación de la condición de homocedasticidad (100 ml)

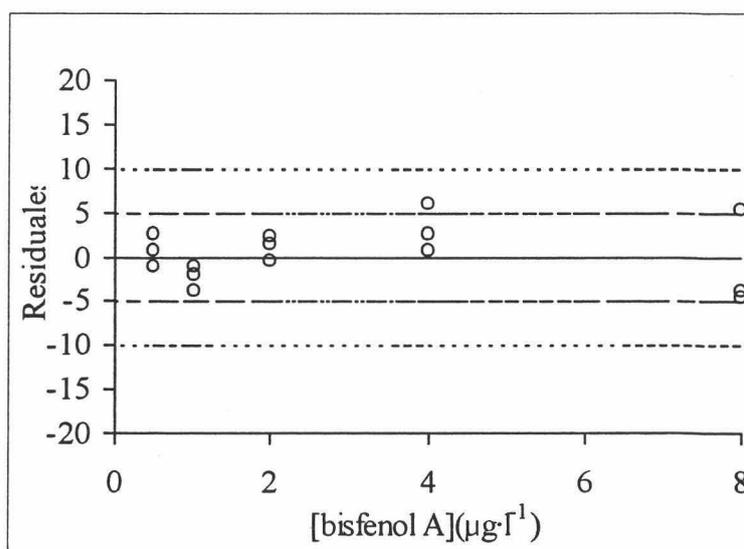
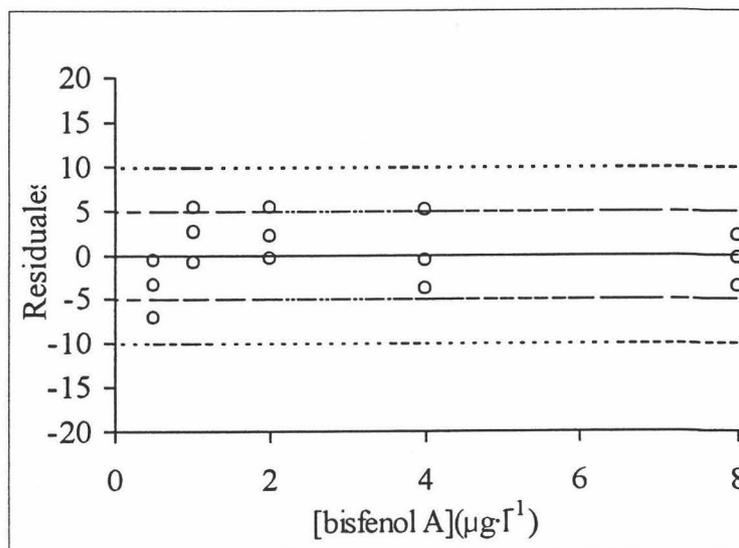


Figura III.3.12. Evaluación de la condición de homocedasticidad (250 ml)



*Figura III.3.13. Evaluación de la condición de homocedasticidad (500 ml)*

Se observa en los gráficos que en los tres casos se cumplen las premisas fijadas en el capítulo II para el cumplimiento de la condición de homocedasticidad según el criterio adoptado. Por tanto es posible afirmar que los datos son homocedásticos.

### *3.3.2. Independencia de la señal analítica emitida por el bisfenol A con la concentración de fenol.*

Para comprobar la independencia entre la señal analítica del bisfenol A con la concentración de fenol en el medio, se realizaron cuatro funciones de calibrado para bisfenol A una en ausencia de fenol y tres en presencia de concentraciones crecientes del mismo.

Siguiendo el procedimiento operatorio descrito en el apartado 3.1.1, en matraces aforados de 100 ml de capacidad se prepararon cuatro series de disoluciones cada una de las cuales contenía una concentración de bisfenol A comprendida entre 1.0 y 20.0  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  en presencia de 0.0, 5.0, 10.0 y 20.0  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de fenol respectivamente.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla III.3.14.

*Tabla III.3.14. Funciones de calibrado para el bisfenol A en ausencia y presencia de fenol.*

	[Fenol] ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )			
	0.0	5.0	10.0	20.0
<b>n</b>	6	6	6	6
<b>b (<math>\text{l}\cdot\mu\text{g}^{-1}</math>)</b>	$65.5 \pm 7.3$	$64.9 \pm 3.0$	$65.9 \pm 2.2$	$65.2 \pm 3.5$
<b><math>s_b</math> (<math>\text{l}\cdot\mu\text{g}^{-1}</math>)</b>	2.65	1.09	0.80	1.27
<b>a</b>	$0.56 \pm 0.08$	$0.29 \pm 0.25$	$0.95 \pm 0.20$	$1.82 \pm 0.03$
<b><math>s_a</math></b>	0.029	0.089	0.072	0.011
<b><math>r^2</math> (%)</b>	99.8	99.8	99.9	99.9
<b>SRC</b>	3.92	14.61	10.67	16.86

Para demostrar la igualdad entre los calibrados, se compararon las pendientes y las ordenadas en el origen obtenidas en presencia y ausencia de fenol, empleando para ello el test de t-student.

En primer lugar, se compararon las varianzas de los calibrados. El estadístico F calculado se comparó con el valor tabulado para un nivel de significación del 5% y 4 grados de libertad ( $n_1=n_2=6$ ). Los resultados son mostrados en la tabla III.3.15.

*Tabla III.3.15. Test de comparación de varianzas.*

[Fenol] ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	$F_{\text{calc}}$	$F_{\text{tab}}$	Conclusión
0.0	---	---	---
5.0	13.89	6.39	$H_1$
10.0	7.37	6.39	$H_1$
20.0	18.49	6.39	$H_1$

En todos los casos se concluye por la hipótesis alternativa, es decir, existe diferencia significativa entre las varianzas de los calibrados para un nivel de significación del 5% ya que  $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$

Por tanto se aplicó el test de  $t$  para la comparación de pendientes y de  $z$  para la ordenada en el origen correspondientes a este supuesto. Los valores calculados son comparados con los valores tabulados para 4 grados de libertad en el caso de las pendientes y un nivel de significación del 5% en ambos casos. Los resultados son los mostrados en la tabla III.3.16.

*Tabla III.3.16. Comparación de pendientes y ordenadas en el origen.*

[Fenol] ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Pendiente			Ordenada en el origen		
	$t_{\text{cal}}$	$t_{\text{tab}}$	Conclusión	$z_{\text{cal}}$	$z_{\text{tab}}$	Conclusión
5.0	0.906	2.776	$H_0$	0.044	1.960	$H_0$
10.0	0.523	2.776	$H_0$	0.084	1.960	$H_0$
20.0	0.258	2.776	$H_0$	0.178	1.960	$H_0$

Se observa que no existe diferencia significativa entre las pendientes y las ordenadas en el origen de los calibrados en presencia de fenol con respecto a las obtenidas en ausencia del mismo para el nivel de significación *seleccionado* ( $t_{\text{cal}} < t_{\text{tab}}$  y  $z_{\text{cal}} < z_{\text{tab}}$ ). Por tanto, se puede afirmar que la presencia de fenol no interfiere en la determinación del bisfenol A, mediante el método propuesto.

### 3.3.3. *Parámetros de calidad del método analítico.*

Los parámetros de calidad determinados según los procedimientos desarrollados en el capítulo II de esta Memoria fueron: Rango dinámico lineal y linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión y sensibilidad analítica.

#### 3.3.3.1. *Rango dinámico lineal y linealidad.*

Los intervalos de trabajo seleccionados fueron  $1.0$  a  $20.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para el volumen de 100 ml y  $0.5$  a  $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para 250 y 500 ml de muestra acuosa. Se concluye por tanto que los rangos de trabajo seleccionados son lineales. Por otra parte la linealidad calculada

resultó ser 96.0 % para el volumen de 100 ml, 99.32 % para 250 ml y 99.66 % para 500 ml.

### 3.3.3.2. Límite de detección y cuantificación.

Para calcular el límite de detección y cuantificación, se aplicó el procedimiento analítico desarrollado para los volúmenes de 100, 250 y 500 ml de muestra a 10 blancos en cada caso. Tras medir las correspondientes señales fluorescentes en primera derivada de los espectros de excitación, se calcularon los parámetros mostrados en la tabla III.3.17.

*Tabla III.3.17. Límites de detección y cuantificación del método.*

	100 ml*	250 ml*	500 ml*
<b>Señal media</b>	63.20	72.9	80.29
<b>Desviación estándar</b>	3.05	3.10	3.04
<b>b (<math>l \cdot \mu\text{g}^{-1}</math>)</b>	65.5	135.0	138.0
<b><math>C_L</math> (<math>\mu\text{g} \cdot l^{-1}</math>)</b>	0.14	0.07	0.07
<b><math>C_Q</math> (<math>\mu\text{g} \cdot l^{-1}</math>)</b>	0.48	0.23	0.23

\* Diez determinaciones

### 3.3.3.3. Precisión.

Para evaluar la precisión del método analítico se estudió la reproducibilidad de la señal analítica. Se aplicó el procedimiento analítico a tres series de disoluciones que contenía cada una 10 muestras con una concentración de bisfenol A correspondiente al punto central de la función de calibrado para cada uno de los volúmenes ensayados, es decir  $10.0 \mu\text{g} \cdot l^{-1}$  para 100 ml y  $4.0 \mu\text{g} \cdot l^{-1}$  para los otros dos volúmenes. Se registraron los correspondientes espectros de excitación, fijando las condiciones instrumentales habituales y tras obtener la primera derivada se midió la señal a 239 nm. Finalmente se calcularon los parámetros mostrados en la tabla III.3.18.

*Tabla III.3.18. Reproducibilidad del método analítico.*

	100 ml*	250 ml*	500 ml*
<b>Señal media</b>	650.2	546.1	580.6
<b>Desviación estándar</b>	15.4	15.94	16.60
<b>DER (%)</b>	2.37	2.92	2.86

\* Diez determinaciones

Las desviaciones estándar relativas calculadas para el punto central de la función de calibrado, son en todos los casos menores del 5%,

#### 3.3.3.4. Sensibilidad.

En la tabla III.3.19 se muestran los valores de las sensibilidades del calibrado, así como de las sensibilidades analíticas para los tres volúmenes estudiados, de acuerdo con la definición propuesta en el capítulo II de esta Memoria.

*Tabla III.3.19. Sensibilidad del método analítico.*

	100 ml	250 ml	500 ml
<b>S<sub>RC</sub></b>	3.92	5.56	2.86
<b>b (l·μg<sup>-1</sup>)</b>	65.5	135.0	138.0
<b>S<sub>analítica</sub> (μg·l<sup>-1</sup>)</b>	0.06	0.04	0.02

#### 3.3.3.5. Resumen de los parámetros analíticos.

Los parámetros analíticos calculados son resumidos en la tabla III.3.20.

Tabla III.3.20. Parámetros de calidad del método analítico.

Parámetro	100 ml	250 ml	500 ml
<b>b</b> ( $l \cdot \mu\text{g}^{-1}$ )	$65.5 \pm 7.3$	$135.0 \pm 2.5$	$138 \pm 1.3$
<b>a</b> uf	$0.56 \pm 0.8$	$14.9 \pm 1.0$	$14.0 \pm 5.3$
<b>r<sup>2</sup></b> (%)	99.8%	99.9 %	99.9%
<b>S<sub>RC</sub></b>	3.92	5.56	2.86
<b>RDL</b> ( $\mu\text{g} \cdot l^{-1}$ )	1.0-20.0	0.5-10.0	0.5-10.0
<b>C<sub>L</sub></b> ( $\mu\text{g} \cdot l^{-1}$ )	0.14	0.07	0.07
<b>C<sub>Q</sub></b> ( $\mu\text{g} \cdot l^{-1}$ )	0.48	0.23	0.23
<b>DER</b> (%)	2.37	2.92	2.86
<b>S<sub>analítica</sub></b> ( $\mu\text{g} \cdot l^{-1}$ )	0.06	0.04	0.02

Es importante resaltar el incremento en la sensibilidad obtenida con el método propuesto, respecto al obtenido previamente empleando la formación de complejos de inclusión bisfenol A- $\beta$ -ciclodextrina, siendo la relación  $S_{250/\beta\text{-ciclidextrina}}$  igual a 47, así mismo, el límite de detección de este método es un orden de magnitud menor que el obtenido con el primer método.

### 3.4. Estudio de interferencias.

El conocimiento de la influencia que la presencia de especies ajenas al analito de interés puede ejercer en la determinación de éste es esencial para el desarrollo de un método analítico. Ante las enormes posibilidades que ofrece este estudio, la selección de las especies a ensayar debe estar íntimamente ligada a la naturaleza de la matriz donde el método va a ser aplicado, restringiéndose de este modo las especies a ensayar. Dichas matrices fueron las mismas que las analizadas en el apartado anterior, teniendo en cuenta su composición, mostrada en las tablas III.2.20 a 22, se realizó un estudio de interferencias similar al descrito en dicho apartado. Las especies seleccionadas fueron:  $\text{CO}_3^{-2}$ ,  $\text{CO}_3\text{H}$ ,  $\text{SO}_4^{-2}$ ,  $\text{SO}_3^{-2}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ ,  $\text{SiO}_3^{-2}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{ClO}^-$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Pb}^{+2}$ ,  $\text{Zn}^{+2}$ , y  $\text{Cd}^{+2}$ ,  $\text{Be}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Cr}^{+3}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  y  $\text{Al}^{+3}$ , así mismo se estudiaron algunos pesticidas fluorescentes como *diclone*, *morestan*, *bentazona*, *warfarina*, *benomil*, *carbaril* y *o-fenilfenol*.

El procedimiento operatorio seguido fue el siguiente: En una serie de matraces aforados de 100 ml de capacidad, se introdujo 1.0 ml de disolución acuosa de bisfenol A de concentración  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  y concentraciones crecientes del posible interferente. A continuación, se enrasó con agua desionizada y se extrajo según el procedimiento habitual. Finalmente se registraron los correspondientes espectros de excitación y se calculó la derivada de primer orden. A partir de la señal derivada y con la ayuda de la función de calibrado se determinó en cada caso el error relativo que originaba la presencia del interferente. Al igual que en el caso de la determinación de bisfenol A en presencia de  $\beta$ -ciclodextrina, se fijó como límite de tolerancia la concentración de ésta que producía un error relativo del 5%. No se consideró como tal interferencia aquella concentración que producía un error inferior al indicado. Este valor, al ser suficientemente mayor que el error inherente a nuestro método analítico nos asegura que la desviación observada en la medida de la intensidad de fluorescencia en cada caso es debida a la presencia del ion y no al propio método. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas III.3.21 a 29 y se representan en las figuras III.3.14 a 21.

Tabla III.3.21. Interferencia de los iones  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{CO}_3\text{H}^-$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$

$C_I$ ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Log $C/C_{\text{BFA}}$	$\varepsilon$ (%)			
		$\text{CO}_3^{2-}$	$\text{CO}_3\text{H}^-$	$\text{SO}_4^{2-}$	$\text{SO}_3^{2-}$
10.0	3.00	0.98	1.42	0.49	1.02
50.0	3.70	-1.60	2.20	0.65	2.36
100.0	4.00	3.20	1.65	1.03	2.65
200.0	4.30	-2.20	2.72	1.65	2.86

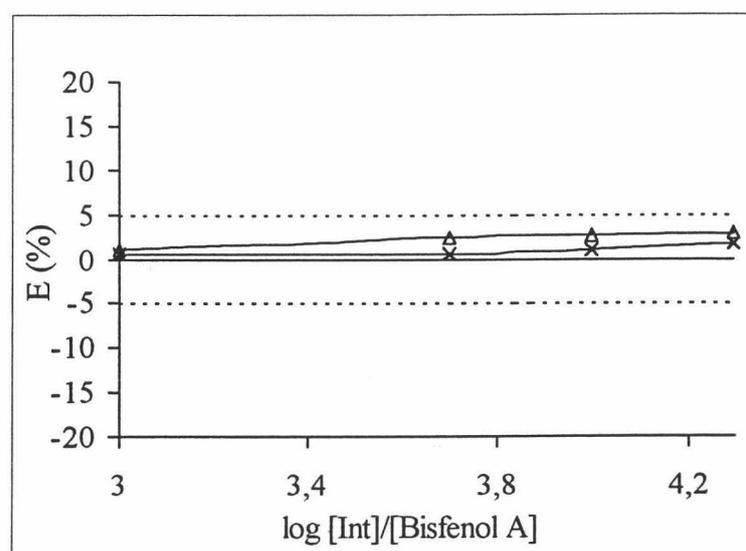
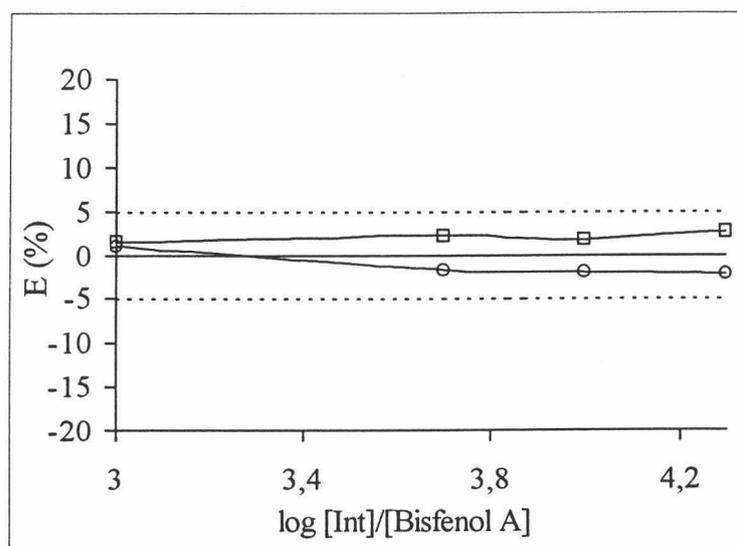


Figura III.3.14. Interferencia debida a la presencia de los iones  $\text{CO}_3^{2-}$  (o),  $\text{CO}_3\text{H}^-$  (□),  $\text{SO}_4^{2-}$  (x) y  $\text{SO}_3^{2-}$  (Δ).

Tabla III.3.22. Interferencia de los iones  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  y  $\text{ClO}^-$ .

$C_1$ ( $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Log C/ $C_{\text{BFA}}$	$\epsilon$ (%)		
		$\text{NO}_3^-$	$\text{NO}_2^-$	$\text{ClO}^-$
0.05	0.70	---	---	-4.60
0.5	1.70	1.81	0.80	-17.5
1.0	2.00	2.60	0.59	-35.0
5.0	2.70	2.02	1.03	-83.6
10.0	3.00	2.10	1.59	-94.1

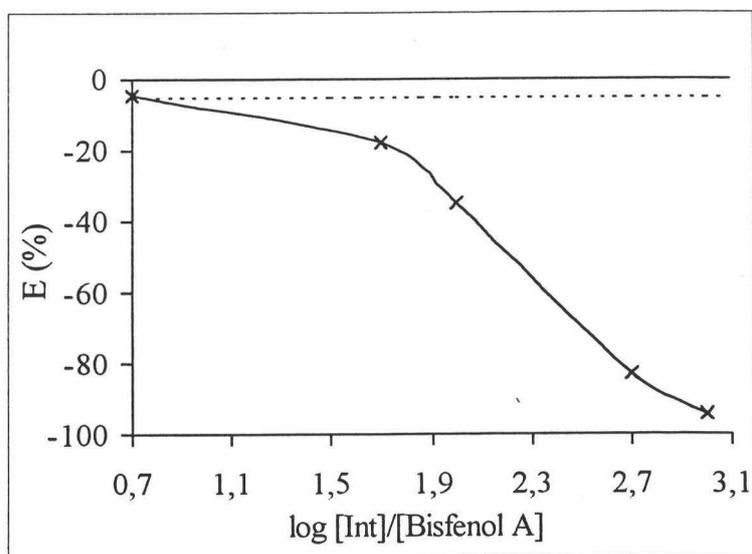
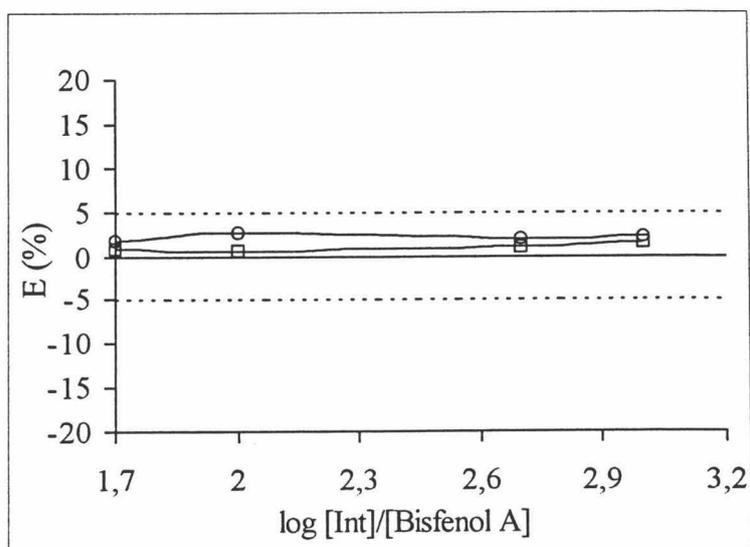


Figura III.3.15. Interferencia debida a la presencia de los iones  $\text{NO}_3^-$  (o),  $\text{NO}_2^-$  (□) e  $\text{ClO}^-$  (x).

Tabla III.3.23. Interferencia de los iones  $PO_4^{-3}$ ,  $SiO_3^{-2}$ ,  $Cl^-$  y  $Br^-$ .

$C_I$ ( $mg \cdot l^{-1}$ )	Log $C/C_{BFA}$	$\epsilon$ (%)			
		$PO_4^{-3}$	$SiO_3^{-2}$	$Cl^-$	$Br^-$
10.0	3.00	0.35	0.96	2.96	-0.30
50.0	3.70	2.20	0.58	3.10	2.00
100.0	4.00	2.90	1.23	2.66	3.20
200.0	4.30	3.20	2.56	2.30	3.60

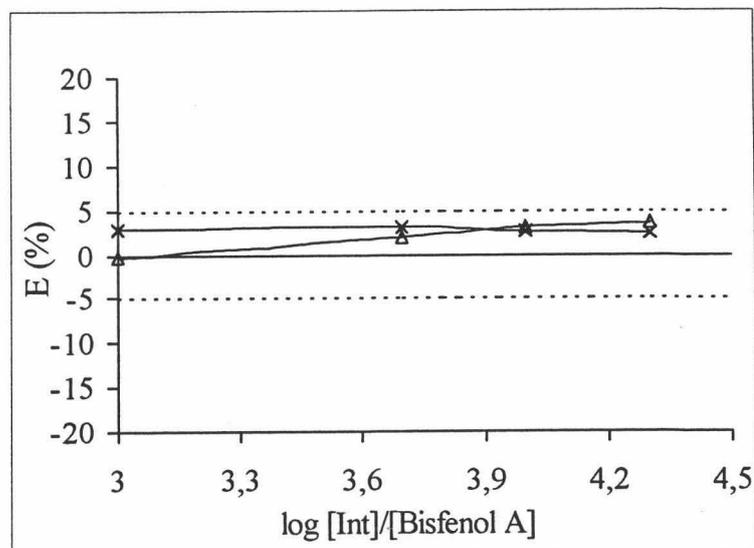
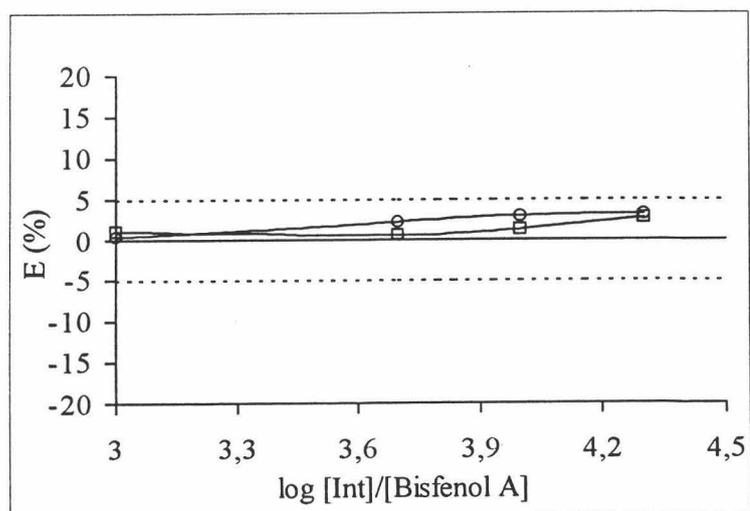


Figura III.3.16. Interferencia debida a la presencia de los iones  $PO_4^{-3}$  (o),  $SiO_3^{-2}$  (□),  $Cl^-$  (x) y  $Br^-$  (Δ).

Tabla III.3.24. Interferencia de los iones  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Cd^{+2}$  y  $Zn^{+2}$ .

$C_I$ ( $\mu g \cdot l^{-1}$ )	Log C/ $C_{BFA}$	$\epsilon$ (%)				
		$Pb^{2+}$	$Cu^{+2}$	$Mn^{+2}$	$Cd^{+2}$	$Zn^{+2}$
50.0	0.70	0.26	0.14	1.69	2.12	2.35
100.0	1.00	0.56	0.42	0.56	3.87	1.26
150.0	1.18	1.02	2.21	0.92	3.77	1.95
200.0	1.30	1.98	2.00	2.53	3.82	2.69

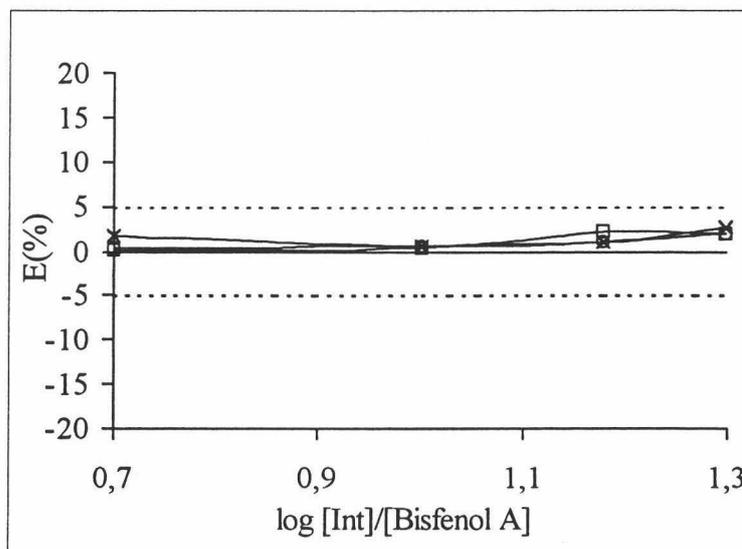
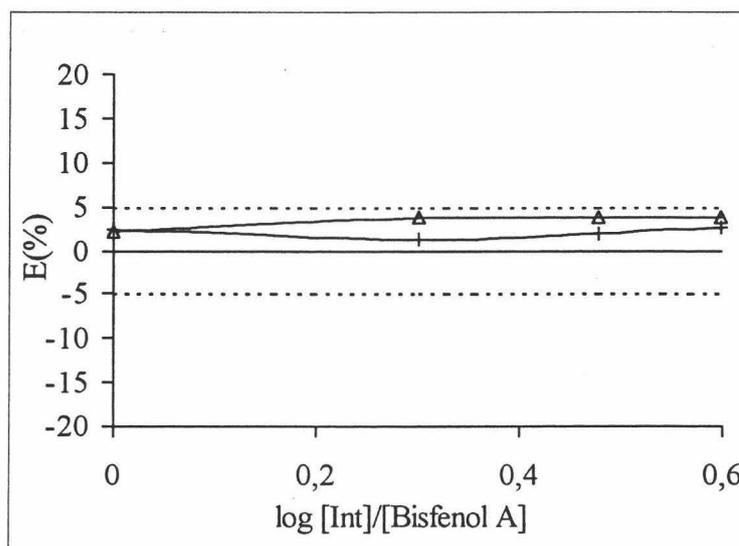


Figura III.3.17. Interferencia debida a la presencia de los iones  $Pb^{+2}$  (o),  $Cu^{+2}$  (□),  $Mn^{+2}$  (x),  $Cd^{+2}$  (Δ) y  $Zn^{+2}$  (+)

Tabla III.3. Interferencia de los iones  $Hg^{2+}$ ,  $Be^{+2}$ ,  $Ca^{+2}$  y  $Mg^{+2}$ .

$C_I$ ( $\mu g \cdot l^{-1}$ )	Log C/ $C_{BFA}$	$\epsilon$ (%)			
		$Hg^{2+}$	$Be^{+2}$	$Ca^{+2}$	$Mg^{+2}$
50.0	0.70	1.89	1.32	2.35	2.10
100.0	1.00	0.81	0.22	0.23	1.32
150.0	1.18	0.26	0.41	1.62	2.65
200.0	1.30	0.16	2.41	-3.01	1.00

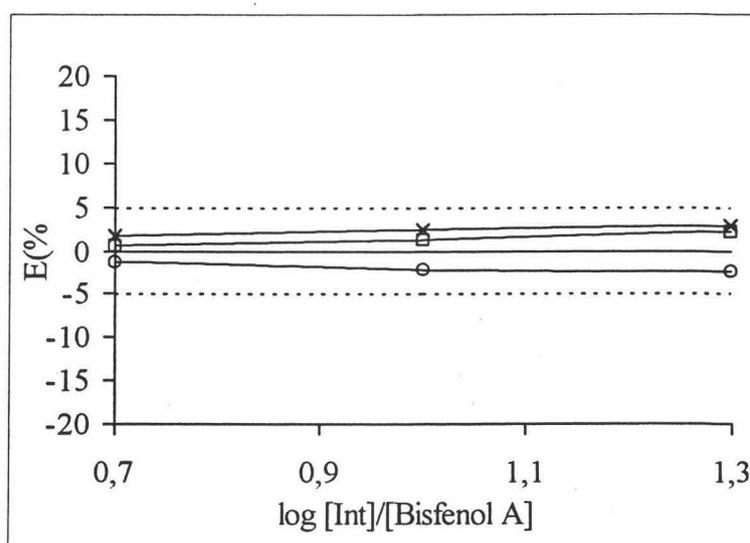
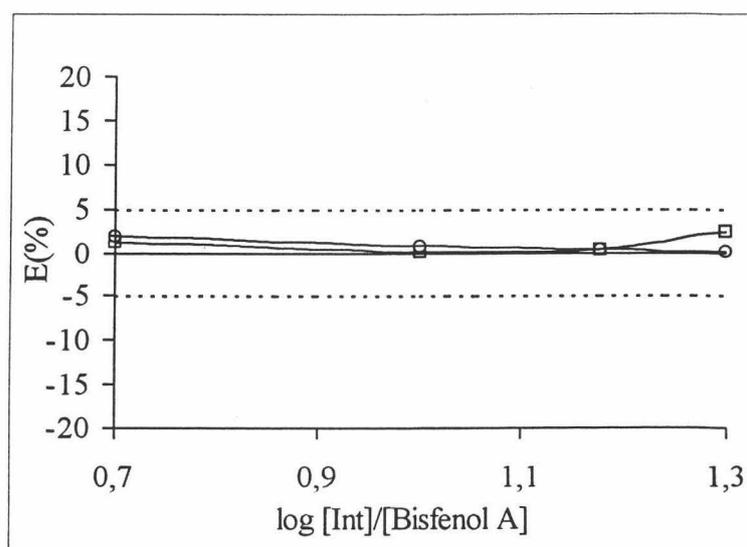


Figura III.3.18. Interferencia debida a la presencia de los iones  $Hg^{+2}$  (o),  $Be^{+2}$  (□),  $Mg^{+2}$  (x) y  $Ca^{+2}$  (Δ).

Tabla III.3.26. Interferencia de los iones  $Al^{3+}$ ,  $Cr^{3+}$  y  $Fe^{3+}$ .

$C_I$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Log $C/C_{\text{BFA}}$	$\epsilon$ (%)		
		$Al^{3+}$	$Cr^{3+}$	$Fe^{3+}$
50.0	0.70	-1.23	0.65	1.65
100.0	1.00	-2.22	1.36	2.36
200.0	1.30	-2.32	2.23	2.89

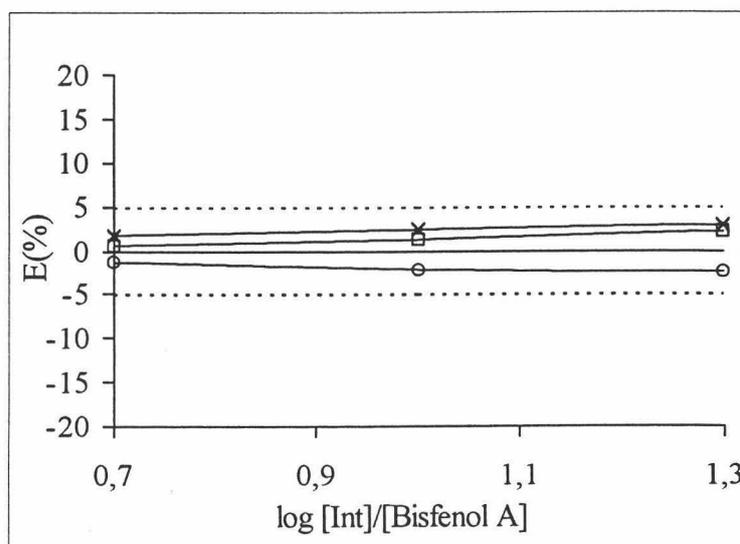
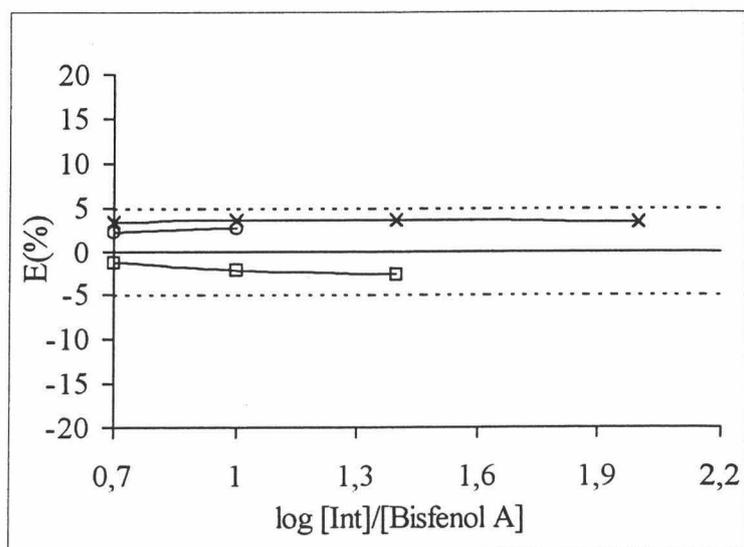


Figura III.3.19. Interferencia debida a la presencia de los iones  $Al^{3+}$  (o),  $Cr^{3+}$  (□) y  $Fe^{3+}$  (x).

Tabla III.3.27. Interferencia de Diclone, Moestan y Bentazona.

$C_I$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Log $C/C_{\text{BFA}}$	$\epsilon$ (%)		
		Diclone	Morestan	Bentazona
50	0.70	2.25	-1.26	3.25
100	1.00	2.56	-2.25	3.44
260	1.40	---	-2.65	3.56
1000	2.00	---	---	3.21



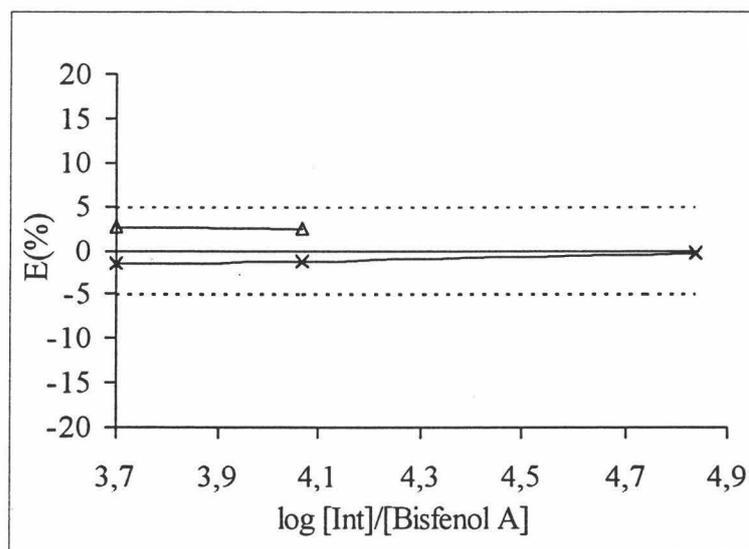
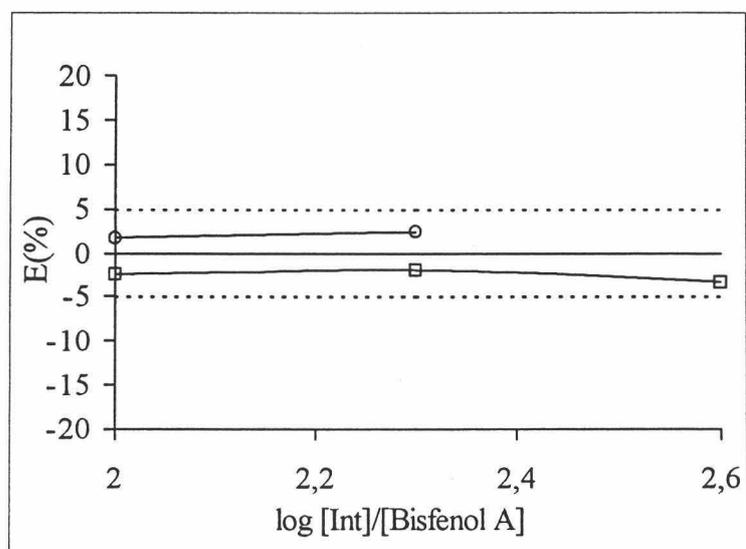
*Figura III.3.20. Interferencia debida a la presencia de Diclone (o), morestan (□) y bentazona (x).*

*Tabla III.3.28. Interferencia de warfarina y benomil.*

$C_I$ (mg·l <sup>-1</sup> )	Log C/C <sub>BFA</sub>	$\epsilon$ (%)	
		Warfarina	Benomil
1.0	2.00	1.65	-2.35
2.0	2.30	2.31	-1.96
4.0	2.60	---	-3.21

*Tabla III.3.29. Interferencia de carbaril y o-fenilfenol.*

$C_I$ (mg·l <sup>-1</sup> )	Log C/C <sub>BFA</sub>	$\epsilon$ (%)	
		Carbaril	o-fenilfenol
50.0	3.70	2.56	-1.45
120.0	4.07	2.36	-1.26
700.0	4.84	2.56	-0.26



**Figura III.3.21.** Interferencia debida a la presencia de warfarina (o), benomil (□), carbaril (x) y o-fenilfenol (Δ).

*Tabla III.3.30. Tolerancia para las especies posibles interferentes.*

Especie	mg·l <sup>-1</sup>	Especie	μg·l <sup>-1</sup>	Especie	μg·l <sup>-1</sup>
CO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	>200	Pb <sup>+2</sup>	>200	Al <sup>+3</sup>	>200
CO <sub>3</sub> H <sup>-</sup>	>200	Cu <sup>+2</sup>	>200	Fe <sup>+3</sup>	>200
SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	>200	Mn <sup>+2</sup>	>200	ClO <sup>-</sup>	0.80
SO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	>200	Cd <sup>+2</sup>	>200	Dicloné	>100
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	>10	Zn <sup>+2</sup>	>200	Morestan	>260
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	>10	Hg <sup>+2</sup>	>200	Bentazona	>1.0 mg·l <sup>-1</sup>
PO <sub>4</sub> <sup>-3</sup>	>200	Be <sup>+2</sup>	>200	Warfarina	>2.0 mg·l <sup>-1</sup>
SiO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	>200	Mg <sup>+2</sup>	>200	Benomil	>4.0 mg·l <sup>-1</sup>
Cl <sup>-</sup>	>200	Ca <sup>+2</sup>	>200	Carbaril	>120 mg·l <sup>-1</sup>
Br <sup>-</sup>	>200	Cr <sup>+3</sup>	>200	o-fenilfenol	>700 mg·l <sup>-1</sup>

Según los datos mostrados en la tabla podemos establecer que:

*No interfieren* a concentraciones suficientemente elevadas las especies catiónicas y aniónicas, ni los pesticidas ensayados.

Destaca sin embargo la *baja tolerancia* mostrada para el *ion hipoclorito* el cual a concentraciones muy bajas ejerce una gran interferencia negativa en la determinación de bisfenol A. Este hecho nos impidió aplicar el método propuesto a la determinación de bisfenol A en agua potable, pues los niveles habituales de ClO<sup>-</sup> en este medio son considerablemente superiores al nivel de tolerancia establecido. Este hecho será objeto de estudios posteriores.

### 3.5. Aplicaciones y validación del método.

El método analítico propuesto para la determinación de bisfenol A por espectrofluorimetría derivada en presencia de fenol previa microextracción líquido-líquido se aplicó a muestras de agua de distinta procedencia -pozo, mar y río-

En todos los casos la metodología empleada fue el calibrado por adición de patrón y estudio de recuperación en un volumen de muestra de 250 ml.

### 3.5.1. Resolución de mezclas sintéticas.

El método propuesto fue aplicado a la determinación de bisfenol A en numerosas muestras sintéticas que contenían bisfenol A y fenol en diferentes proporciones para un volumen de fase acuosa de 250 ml. Para ello en una serie de matraces aforados, se introdujeron cantidades crecientes de bisfenol A y fenol en las relaciones que se indican en la tabla III.3.31. Tras aplicar el procedimiento propuesto, se determinó la concentración de bisfenol A por interpolación en la función de calibrado con patrones correspondiente a este volumen y se compararon los resultados con las concentraciones iniciales de bisfenol A añadidas. En la tabla III.3.31 se muestran los resultados obtenidos.

*Tabla III.3.31. Determinación de bisfenol A en presencia de fenol.*

[BFA]/[fenol]	[BFA] $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	[fenol] $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	% R (BFA) *	DSR (%)
<b>1:2</b>	2.0	4.0	103.2	1.5
<b>1:4</b>	2.0	8.0	103.6	0.8
<b>1:8</b>	2.0	16.0	97.5	1.3
<b>1:1</b>	4.0	4.0	102.0	0.5
<b>1:2</b>	4.0	8.0	98.0	0.3
<b>1:4</b>	4.0	16.0	97.3	0.9
<b>2:1</b>	8.0	4.0	103.9	1.1
<b>1:1</b>	8.0	8.0	96.1	1.2
<b>1:2</b>	8.0	16.0	100.2	1.4

\* Promedio de tres determinaciones.

En todos los casos, se observa que el porcentaje de recuperación del bisfenol A es cercano al 100 % independientemente de la cantidad de fenol adicionada.

### 3.5.2. Calibrados con adición de patrón.

Como método analítico de trabajo se ha empleado la función de calibrado con adición de patrón. Para llevar a cabo este calibrado, en matraces aforados de 250 ml de capacidad se prepararon tres series de disoluciones de concentración creciente de bisfenol A en agua de pozo, río y mar, de forma que las concentraciones finales fueron 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 8.0  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . A continuación se transvasaron estas disoluciones a embudos de decantación de 250 ml de capacidad y tras disolver 75 g de cloruro sódico, se extrajeron con 2.5 ml de éter etílico agitando mecánicamente a 1700 r.p.m. durante un minuto a temperatura ambiente. A continuación se registraron los espectros de excitación en el intervalo de longitudes de onda comprendido entre 245 y 290 nm fijando como  $\lambda_{\text{em}}$  305 nm, rendijas de excitación y emisión 5 nm, velocidad de barrido 240 nm/minuto y temperatura en  $10.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . Finalmente se calcularon los espectros derivados de orden 1 con un factor de filtrado de 12 y se midió la señal a  $\lambda$  de 239 nm.

Se realizó el ajuste por mínimos cuadrados de los datos obtenidos y se seleccionaron los parámetros estadísticos mostrados en la tabla III.3.32.

*Tabla III.3.32. Parámetros de los calibrados con adición de patrón.*

$C_P (\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	Pozo	Mar	Río
<b>n</b>	5	5	5
<b>b (<math>\text{l}\cdot\mu\text{g}^{-1}</math>)</b>	$136,2 \pm 4.0$	$130.1 \pm 2.3$	$136.9 \pm 2.8$
<b><math>s_b</math> (<math>\text{l}\cdot\mu\text{g}^{-1}</math>)</b>	1.251	0.725	0.895
<b>a</b>	$16.3 \pm 0.8$	$12.6 \pm 2.1$	$14.1 \pm 1.3$
<b><math>s_a</math></b>	0.256	0.658	0.422
<b><math>s_{\text{RC}}</math></b>	4.25	3.28	6.25
<b><math>r^2</math> (%)</b>	99,7	99,4	99,8

### 3.5.3. Comparación de los calibrados con patrones y adición de patrón.

Para comprobar la exactitud del método analítico se llevó a cabo un estudio de comparación de las dos rectas de regresión obtenidas mediante el calibrado con patrones y con adición de patrón siguiendo la metodología ya desarrollada en el capítulo II.

En primer lugar se realizó el test de comparación de las varianzas de ambos calibrados, para ello el F calculado se comparó con el tabulado para un nivel de significación del 5% y 16 y 3 grados de libertad respectivamente. Las conclusiones obtenidas son mostradas en la tabla III.3.33.

*Tabla III.3.33. Comparación de varianzas.*

Muestra	F <sub>cal</sub>	F <sub>tab</sub>	Conclusión
Pozo	1.710	8.73	H <sub>0</sub>
Mar	2.87	8.73	H <sub>0</sub>
Río	1.263	8.73	H <sub>0</sub>

En todos los casos se concluye por la hipótesis nula, es decir, no existe diferencia significativa entre las varianzas de ambos calibrados para el nivel de significación elegido ya que  $F_{cal} < F_{tab}$ .

Una vez comparadas las varianzas se aplica el test de *t-Student* correspondiente al supuesto de que no existe diferencia significativa entre las varianzas de ambos calibrados, para la comparación de las pendientes y las ordenadas en el origen. Los valores de t calculados se comparan con el valor de t tabulado con un nivel de significación del 5% y 17 grados de libertad para las ordenadas y 16 para las pendientes. En la tabla III.3.34 se muestran las conclusiones obtenidas.

*Tabla III.3.34. Comparación de pendientes y ordenadas en el origen.*

Muestra	Pendiente			Ordenada en el origen		
Muestra	$t_{cal}$	$t_{tab}$	Conclusión	$t_{cal}$	$t_{tab}$	Conclusión
Pozo	0.127	2.120	H <sub>0</sub>	0.488	2.110	H <sub>0</sub>
Mar	1.657	2.120	H <sub>0</sub>	0.294	2.110	H <sub>0</sub>
Río	0.165	2.120	H <sub>0</sub>	0.252	2.110	H <sub>0</sub>

En los tres casos se concluye por la hipótesis nula, es decir, no existen diferencias significativas entre las pendientes y las ordenadas en el origen de las rectas de calibrado con patrones y adición de patrón, ya que en todos los casos se cumple que  $t_{cal} < t_{tab}$  para el nivel de significación del 5%, por tanto se puede concluir que las rectas de calibrado con patrones y adición de patrón son iguales en todos los casos.

#### 3.5.4. Ensayos de recuperación.

Se llevó a cabo un estudio de recuperación en muestras de agua de distinta procedencia (pozo, río y mar) a las que se adicionó una cierta cantidad de bisfenol A, con objeto de comprobar la exactitud del método propuesto para la determinación de bisfenol A en presencia de fenol. Se aplicó el procedimiento operatorio y se determinó la concentración de bisfenol A en cada una de las muestras. Finalmente se calcularon los correspondientes porcentajes de recuperación. En la tabla III.3.35 se recogen los resultados obtenidos.

*Tabla III.3.35. Estudio de recuperación en muestras dopadas.*

Muestra	[BFA] $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	[Fenol] $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	% R(BFA)*	DSR (%)
<b>Pozo</b>	1.0	8.0	93.0	1.2
	4.0		103.0	0.3
	8.0		97.9	0.9
<b>Mar</b>	1.0	8.0	112.0	1.1
	4.0		97.7	1.7
	8.0		101.1	0.5
<b>Río</b>	1.0	8.0	105.0	1.2
	4.0		101.5	1.5
	8.0		98.6	0.8

\* Promedio de tres determinaciones.

Se observa que el error cometido en las determinaciones no supera en ningún caso el 5%, por tanto se puede afirmar que el método analítico propuesto para la determinación de bisfenol A en aguas de distinta procedencia mediante espectrofluorimetría derivada previa microextracción líquido-líquido con éter etílico es exacto.

#### **4. DETERMINACIÓN ESPECTROFLUORIMÉTRICA DE TRAZAS DE FENOL, BISFENOL A, Y BISFENOL A DIGLICIDIL ÉTER EN MEZCLAS, PREVIA MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO, HACIENDO USO DE CALIBRACION MULTIVARIANTE (PLS).**

En este apartado se plantea la resolución de la mezcla ternaria constituida por fenol, bisfenol A y bisfenol A diglicidiléter (BADGE), previa microextracción líquido-líquido con éter etílico y empleando un modelo de calibración multivariante basado en el algoritmo de mínimos cuadrados parciales (PLS). El método ha sido aplicado a la determinación de estos compuestos en aguas de distinta procedencia -pozo, río y mar-

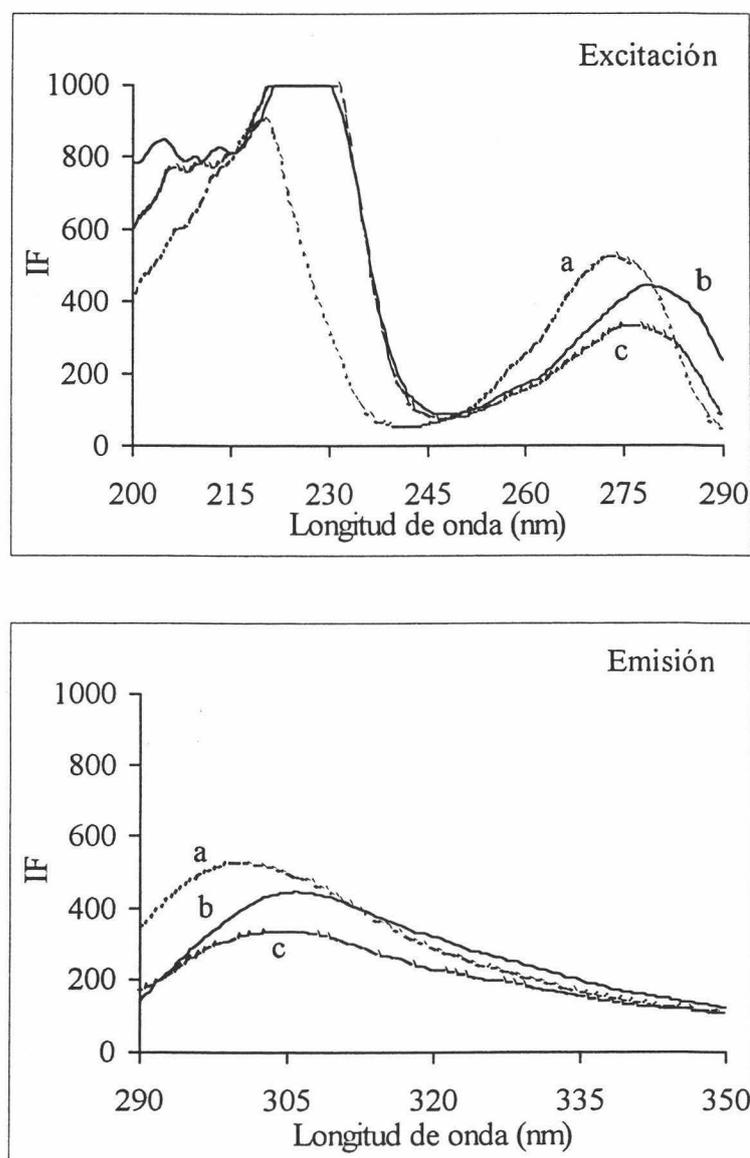
Considerando en el alto rendimiento de fluorescencia que presentan fenol, bisfenol A y BADGE en éter etílico, como se recoge en la introducción de este capítulo, se propuso un método para el análisis simultáneo de los tres compuestos empleando medidas de fluorescencia.

##### **4.1. Comportamiento fluorescente de fenol, bisfenol A y bisfenol A diglicidil éter en éter etílico. Establecimiento de los parámetros instrumentales.**

El paso previo para abordar la resolución de la mezcla de los tres compuestos, fue el estudio individual del comportamiento fluorescente y extractante de cada uno de ellos. En el apartado anterior se mostraron los espectros de excitación y emisión correspondientes tanto a bisfenol A como fenol. En este apartado, se muestran los espectros excitación y emisión fluorescentes de fenol, bisfenol A y BADGE y se comparan entre sí.

Para registrar los espectros luminiscentes de los tres compuestos, se prepararon disoluciones de fenol, bisfenol A y BADGE en éter etílico de  $2.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  en cada uno de los compuestos. A continuación se registraron los espectros de excitación y emisión en los rangos 200 a 290 nm y 290 a 350 nm respectivamente, fijando como longitudes de onda de excitación 273, 278 y 276 nm y de emisión 302, 305 y 304 nm para fenol, bisfenol A y BADGE respectivamente. Se emplearon las mismas variables

instrumentales utilizadas a lo largo del apartado III.3, es decir, rendijas de excitación y emisión de 5 nm, velocidad de barrido 240 nm/min y temperatura  $10.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ . En la figura III.4.1 se muestran los espectros correspondientes a los tres compuestos.



**Figura III.4.1.** Espectros de excitación y emisión de fenol (a), bisfenol A (b) y BADGE (c) en éter etílico.

La resolución de la mezcla formada por los tres compuestos no se puede abordar mediante medidas de fluorescencia directa, ya que como se observa en la figura III.4.1, los espectros tanto de excitación como de emisión correspondientes a los tres

compuestos presentan longitudes de onda máximas muy próximas entre sí y además son muy similares en su forma. -Cada compuesto presenta dos máximos de excitación en la región 219 a 225 nm y 273-278 nm y un único máximo de emisión comprendido entre 302 y 305 nm. Se observó además que en la zona del espectro comprendida entre 200 y 245 nm, el detector se saturaba incluso a bajas concentraciones de los compuestos, hecho que ocasionaba un acortamiento notable en el intervalo dinámico lineal y por tanto se eliminó esta zona del espectro para la aplicación del modelo PLS. Así mismo, con objeto de favorecer al BADGE, compuesto que presenta la menor sensibilidad, se seleccionaron como longitudes de onda de medida 274 y 304 nm en excitación y emisión respectivamente, para la obtención de los espectros correspondientes a la mezcla de los tres componentes.

#### **4.2. Optimización de variables experimentales.**

El estudio realizado en el apartado III.3 acerca del comportamiento del bisfenol A en función de las distintas variables experimentales se amplía aquí para fenol y BADGE, con el fin de encontrar unas condiciones óptimas que permitan la determinación simultánea de los tres compuestos.

De las variables experimentales consideradas en el apartado anterior se pueden distinguir entre aquellas controladas por factores externos a la naturaleza del compuesto como son: el volumen de disolvente y tipo de agitador empleados en el procedimiento de microextracción líquido-líquido con éter etílico; así como el tiempo de separación de fases tras la microextracción o la influencia de la temperatura del sistema, y otras variables como la velocidad de agitación, tiempo de agitación o pH del medio, que si deben ser optimizadas nuevamente, ya que el comportamiento de cada uno de los compuestos puede ser diferente.

Es importante destacar que en el desarrollo experimental llevado a cabo en este apartado, se empleó siempre un volumen de muestra de 100 ml, ya que el empleo de volúmenes mayores produce un aumento en la sensibilidad de los tres componentes de la mezcla que conduce a un acortamiento excesivo de los rangos de trabajo.

#### 4.2.1. Estudio del procedimiento de microextracción líquido-líquido.

A continuación se estudia la influencia de las variables asociadas al procedimiento de microextracción líquido-líquido para los tres compuestos.

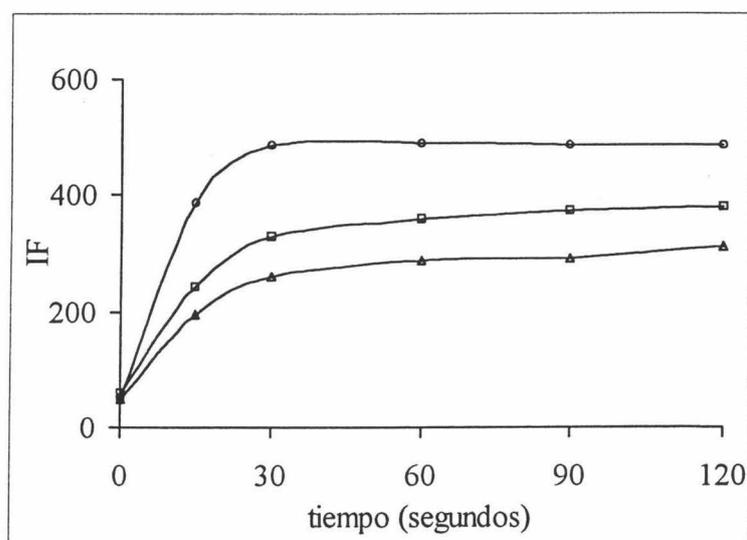
##### 4.2.1.1. Influencia del tiempo de agitación

Para estudiar este parámetro, en tres series de matraces aforados de 100 ml de capacidad se prepararon disoluciones acuosas de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de concentración de los compuestos por separado. A continuación se trasvasaron a embudos de decantación de 100 ml de capacidad y, tras disolver 30 g de ClNa, se extrajeron con 1.5 ml de éter etílico, agitando mecánicamente a 1700 r.p.m. durante tiempos crecientes y a temperatura ambiente. Finalmente se registraron los espectros de excitación y emisión fluorescente de las fases orgánicas recogidas en los intervalos de longitudes de onda comprendidos entre 200 y 290 nm para la excitación y 290 y 350 nm para la emisión, fijando como longitudes de onda de excitación 273, 278 y 276 nm en excitación y 302, 305 y 304 nm en emisión para fenol, bisfenol A y BADGE respectivamente. Las rendijas empleadas fueron de 5 nm tanto para la excitación como para la emisión, con velocidad de barrido 240 nm/minuto y temperatura  $10.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ .

En la tabla III.4.1 y figura III.4.2 se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla III.4.1. Influencia del tiempo de agitación.**

Tiempo (segundos)	IF		
	Fenol	Bisfenol A	BADGE
0	57.37	50.23	48.70
15	242.87	386.03	195.53
30	330.68	486.05	259.82
60	359.99	490.28	289.12
90	372.85	486.70	292.89
120	381.64	487.96	310.44



**Figura III.4.2.** Influencia del tiempo de agitación.  
fenol (□), bisfenol A (○) y BADGE (△).

Se observa que la señal fluorescente aumenta al incrementarse el tiempo de agitación hasta alcanzar el valor máximo a 30 s para el bisfenol A y 60 s para los otros dos compuestos. A partir de estos tiempos, la señal se mantiene prácticamente constante. Se seleccionó por tanto 60 segundos como tiempo de agitación de la muestra para la extracción simultánea de los tres compuestos.

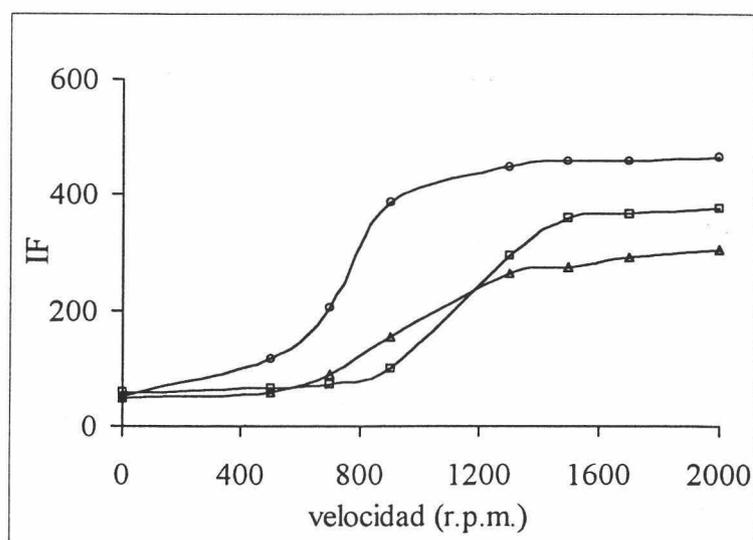
#### 4.2.1.2. Influencia de la velocidad de agitación.

Con objeto de estudiar esta variable se realizó una experiencia análoga a la anterior pero modificando en este caso la velocidad de agitación de la muestra en el rango comprendido entre 0 y 2000 r.p.m. y fijando el tiempo de agitación en 1 minuto.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla III.4.2 y se representan en la figura III.4.3.

*Tabla III.4.2. Influencia de la velocidad de agitación.*

Velocidad r.p.m.	IF		
	Fenol	Bisfenol A	BADGE
0	57.03	50.26	49.32
500	66.32	117.53	58.92
700	73.47	206.26	90.48
900	100.78	388.76	155.50
1300	295.31	447.83	215.37
1500	359.99	457.76	273.46
1700	368.41	460.35	290.19
2000	375.86	466.30	303.98

*Figura III.4.3. Influencia de la velocidad de agitación. fenol (□), bisfenol A (○) y BADGE (Δ).*

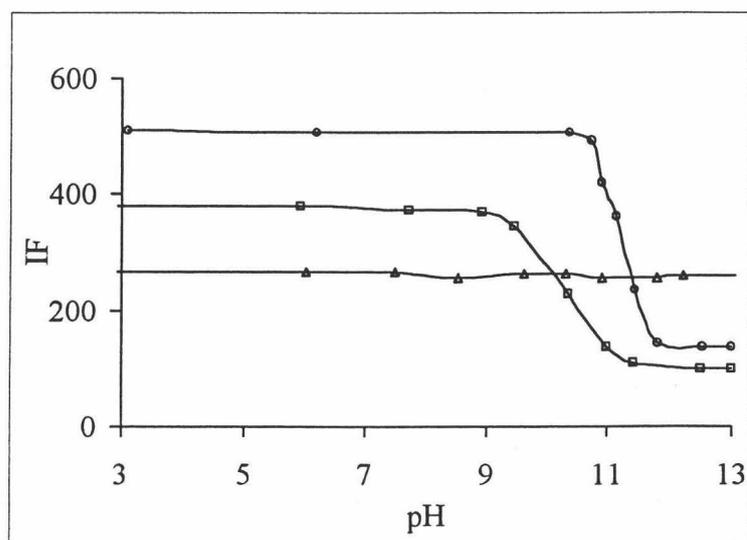
Se observa que los tres compuestos presentan un comportamiento similar al modificarse la velocidad de agitación del sistema. La intensidad de fluorescencia crece al aumentar la velocidad de agitación hasta alcanzar un valor máximo a 1300 r.p.m. para bisfenol A, y aproximadamente a 1500 r.p.m. para los otros dos compuestos. A partir de estos valores se mantiene prácticamente constante para valores superiores de la velocidad de agitación. Se seleccionó por tanto 1500 r.p.m. como velocidad óptima para la realización de experiencias posteriores.

#### 4.2.2. *Influencia del pH del medio.*

Se estudió así mismo la influencia que el pH del medio ejerce sobre la señal fluorescente medida y en consecuencia sobre el proceso de extracción de los tres compuestos. Para ello se prepararon tres series de disoluciones en matraces aforados de 100 ml de capacidad en las que se introdujo 1 ml de disolución acuosa de fenol, bisfenol A o BADGE de concentración  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  respectivamente. Se añadió agua desionizada hasta un volumen cercano al final y con HCl e NaOH de distintas concentraciones se fijó el pH deseado. A continuación se enrasaron las disoluciones y, tras repetir la medida del pH, se trasvasaron a embudos de decantación de 100 ml donde se adicionaron 30 g de ClNa y se extrajeron con 1.5 ml de éter etílico, agitando mecánicamente durante 1 minuto a 1500 r.p.m. y a temperatura ambiente. Tras separar las fases durante 1 minuto, se transfirió la fase orgánica a la cubeta de medida con ayuda de una pipeta Pasteur. Finalmente se registraron los espectros de excitación y emisión fluorescente fijando las condiciones instrumentales habituales y las longitudes de onda óptimas para cada compuesto. Los resultados se muestran en la tabla III.4.3 y se representan en la figura III.4.4.

*Tabla III.4.3. Influencia del pH del medio.*

<b>pH</b>	<b>Fenol</b>	<b>pH</b>	<b>Bisfenol A</b>	<b>pH</b>	<b>BADGE</b>
<b>2.83</b>	381.04	<b>3.10</b>	511.70	<b>2.93</b>	268.66
<b>5.93</b>	379.36	<b>6.21</b>	507.50	<b>6.05</b>	269.01
<b>7.73</b>	375.04	<b>10.38</b>	506.59	<b>7.50</b>	267.03
<b>8.95</b>	370.92	<b>10.74</b>	492.24	<b>8.55</b>	258.16
<b>9.46</b>	345.84	<b>10.93</b>	422.39	<b>9.62</b>	262.80
<b>10.37</b>	228.46	<b>11.15</b>	362.13	<b>10.34</b>	263.45
<b>10.98</b>	136.97	<b>11.46</b>	236.24	<b>10.93</b>	255.89
<b>11.43</b>	110.08	<b>11.80</b>	143.06	<b>11.80</b>	255.77
<b>12.50</b>	100.26	<b>12.53</b>	138.83	<b>12.25</b>	261.38
<b>13.00</b>	99.55	<b>13.01</b>	138.56	<b>13.0</b>	263.25



**Figura III.4.4.** Influencia del pH.  
fenol (□), bisfenol A (○) y BADGE (△).

Se observa que la intensidad de fluorescencia emitida por el BADGE permanece constante a lo largo de todo el intervalo de pH estudiado. Por su parte fenol y bisfenol A muestran una señal constante hasta valores de pH próximos a 9 y 10 respectivamente, mientras que para valores pH superiores disminuye rápidamente haciéndose casi despreciable. Se puede concluir por tanto que es la forma protonada de estos compuestos la que se extrae en éter etílico y muestra señal fluorescente, no haciéndolo la forma disociada. En el caso del diglicidil éter la ausencia de  $H^+$  disociables hace que el pH del medio no afecte al proceso de extracción. El amplio intervalo de pH en el que permanece constante la intensidad de fluorescencia emitida por los tres compuestos determina que no sea necesario fijar el pH del medio.

#### 4.3. Parámetros analíticos.

El método de calibración seleccionado para la resolución de la mezcla de los tres compuestos es el de regresión multivariante por mínimos cuadrados parciales (PLS). De forma análoga a los métodos de regresión univariante, buscamos la relación que liga a la variable independiente *-matriz de concentraciones-* con la variable *dependiente -matriz de intensidades de fluorescencia-*. Una vez conocida dicha relación *-etapa de calibración-*, la

empleamos en la predicción de las concentraciones de cualquiera de los tres compuestos en muestras reales de las cuales sólo se posee el espectro de fluorescencia –etapa de predicción-

#### 4.3.1. *Verificación de la linealidad.*

Dado que una de las premisas establecidas para la aplicación de este tipo de calibración es la existencia de linealidad entre las variables estudiadas, antes de abordar la resolución de la mezcla se establecieron, en primer lugar, los rangos en los que existe relación lineal entre la variable dependiente, concentración de cada compuesto, y la variable independiente, intensidad de fluorescencia, de forma individual para cada uno de los componentes de la mezcla.

Para ello, en matraces aforados de 100 ml de capacidad, se prepararon tres series de disoluciones, en las que se introdujeron volúmenes crecientes de disolución acuosa de  $1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de cada uno de los tres compuestos con objeto de obtener concentraciones finales comprendidas en los rangos  $1.0$  a  $32.0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ,  $1.0$  a  $20.0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  y  $1.0$  a  $60.0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para fenol, bisfenol A y BADGE respectivamente. A continuación se transvasaron a embudos de decantación de 100 ml de capacidad y se extrajeron siguiendo el procedimiento operatorio descrito con anterioridad. Finalmente se registraron los espectros de excitación y emisión correspondientes fijando las condiciones instrumentales empleadas a lo largo de este apartado. Se realizaron tres réplicas experimentales de cada concentración y se midieron además los blancos correspondientes.

Los resultados obtenidos son representados en la figura III.4.5. Así mismo, se muestran los parámetros obtenidos para cada uno de los tres calibrados con su correspondiente intervalo de incertidumbre.

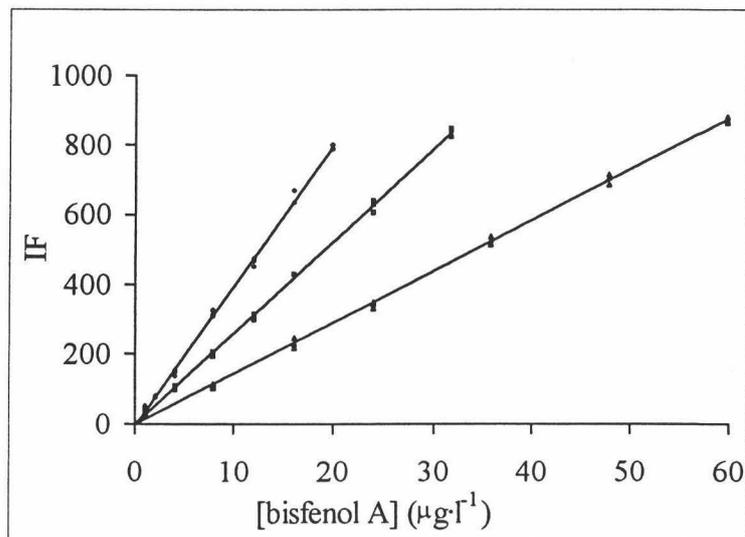


Figura III.4.5. Funciones de calibrado. fenol (□), bisfenol A (o) y BADGE (Δ).

Tabla III.4.4. Parámetros del calibrado de cada componente.

	Fenol	Bisfenol A	BADGE
<b>n</b>	21	21	21
<b>Rango lineal (µg·l<sup>-1</sup>)</b>	1.0 – 32.0	1.0 – 20.0	1.0 - 60.0
<b>a</b>	0.31±0.84	-2.71±0.44	0.14±0.29
<b>s<sub>a</sub></b>	0.403	0.212	0.426
<b>b (l·µg<sup>-1</sup>)</b>	26.08±0.49	39.69±0.86	14.53±0.26
<b>s<sub>b</sub> (l·µg<sup>-1</sup>)</b>	0.234	0.412	0.125
<b>r<sup>2</sup> (%)</b>	99.85	99.79	99.86
<b>s<sub>RC</sub></b>	11.01	12.74	11.45
<b>P<sub>lof</sub> (%)</b>	17.22	11.22	19.25

4.3.2. Establecimiento de la matriz de calibración.

El primer paso en la aplicación del método de calibración multivariante PLS es la obtención de la matriz de calibración, a partir de un conjunto de patrones que son mezcla de los compuestos puros.

Para ello siguiendo el procedimiento operatorio habitual, en matraces aforados de 100 ml de capacidad se prepararon disoluciones patrón individuales, binarias y ternarias de los compuestos con concentraciones comprendidas dentro de los rangos de linealidad determinados en el apartado anterior y elegidas al azar, fijando como única condición que la suma de las señales emitidas por cada uno de los constituyentes de la mezcla no supere el valor de 1000 fijado por el instrumento de medida. El objetivo de este diseño fue seleccionar las concentraciones de los compuestos en los patrones para obtener un alto nivel de variabilidad<sup>29</sup>. En la tabla III.4.5 se muestra la composición seleccionada para esta matriz de calibración y en la figura III.4.6 se representa su distribución espacial.

*Tabla III.4.5. Matriz de calibrado.*

Patrón	[Compuesto] ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )			Patrón	[Compuesto] ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )		
	Fenol	Bisfenol A	BADGE		Fenol	Bisfenol A	BADGE
1	0	0	0	11	3	12	0
2	0	4	0	12	8	0	30
3	0	13	0	13	15	0	25
4	6	0	0	14	5	3	16
5	16	0	0	15	10	4	5
6	0	0	9	16	9	5	20
7	0	0	20	17	8	8	8
8	0	10	22	18	4	10	14
9	0	10	15	19	4	11	10
10	18	7	0	20	---	---	---

<sup>29</sup> User Guide PLSplus for GRAMS/386, *Galactic Industries*, Salem, NH, (1993).

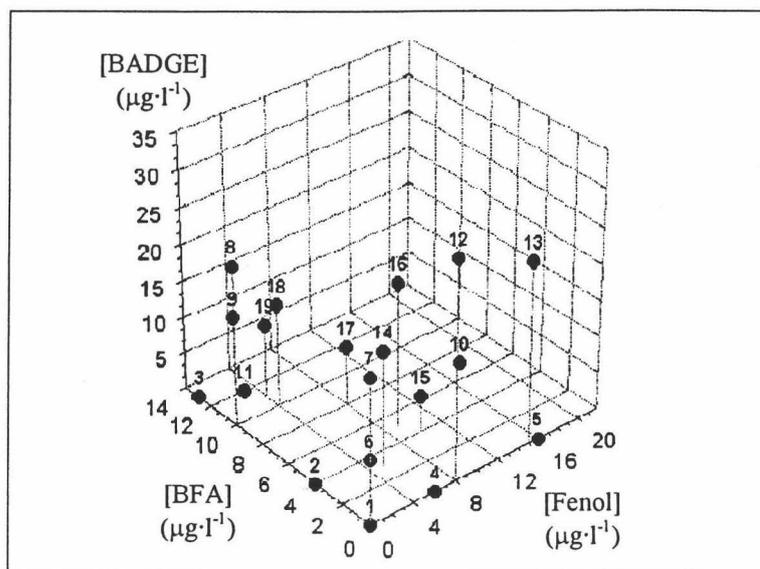


Figura III.4.6. Representación en 3D.

Las 19 disoluciones preparadas según el diseño establecido se extrajeron con 1.5 ml éter etílico siguiendo el procedimiento habitual y se registraron los espectros de excitación y emisión fluorescente en los rangos del espectro comprendidos entre 245 y 290 nm para excitación y 290 a 350 nm para emisión fijando las siguientes condiciones instrumentales:  $\lambda_{exc}=276$  nm,  $\lambda_{em}=304$  nm con objeto de favorecer al compuesto de menor sensibilidad, es decir BADGE, rendijas de excitación y emisión 5 nm respectivamente, velocidad de barrido 240 nm/min y temperatura  $10.0 \pm 0.5$  °C.

#### 4.3.3. Selección del modelo de calibración.

Con objeto de establecer el modelo de calibración, se evaluó el algoritmo PLS en sus modalidades PLS-1 y PLS-2 haciendo uso tanto de los espectros de excitación como los de emisión registrados para cada uno de las muestras que constituyen la matriz de calibración.

Los espectros de emisión no proporcionaron resultados adecuados con ninguno de los dos algoritmos ensayados. Sin embargo, cuando se emplearon los espectros de

excitación en el rango del espectro comprendido entre 245 y 290, que contiene 91 puntos experimentales, ambos algoritmos dieron resultados adecuados.

Una vez seleccionados los espectros de excitación y con objeto de mejorar los parámetros estadísticos del modelo, se ensayaron distintos algoritmos para el tratamiento previo de los datos espectrales: datos sin tratar, datos centrados respecto de la media y datos autoescalados y centrados respecto de la media. Los datos así tratados se emplearon para establecer modelos de calibración haciendo uso de PLS-1 y PLS-2 con objeto de comparar los valores de los parámetros estadísticos obtenidos en cada caso y relacionados con la calidad en el ajuste del modelo.

Para la selección del número de factores, se siguió el criterio de Haland y Thomas ya desarrollado en el capítulo II, según el cual el número máximo de factores seleccionados para el cálculo del PRESS (prediction sum of squares) fue 10 (mitad del número de muestras patrón más uno).

En la tabla III.4.6 se recogen los resultados obtenidos en cada caso así como el número de factores seleccionados según el criterio de Haland y Thomas.

*Tabla III.4.6. Parámetros estadísticos obtenidos para PLS-1 y PLS-2.*

*	Parámetro	PLS-1			PLS-2		
		BFA	Fenol	BADGE	BFA	Fenol	BADGE
(1)	Factores	4	5	3	4	4	4
	RMSD	0.337	0.415	2.599	0.344	0.336	1.194
	r <sup>2</sup> (%)	0.995	0.995	0.952	0.995	0.997	0.986
(2)	Factores	5	3	6	8	8	8
	RMSD	0.216	0.328	0.417	0.223	0.395	0.419
	r <sup>2</sup> (%)	0.998	0.997	0.998	0.998	0.995	0.998
(3)	Factores	5	7	4	5	5	5
	RMSD	0.192	0.363	0.526	0.232	0.425	0.479
	r <sup>2</sup> (%)	0.998	0.996	0.997	0.998	0.995	0.998

\* *Pretratamiento de datos: (1) Datos sin tratar, (2) Datos centrados con respecto de la media y (3) Datos autoescalados y centrados respecto de la media.*

Se observa que los valores obtenidos referidos a RMSD y  $r^2$  son similares en ambos algoritmos, correspondiendo los mejores resultados a los modelos establecidos haciendo uso de datos centrados respecto de la media. Sin embargo, cuando se aplicó este tratamiento a los datos, el modelo correspondiente a PLS-2 presentó un número de factores muy elevado. Por otra parte, los peores resultados se obtuvieron con datos no tratados, ya que en ambos algoritmos, los valores tanto de RMSD como  $r^2$  fueron muy desfavorables para el BADGE. (comentar algo mas la tabla)

#### 4.3.4. Predicción.

Finalmente se llevó a cabo la etapa de predicción; es decir, se resolvieron una serie de muestras sintéticas de las que sólo se conocía el espectro de fluorescencia.

Dada la similitud mostrada en los parámetros de calidad del método cuando se emplearon ambos algoritmos PLS (1 y 2) con datos centrados respecto de la media, se usaron ambos modelos para la predicción de las muestras.

El procedimiento experimental seguido es el que se describe a continuación: En una serie de matraces aforados de 100 ml de capacidad se prepararon disoluciones acuosas de los tres compuestos, 10 de ellas ternarias, 6 binarias y 6 individuales según las concentraciones indicadas en la tabla III.4.7. A continuación se extrajeron con 1.5 ml de éter etílico siguiendo el procedimiento operatorio habitual, se registraron los espectros de excitación fluorescente de la fase orgánica en el intervalo 245 a 290 nm y se determinaron las concentraciones de cada uno de los compuestos en las mezclas empleando ambos modelos. Finalmente se calcularon los porcentajes de recuperación respecto de las cantidades iniciales puestas en cada muestra ( $R$ ). Los resultados obtenidos son mostrados en las tablas III.4.7 y 8.

Tabla III.4.7. Predicción de muestras sintéticas (PLS-1)

PLS-1	Fenol			Bisfenol A			BADGE		
	*C <sub>0</sub> (μg·l <sup>-1</sup> )	*C <sub>f</sub> (μg·l <sup>-1</sup> )	**R (%)	*C <sub>0</sub> (μg·l <sup>-1</sup> )	*C <sub>f</sub> (μg·l <sup>-1</sup> )	**R (%)	*C <sub>0</sub> (μg·l <sup>-1</sup> )	*C <sub>f</sub> (μg·l <sup>-1</sup> )	**R (%)
1	7.00	7.46	102.0	4.00	4.08	102.0	25.00	23.96	95.8
2	5.0	5.15	103.0	3.0	2.94	98.0	17.00	15.75	92.6
3	6.0	6.92	115.3	6.0	6.44	107.3	10.00	9.86	98.6
4	8.0	8.90	111.3	10.0	11.15	111.5	7.00	6.34	90.8
5	12.00	11.00	91.7	8.0	7.21	90.1	4.00	3.56	89.0
6	10.00	11.13	111.3	5.0	4.92	98.4	15.00	16.40	109.3
7	18.00	18.47	102.6	4.0	4.25	106.3	4.00	4.20	105.0
8	4.00	3.85	96.0	7.0	6.89	98.4	9.00	8.89	98.8
9	3.00	2.64	88.0	10.0	10.24	102.4	14.00	13.62	97.3
10	5.00	4.76	95.2	5.00	4.78	95.6	5.00	5.39	107.8
11	12.00	10.99	91.6	7.00	6.70	95.7	0.00	0.10	---
12	5.00	4.39	87.8	12.00	11.67	97.3	0.00	0.08	---
13	0.00	0.14	---	5.00	4.59	91.8	12.00	11.47	95.6
14	0.00	0.11	---	10.00	9.19	91.9	6.00	5.55	92.5
15	12.00	11.90	99.2	0.00	0.37	---	14.00	14.12	100.9
16	15.00	15.99	106.6	0.00	0.52	---	8.00	8.07	100.9
17	0.00	0.06	---	4.00	4.06	101.5	0.00	1.40	---
18	0.00	0.16	---	12.00	12.02	100.0	0.00	1.36	---
19	6.00	5.84	97.3	0.00	0.04	---	0.00	1.72	---
20	18.00	16.52	91.8	0.00	0.08	---	0.00	1.39	---
21	0.00	0.09	---	0.00	0.23	---	9.00	8.80	97.8
22	0.00	0.03	---	0.00	0.03	---	20.00	19.01	95.5

\* C<sub>0</sub> Concentración puesta, C<sub>f</sub> Concentración encontrada

\*\* Media de tres determinaciones.

Tabla III.4.8. Predicción de muestras sintéticas (PLS-2)

PLS-2	Fenol			Bisfenol A			BADGE		
	*C <sub>0</sub> (μg·l <sup>-1</sup> )	*C <sub>f</sub> (μg·l <sup>-1</sup> )	**R (%)	*C <sub>0</sub> (μg·l <sup>-1</sup> )	*C <sub>f</sub> (μg·l <sup>-1</sup> )	**R (%)	*C <sub>0</sub> (μg·l <sup>-1</sup> )	*C <sub>f</sub> (μg·l <sup>-1</sup> )	**R (%)
1	7.00	6.46	92.3	4.00	4.07	101.8	25.00	23.79	95.2
2	5.0	4.85	97.0	3.0	2.92	97.3	17.00	15.70	92.4
3	6.0	7.01	116.8	6.0	6.42	107.0	10.00	9.80	98.0
4	8.0	8.75	109.4	10.0	11.4	114.0	7.00	6.20	111.4
5	12.00	10.95	91.3	8.0	7.21	90.1	4.00	3.59	89.8
6	10.00	11.20	112.0	5.0	4.90	98.0	15.00	16.36	109.1
7	18.00	18.00	0.00	4.0	4.30	107.5	4.00	4.15	103.8
8	4.00	3.85	96.3	7.0	6.90	98.6	9.00	8.89	98.8
9	3.00	2.64	88.0	10.0	10.24	102.4	14.00	13.62	97.3
10	5.00	4.44	88.8	5.00	4.79	95.8	5.00	5.40	108.0
11	12.00	10.36	86.3	7.00	6.70	95.7	0.00	0.12	---
12	5.00	4.15	83.0	12.00	11.66	97.2	0.00	0.07	---
13	0.00	0.34	---	5.00	4.57	91.4	12.00	11.35	94.6
14	0.00	0.23	---	10.00	9.10	91.0	6.00	5.55	62.5
15	12.00	11.80	98.3	0.00	0.37	---	14.00	14.09	100.6
16	15.00	15.04	100.3	0.00	0.53	---	8.00	8.06	100.8
17	0.00	0.02	---	4.00	4.10	102.5	0.00	1.36	---
18	0.00	0.45	---	12.00	12.00	100.0	0.00	1.34	---
19	6.00	5.63	93.8	0.00	0.04	---	0.00	1.71	---
20	18.00	16.73	92.9	0.00	0.09	---	0.00	1.38	---
21	0.00	0.042	---	0.00	0.24	---	9.00	8.79	97.7
22	0.00	0.020	---	0.00	0.34	---	20.00	18.96	94.8

\*C<sub>0</sub> Concentración puesta, C<sub>f</sub> Concentración encontrada

\*\*Media de tres determinaciones.

Se observa que la capacidad de predicción del algoritmo PLS-1 es mayor que la de PLS-2, ya que en general las recuperaciones están más próximas al 100 % en el primer caso, este hecho, ya descrito en bibliografía, puede ser atribuido al número de factores empleados en la calibración. En el caso de PLS-2, el empleo de un número de factores mayor que en PLS-1 produce probablemente un problema de sobreajuste, modelándose parte del ruido de fondo, y generando mayores errores en las predicciones. Se seleccionó por tanto este último para la aplicación del método a aguas de distinta procedencia.

#### **4.4. Aplicación del método de calibración multivariante PLS-1 a la resolución de mezclas de los tres componentes en aguas de distinta procedencia.**

Se comprobó por último la capacidad de predicción de la matriz de calibrado en matrices reales. Para ello en matraces aforados de 100 ml de capacidad, se introdujeron muestras de agua de pozo, río o mar dopadas con distintas cantidades de los tres compuestos. A continuación se transvasaron a embudos de decantación de 100 ml de capacidad y tras disolver 30 g de ClNa, se extrajeron con 1.5 ml de éter etílico agitando mecánicamente a temperatura ambiente durante 1 minuto a 1500 r.p.m. Tras separar las fases durante 1 minuto, con ayuda del dispositivo diseñado para microextracción líquido-líquido en el caso de disolventes menos densos que el agua, se introdujeron las fases orgánicas en la cubeta de medida y se registraron los correspondientes espectros de excitación fluorescente en el intervalo del espectro comprendido entre 245 y 290 nm fijando las siguientes condiciones instrumentales:  $\lambda_{em} = 305$  nm, rendijas de excitación y emisión 5 nm, velocidad de barrido 240 nm/min y temperatura  $10.0 \pm 0.5$  °C. Finalmente se determinaron las concentraciones de cada uno de los compuestos en las muestras con ayuda del modelo de calibración establecido.

En las tablas III.4.9 a 11 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla III.4.9. Recuperación en agua de pozo.

Mar	Fenol			Bisfenol A			BADGE		
	*C <sub>0</sub> (µg·l <sup>-1</sup> )	*C <sub>f</sub> (µg·l <sup>-1</sup> )	**R (%)	*C <sub>0</sub> (µg·l <sup>-1</sup> )	*C <sub>f</sub> (µg·l <sup>-1</sup> )	**R (%)	*C <sub>0</sub> (µg·l <sup>-1</sup> )	*C <sub>f</sub> (µg·l <sup>-1</sup> )	**R (%)
1	7.00	7.25	103.5	4.00	2.82	70.5	25.00	25.31	101.2
2	5.00	4.87	97.4	3.00	2.41	80.3	17.00	18.42	108.3
3	12.00	11.55	96.3	8.00	7.45	93.1	4.00	3.50	87.5
4	6.00	6.53	108.8	6.00	6.38	106.3	10.00	10.23	102.3
5	8.00	8.36	104.5	10.00	9.70	97.0	7.00	5.75	82.1
6	10.00	10.31	103.1	5.00	4.84	96.8	15.00	15.85	105.6
7	12.00	12.02	100.2	7.00	6.82	97.4	0.00	0.34	---
8	0.00	-0.40	---	5.00	4.97	99.4	12.00	12.23	101.9
9	14.00	14.72	105.1	0.00	-0.32	---	12.00	12.28	102.3
10	0.00	0.27	---	4.00	4.12	103.0	0.00	-0.03	---
11	6.00	6.83	113.8	0.00	-0.07	---	0.00	1.44	---
12	0.00	0.04	---	0.00	-0.07	---	9.00	9.06	100.7

\*C<sub>0</sub> Concentración puesta, C<sub>f</sub> Concentración encontrada

\*\*Media de tres determinaciones.

Tabla III.4.10. Recuperación en agua de río.

Río	Fenol			Bisfenol A			BADGE		
	*C <sub>0</sub> (µg·l <sup>-1</sup> )	*C <sub>f</sub> (µg·l <sup>-1</sup> )	**R (%)	*C <sub>0</sub> (µg·l <sup>-1</sup> )	*C <sub>f</sub> (µg·l <sup>-1</sup> )	**R (%)	*C <sub>0</sub> (µg·l <sup>-1</sup> )	*C <sub>f</sub> (µg·l <sup>-1</sup> )	**R (%)
1	4.00	3.85	96.3	7.00	6.73	96.1	25.00	24.12	96.5
2	3.00	2.69	89.7	5.00	5.34	106.8	17.00	16.98	99.9
3	8.00	7.42	92.7	12.00	11.45	95.4	4.00	4.19	104.8
4	6.00	6.59	109.8	6.00	6.70	111.7	10.00	9.85	98.5
5	10.00	9.92	99.2	8.00	8.08	101.0	7.00	6.24	89.1
6	5.00	4.63	92.6	10.00	9.87	98.7	15.00	14.85	99.0
7	7.00	7.04	100.6	12.00	12.47	103.9	0.00	-0.17	---
8	5.00	5.28	105.6	0.00	0.19	---	12.00	11.16	93.0
9	0.00	-0.41	---	14.00	14.47	104.1	12.00	11.28	94.0
10	4.00	3.69	92.3	0.00	0.05	---	0.00	0.16	---
11	0.00	0.03	---	6.00	5.99	99.8	0.00	0.13	---
12	0.00	0.27	---	0.00	0.35	---	9.00	9.30	103.3

\*C<sub>0</sub> Concentración puesta, C<sub>f</sub> Concentración encontrada

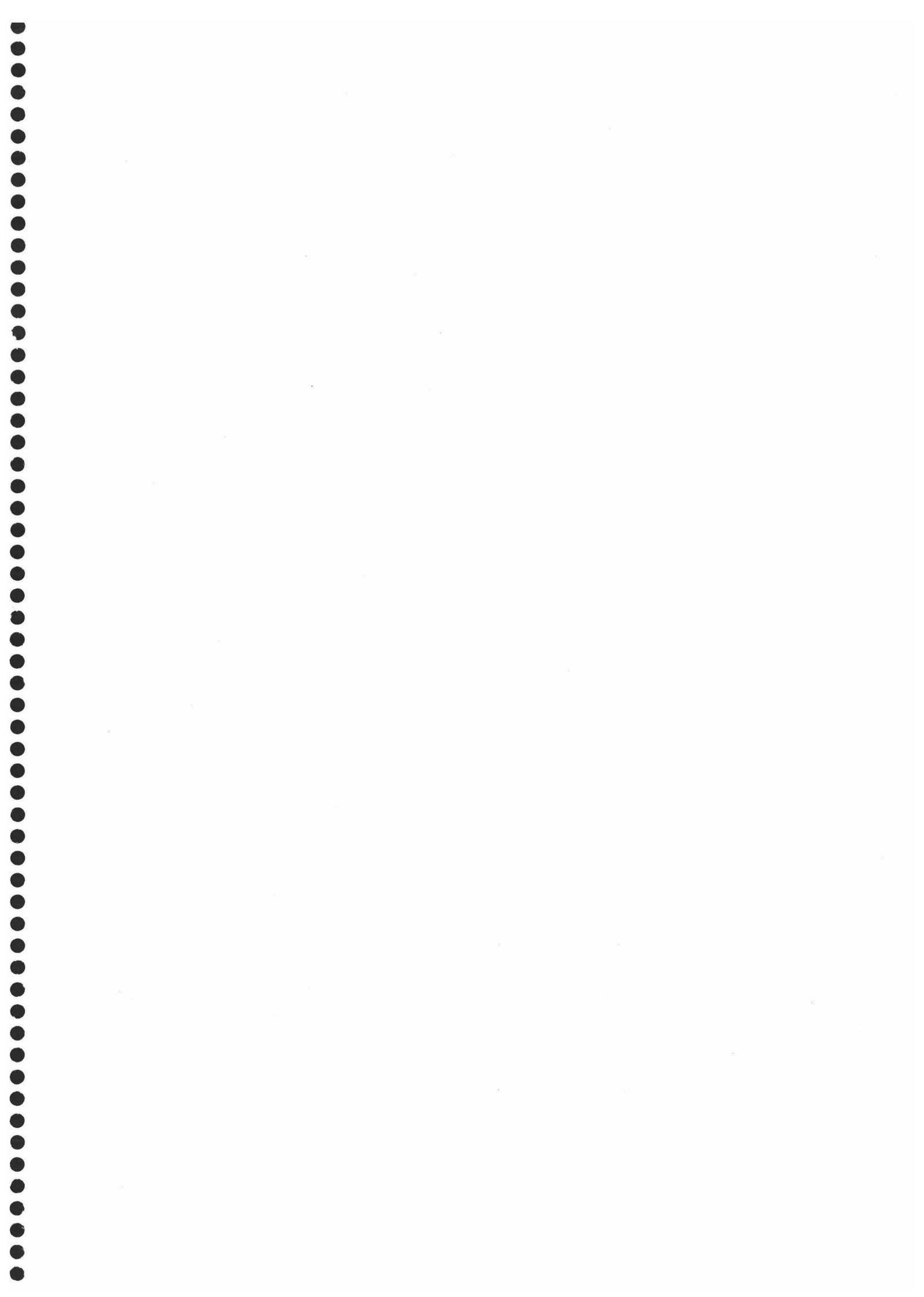
\*\*Media de tres determinaciones.

Tabla III.4.11. Recuperación en agua de mar.

mar	Fenol			Bisfenol A			BADGE		
	*C <sub>0</sub> (µg·l <sup>-1</sup> )	*C <sub>f</sub> (µg·l <sup>-1</sup> )	**R (%)	*C <sub>0</sub> (µg·l <sup>-1</sup> )	*C <sub>f</sub> (µg·l <sup>-1</sup> )	**R (%)	*C <sub>0</sub> (µg·l <sup>-1</sup> )	*C <sub>f</sub> (µg·l <sup>-1</sup> )	**R (%)
1	7.00	7.87	112.2	4.00	4.35	108.8	25.00	25.44	101.8
2	5.00	4.85	97.0	3.00	2.93	97.7	17.00	17.41	102.4
3	12.00	11.72	97.7	8.00	7.81	97.6	4.00	4.49	105.2
4	6.00	6.07	101.2	6.00	6.35	105.8	10.00	10.51	105.1
5	8.00	8.09	101.1	10.00	9.17	91.7	7.00	7.48	106.8
6	10.00	9.34	93.4	5.00	4.56	91.2	15.00	15.86	105.7
7	12.00	12.95	107.9	7.00	7.36	105.1	0.00	0.16	---
8	0.00	-0.25	---	5.00	4.75	95.0	12.00	12.08	100.7
9	14.00	14.37	102.6	0.00	0.09	---	12.00	11.76	98.0
10	0.00	0.15	---	4.00	3.82	95.5	0.00	0.13	---
11	6.00	6.23	103.8	0.00	-0.08	---	0.00	0.04	---
12	0.00	0.06	---	0.00	0.01	---	9.00	9.75	108.3

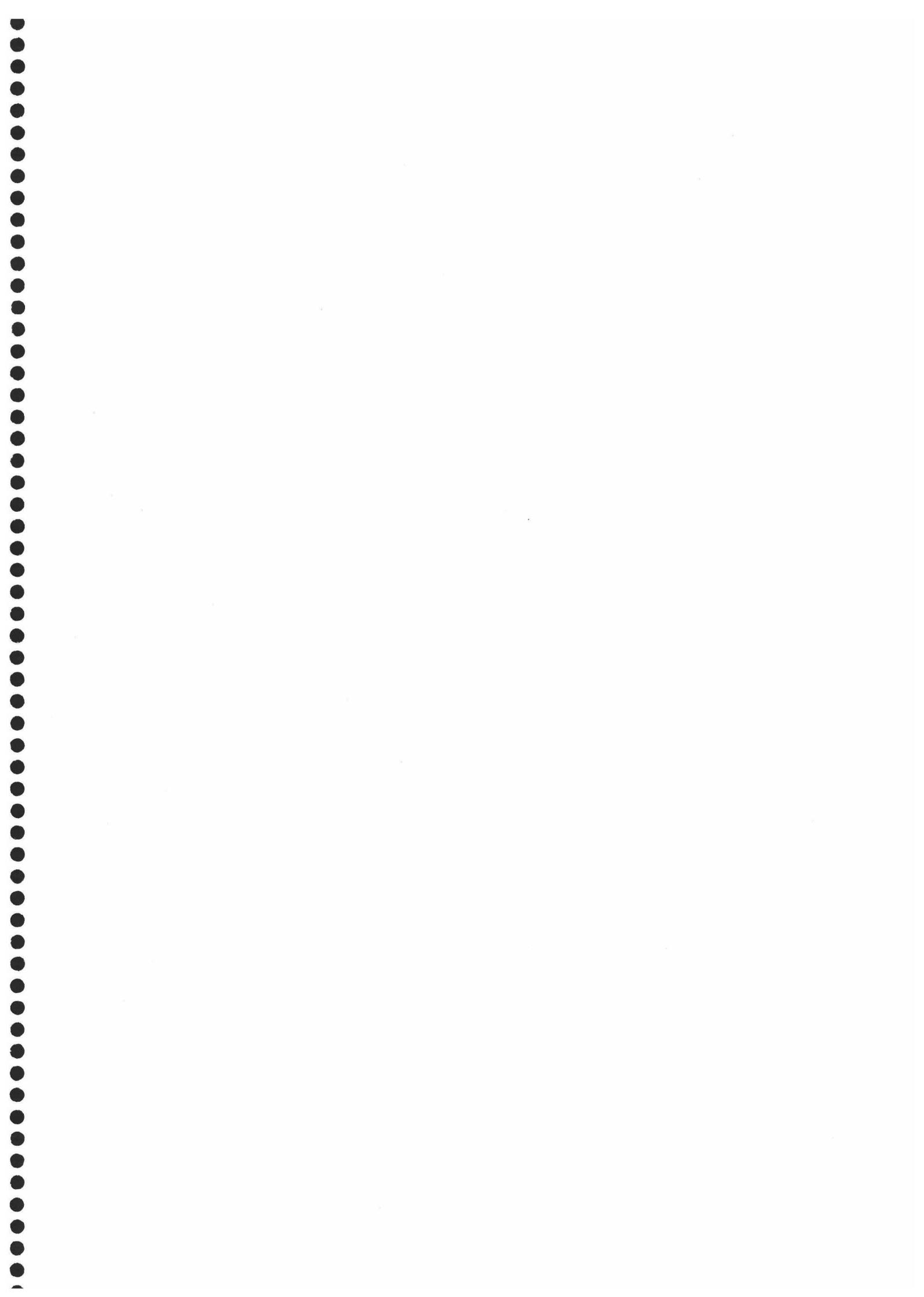
\*C<sub>0</sub> Concentración puesta, C<sub>f</sub> Concentración encontrada  
 \*\*Media de tres determinaciones.

En todos los casos, se pone de manifiesto la buena capacidad del modelo seleccionado para la resolución de mezclas de estos tres componentes en aguas de distinta procedencia, encontrándose porcentajes de recuperación en todos los casos muy cercanos al 100%. El método propuesto es por tanto válido para la determinación conjunta de fenol, bisfenol A y bisfenol A diglicidiléter en las aguas ensayadas.



## **CAPÍTULO IV**

### **APLICACIONES DE LA CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA CON ESPECTROMETRÍA DE MASAS AL ANÁLISIS DE BISFENOLES Y COMPUESTOS RELACIONADOS**



## 1. INTRODUCCIÓN.

La cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas es una técnica de buenas características para el desarrollo de metodología analítica que permita la identificación y determinación tanto de bisfenol A como de algunos compuestos relacionados con él en matrices de diversa naturaleza.

Como se recoge en la introducción de esta Memoria, estos compuestos han sido previamente determinados mediante cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía de gases acoplada con distintos tipos de detectores básicamente en alimentos envasados y conservas alimenticias. Diferentes trabajos realizados por nuestro grupo de investigación, y previos a la realización de esta Memoria demostraron así mismo la posibilidad de determinar bisfenol A en aguas de distinta procedencia tras su microextracción líquido líquido, de forma directa<sup>1</sup> o previa silanización<sup>2</sup>. Se pensó por tanto en la posibilidad de estudiar el comportamiento de bisfenol A así como de alguno de sus compuestos relacionados en matrices complejas como aguas residuales o fluidos biológicos, empleando distintos procedimientos para el tratamiento previo de las muestras y utilizando, en los casos necesarios, reacciones de derivatización con reactivos silanizantes.

Los compuestos considerados para su estudio en este capítulo fueron, además del bisfenol A, los derivados clorados aparecidos por la reacción de éste con el cloro libre presente en el agua de consumo público, bisfenol F, bisfenol A diglicidiléter (BADGE) y bisfenol F diglicidiléter (BFDGE). Estos compuestos son ampliamente empleados para la fabricación de las resinas epoxi y que pueden coexistir en las zonas de descarga de este tipo de contaminantes. Finalmente se determinaron, junto al bisfenol A, el trietilenglicoldimetacrilato (TEGDMA), bisfenol A dimetacrilato (bis-DMA) y bisfenol A diglicidil dimetacrilato (bis-GMA, compuestos empleados como base para la fabricación de los selladores y composites, ampliamente utilizados hoy día en

<sup>1</sup> Del Olmo M., González A., Navas N. and Vilchez J.L. *Analytica Chimica Acta*, **346**, 87, (1997).

<sup>2</sup> González A., Navas N., del Olmo M. and Vilchez J.L. *Journal of Chromatographic Science*, **36**, 565 (1998).

odontología para la recomposición de piezas dentales.

### **1.1. Parámetros instrumentales.**

El empleo de la cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas para el análisis e identificación de compuestos químicos requiere como etapa previa un estudio de las diferentes variables instrumentales, que influyen en la señal analítica de forma que permita una buena separación cromatográfica, una correcta identificación de los picos cromatográficos y una adecuada sensibilidad.

A continuación se resumen las principales variables instrumentales implicadas tanto en la separación cromatográfica como en la detección con el espectrómetro de masas.

#### *1.1.1. Parámetros instrumentales del cromatógrafo de gases.*

Estos pueden ser clasificados a su vez en dos grupos:

##### *1.1.1.1. Parámetros instrumentales que afectan al sistema de inyección.*

###### **A. Flujo de purga del séptum.**

El séptum está fabricado con materiales muy estables, pero no son totalmente inertes al proceso que ocurre en el bloque de inyección, se debe por tanto proteger de la actuación de la muestra volatilizada. Para ello se emplea una fracción de gas portador que circula continuamente en paralelo al séptum y que impide que la muestra volatilizada llegue a contactar con éste produciendo algún producto derivado que pueda ocasionar la aparición de picos fantasma. Este flujo, que depende exclusivamente de la presión en cabeza de columna, se fijó en 3 ml/min para la realización de todas las experiencias.

B. Flujo total de gas portador.

Este es el flujo de gas portador que entra en el cromatógrafo desde el exterior. En esta Memoria se fijó en 100 ml/min.

C. Presión en cabeza de columna.

Es la presión que se ejerce en el inyector, considerado como cabeza de columna. Aunque sea medido en el inyector, la presión en cabeza de columna depende de las dimensiones de la columna (diámetro interno y longitud) e incide de manera notable en la velocidad lineal del gas a través de la columna, que a su vez depende de la resistencia a la penetración del gas y de la diferencia de presión en los extremos de la columna. Para las dimensiones de la columna empleada, el fabricante<sup>3</sup> recomienda una presión en cabeza de columna de 10 psi.

D. Tiempo de purga.

Es el tiempo que transcurre desde que se inyecta la muestra hasta que se purga el disolvente, es decir, el tiempo que se deja para que la muestra vaporizada se preconcentre en la cabeza de la columna. Transcurrido ese tiempo, se purga el vapor de disolvente y muestra contenida en el linear, desviando gran parte del flujo de gas portador al deshecho junto con los restos de muestra vaporizada, mientras que una pequeña parte del gas portador pasa a la columna arrastrando la mayor parte de la muestra que se encontraba preconcentrada en la cabeza de ésta. En esta Memoria, se ha empleado un tiempo de purga de 2 minutos.

E. Temperatura del inyector.

La temperatura del bloque de inyección debe ser lo suficientemente alta para volatilizar los componentes de la muestra. En nuestro caso se emplearon temperaturas de 200 y 300 °C en función de las necesidades.

---

<sup>3</sup> Hewlett Packard, *Users Manual GC 5890 Series II* (1991).

### *1.1.1.2. Parámetros instrumentales que afectan a la separación cromatográfica.*

#### A. Velocidad lineal y flujo volumétrico de gas portador.

El flujo de gas portador utilizado en el cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas debe ser pequeño, ya que las condiciones de vacío extremo que requiere el detector (del orden de  $10^{-6}$  Torr) no son compatibles con un caudal elevado de gas portador. La velocidad lineal y el flujo de gas a través de la columna cromatográfica dependen del flujo total, del flujo de purga del séptum y de la presión en la cabeza de columna. Por otra parte, el detector de masas utilizado no permite un caudal de gas portador superior a 1.5 ml/min.

#### B. Programación de temperaturas.

Se fija la temperatura inicial del horno y se mantiene constante durante un cierto tiempo después de la inyección cromatográfica, con objeto de concentrar los componentes de la muestra en la cabeza de la columna. En esta Memoria y de acuerdo con el tipo de compuestos determinados, se ha empleado una temperatura de 150 °C como temperatura inicial de la columna.

A continuación se programa la temperatura del horno con objeto de lograr una separación de los compuestos con la mayor resolución posible y el mínimo tiempo de análisis. En la tabla IV.1.2 se muestran los gradientes de temperaturas empleados.

Por último, la temperatura final del horno debe ser lo suficientemente elevada para poder volatilizar y eluir al componente menos volátil de la muestra dentro de un tiempo de análisis no muy elevado. En esta Memoria se ha empleado dos temperaturas diferentes, 270 °C y 300°C.

En la tabla se muestran las dos programaciones de temperatura empleadas a lo largo de esta Memoria en función de las necesidades.

*Tabla IV.1.2. Programación de temperaturas del horno cromatográfico.*

	<b>Programación I</b>		<b>Programación II</b>
<b>T<sub>inicial</sub></b>	150 °C	<b>T<sub>inicial</sub></b>	150 °C
<b>Rampa</b>	30 °C/min	<b>1ª Rampa</b>	30 °C/min
<b>T<sub>final</sub></b>	270 °C (estable 7 min.)	<b>T<sub>final</sub></b>	270 °C (estable 7 min)
---	---	<b>2ª Rampa</b>	5 °C/min
---	---	<b>T<sub>final</sub></b>	300 °C (estable 1 min)

Finalmente se debe fijar la temperatura de la interfase situada entre la columna y el detector, y cuya función es introducir los compuestos que salen de la columna en la cámara de ionización del espectrómetro de masas. La interfase empleada es una de las llamadas de entrada directa, ya que todo aquello que sale de la columna cromatográfica entra en el detector. En esta Memoria la temperatura de la interfase se ha mantenido en aproximadamente 280 °C.

### *1.1.2. Parámetros instrumentales del espectrómetro de masas*

El espectro de masas, nos permite dos modos diferentes de trabajo. A continuación se comentan brevemente los parámetros que controlan ambos modos.

#### *1.1.2.1. Análisis en modo SCAN*

El modo Scan consiste en la realización de un barrido lineal por parte del detector en un rango  $m/z$  previamente seleccionado por el operador, obteniéndose espectros de masas completos dentro de ese rango. Las medidas de la abundancia de los iones en función de la razón masa/carga se realizan de forma discontinua en intervalos de valor 0.125  $m/z$ . Si la abundancia del ion es mayor de un valor prefijado (valor umbral de detección) el dato es almacenado en la memoria del ordenador y al final de barrido, se tiene un espectro de masas completo que se traduce en un punto del cromatograma. Al cabo de un tiempo, tiempo de borrado, se inicia un nuevo barrido que conduce a la obtención de un nuevo espectro de masas y de un nuevo punto del cromatograma.

El tiempo de barrido del espectrómetro de masas HP5970A, empleado en esta Memoria, depende del número de medidas realizadas de cada ion, del rango de masas estudiado y del número de valores  $m/z$  medidos durante cada barrido. Este parámetro puede ser estimado mediante la ecuación 1.

$$\text{tiempo de barrido} = (Q \cdot 2^N) \times (M_2 - M_1) + 0.07P_{m/z} \quad (1)$$

donde

$Q$  es un coeficiente que vale 0.43 para nuestro espectrómetro de masas.

$2^N$  es el número de veces que se mide la abundancia de una masa en particular antes de pasar a la siguiente,  $N$  puede valer entre 0 y 7.

$(M_2 - M_1)$  es el rango de masa que debe ser medido.

$P_{m/z}$  es el número de iones medidos dentro del rango de masa/carga estudiado. Este número es mayor cuanto menor sea el valor prefijado como umbral de detección.

Otros parámetros importantes a tener en cuenta del espectrómetro de masas y que afectan a la señal analítica son el voltaje del detector y el tiempo de borrado del disolvente o tiempo que debe permanecer desconectado el detector.

#### A. Rango masa/carga del espectro de masas.

Este parámetro viene dado por los valores superior e inferior del espectro de masas de trabajo. El rango a estudiar debe ser seleccionado para hacerlo coincidir con la zona que genera mayor información analítica sin ampliarlo innecesariamente ya que aumentaría el tiempo de barrido y bajaría la calidad de la señal analítica. El límite inferior a ser posible debe evitar las masas 18, 28, 32 y 34 correspondientes a  $H_2O$ ,  $N_2$ ,  $O_2$  y  $CO_2$ , respectivamente, ya que la presencia de trazas de humedad o de aire, produciría un ruido de fondo en el cromatograma que afectaría a la reproducibilidad del mismo. Se seleccionó un valor mínimo de 50  $m/z$  salvo en el caso de la aplicación en salivas, donde se seleccionó 40 como valor mínimo debido a la fragmentación de los

compuestos estudiados. El rango superior fue seleccionado en cada caso en función de los pesos moleculares de los compuestos estudiados.

B. Número de medidas de cada ion.

Es el número de veces que el detector mide la abundancia de una masa particular con objeto de tener un valor medio más exacto de las medidas realizadas. El número de medidas realizadas es  $2^N$ , donde N vale entre 0 y 7. Si N es elevado, el tiempo de barrido también lo es perdiéndose definición en el pico cromatográfico. Si por el contrario el valor es pequeño, el cromatograma estará bien definido por muchos puntos pero poco precisos. En esta Memoria se utilizó un valor de  $N=3$ , con lo que el número de medidas fue 8.

C. Voltaje del electrón-multiplicador.

La señal generada por el detector es proporcional a la concentración de analito y a la amplificación de la señal que viene dada por el voltaje aplicado al electrón multiplicador. Este parámetro es ajustado automáticamente por el aparato, modificando para ello automáticamente el voltaje hasta conseguir que la abundancia del ion  $m/z$  69 del perfluorotributilamina sea aproximadamente 250.000, de este modo, a medida que disminuye la sensibilidad del detector, cuando envejece, aumenta paralelamente el voltaje para que la señal analítica sea constante y reproducible. En ocasiones se producen subidas repentinas del VEM debido a suciedad de la fuente de ionización y no por el envejecimiento del detector. En este caso es conveniente limpiar si tras un calibrado automático (autotune) el voltaje alcanza valores por encima de 2400. Si una vez llevada a cabo la limpieza de la fuente el problema persiste, se debe contemplar la posibilidad del cambio del electrón multiplicador, hecho ocurrido a lo largo de la realización de esta Memoria.

D. Valor umbral de detección (Scan Threshold).

Es la menor abundancia que debe poseer un ion determinado para que sea considerado como existente. El valor umbral seleccionado a lo largo de esta Memoria para el voltaje habitual del electrón-multiplicador (2000-2200) fue 200.

E. Tiempo de borrado del disolvente.

El detector debe desconectarse durante el tiempo en el que el disolvente pasa por él. Si el detector se mantuviese conectado, se saturaría la fuente de ionización al llegar una gran cantidad de moléculas de disolvente, provocando una disminución drástica del vacío e incluso daños tanto en el filamento encargado de generar los electrones ionizantes como en el medidor de vacío.

Dado que fueron empleados numerosos disolventes a lo largo del trabajo experimental, se fijó un tiempo de 4 minutos con objeto de asegurar el borrado completo del disolvente en todos los casos.

*1.1.2.2. Análisis en modo SIM (Selected Ion Monitoring).*

Cuando se selecciona en el espectrómetro de masas esta modalidad de medida, éste solo mide unos determinados iones previamente seleccionados por el operador, en lugar de realizar un barrido completo como en el caso del modo Scan. Esta modalidad de trabajo ofrece una serie de ventajas, como son:

- 1.- Disminuye el tiempo de barrido, ya que sólo se mide la abundancia de determinados iones.
- 2.- Aumenta la precisión de las medidas respecto al modo Scan, ya que al ser mayor el número de veces que se repite la medida para un ion, la media será mas precisa. Al ser menor el número de iones a medir, es posible realizar muchas medidas repetitivas con un tiempo de barrido corto. Por

otra parte, como la señal medida es suma de las abundancias de los iones seleccionados para el análisis, existe menor probabilidad de que en esta suma se incluyan abundancias de otros iones que aleatoriamente se encuentren en el detector.

- 3.- Mejor definición del pico cromatográfico, ya que el modo SIM viene definido por un número de puntos mayor ya que el tiempo de barrido es menor. Por tanto será mayor la precisión en la medida del área.
- 4.- Mayor sensibilidad analítica. Aunque la pendiente del calibrado es mayor en modo Scan, la desviación estándar del calibrado ( $s_{RC}$ ) en modo SIM es menor, por tanto el cociente entre ambas lo será también.
- 5.- Mejora la selectividad de la determinación en el caso de compuestos eluidos con el mismo tiempo de retención. Esto es debido a que el detector sólo mide los fragmentos característicos del componente de interés, eliminando por completo las posibles interferencias causadas por fragmentos comunes de otros compuestos que coeluyan con el analito de interés.

La mayor parte de los parámetros fijados en modo de trabajo Scan, coinciden con los utilizados en modo SIM, aunque éste necesita además de algunos otros parámetros específicos como son:

A. Iones seleccionados para el análisis.

Se deben tener en cuenta dos factores: Por una parte, se seleccionarán los fragmentos del compuesto que tengan una abundancia relativa mayor, y en segundo lugar, si alguno de estos fragmentos seleccionados fuera común a un posible interferente, descartaríamos el fragmento común analito-interferente.

Se deben seleccionar no menos de dos o tres iones, pero no más de seis, ya que no generaría ningún beneficio añadido. Es bastante aceptado el criterio de seleccionar los dos o tres iones más abundantes o característicos del compuesto, siempre que sea posible. En esta Memoria se han seleccionado siempre entre dos y cuatro fragmentos como máximo.

#### B. Tiempo de inicio del análisis de cada ion.

En cada caso se estableció el momento de inicio de lectura de cada uno de los iones en función del tiempo de retención de cada uno de los compuestos estudiados en el cromatograma.

#### C. Tiempo de medida de cada ion (Dwell).

El tiempo de medida de cada ion es el tiempo que se mide un ion antes de pasar al siguiente. Es aconsejable usar un tiempo de 100 ms para medidas de dos o tres iones, debiéndose disminuir éste al aumentar el número de iones. En esta Memoria se ha utilizado un tiempo de 100 ms como tiempo de medida para cada ion.

### 1.2. Derivatización de compuestos hidroxilados. Silanización.

Se desprende de la bibliografía consultada<sup>4,5</sup>, que el empleo de reacciones de derivatización en la determinación de contaminantes orgánicos a nivel de trazas, se ha empleado ampliamente a lo largo de los años, principalmente en cromatografía de gases. El empleo de este tipo de reacciones transforma compuestos no volátiles o poco volátiles en derivados que sí lo son. Esta baja volatilidad puede ser debida en el caso de moléculas de gran tamaño a las numerosas fuerzas de dispersión aparecidas entre dichas moléculas o bien, como ocurre en el caso de moléculas pequeñas, a fuertes interacciones intermoleculares entre grupos polares, como N-H, S-H o O-H, de la molécula. En este tipo de moléculas, si se reemplaza este átomo de H mediante acilación, alquilación o

<sup>4</sup> Steinwandter H. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **348**, 688 (1991)

<sup>5</sup> Knapp D.R. *John Wiley & Sons*, New York, NY (1979) **Handbook**.

silanización por un radical adecuado, se produce un incremento notable en la volatilidad que permite su detección mediante esta técnica.

Uno de los procedimientos más utilizados para la derivatización de compuestos orgánicos que poseen grupos OH, NH o SH reactivos en su molécula es la silanización. En esta reacción el átomo de hidrógeno activo, es reemplazado por un grupo alquilsilil (R-Si-). El mecanismo implicado parece ser un ataque nucleofílico sobre el átomo de silicio que requiere, por tanto, un grupo saliente (X) de baja basicidad, con capacidad para estabilizar una carga negativa en el estado de transición y que forme un enlace no muy fuerte con el átomo de silicio<sup>6</sup>. Los primeros reactivos de silanización empleados fueron el trimetilclorosilano y el hexametildisilano y, aunque aún se siguen utilizando, en los últimos años se han desarrollado un gran número de nuevos reactivos. En la tabla IV.1.1 se muestran algunos de ellos.

*Tabla IV.1.1. Reactivos de silanización.*

Reactivo	Abreviatura	Estructura
Hexametildisilano	HMDS	$(\text{CH}_3)_3\text{Si-NH}-(\text{CH}_3)_3$
Trimetilclorosilano	TMCS	$(\text{CH}_3)_3\text{Si-Cl}$
N-metil-N-trimetilsililacetamida	MSA	$(\text{CH}_3)_3\text{CO-N}(\text{CH}_3)\text{-Si}(\text{CH}_3)_3$
N-trimetilsilil dietilamina	TMSDEA	$(\text{CH}_3)_3\text{Si-NH}-(\text{C}_2\text{H}_5)_2$
N-trimetilsilil dimetilamina	TMSDMA	$(\text{CH}_3)_3\text{Si-NH}-(\text{CH}_3)_2$
N-metil-N-trimetilsilil trifluoroacetamida	MSTFA	$(\text{CF}_3)\text{CO- N}(\text{CH}_3)\text{-Si}(\text{CH}_3)_3$
N,O-Bis(trimetilsilil) acetamida	BSA	$(\text{CH}_3)\text{-C-OSi}(\text{CH}_3)_3\text{=N-Si}(\text{CH}_3)_3$
N,O-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida	BSTFA	$(\text{CF}_3)\text{-C-OSi}(\text{CH}_3)_3\text{=N-Si}(\text{CH}_3)_3$
N-trimetilsilil imidazol	TMSI	$(\text{CH}_3)_3\text{-Si-Imidazol}$

<sup>6</sup> McKallum N.K. and Armstrong R.J. *Journal of Chromatography A*, **78**, 303 (1973).

La reacción general que tiene lugar en el caso de compuestos con grupos OH, como el bisfenol A y el bisfenol F, es la que se muestra en la siguiente ecuación.



A lo largo del tiempo se han empleado numerosos tipos de reactivos de silanización con fines específicos, como los dimetilsilil derivados, que presentan una mayor volatilidad que los trimetilsilil, pudiendo ofrecer importantes ventajas en la derivatización de compuestos polifuncionales; sin embargo, este tipo de derivados suelen ser menos estables y el enlace Si-H puede dar lugar a reacciones paralelas. Así mismo se han empleado otros grupos para llevar a cabo la reacción como el dimetiletilsilil, dimetilpropilsilil o t-butildimetilsilil, aunque hoy día los más aceptados siguen siendo los trimetilsilil derivados.

El orden de reactividad de los compuestos orgánicos con estos reactivos es el siguiente:



siendo los alcoholes primarios los más susceptibles de reacción, seguidos de los secundarios y finalmente los terciarios.

Una característica destacada de los sililderivados en general es su sensibilidad a la presencia de humedad, que provoca la hidrólisis de los mismos, motivo por el cual se debe evitar la presencia de ésta en los procedimientos de derivatización. No obstante, se han descrito en bibliografía métodos en los que se demuestra que la existencia de trazas de humedad, no siempre produce la hidrólisis, principalmente cuando el compuesto derivatizado es un alcohol.

Por regla general, el empleo de este tipo de reacciones produce una mejora en las características cromatográficas de los derivados originados, ya que presentan una mayor

volatilidad, polaridad y estabilidad térmica, lo que hace más fácil su determinación mediante cromatografía de gases.

Dado que algunos de los compuestos estudiados a lo largo de este capítulo presentan grupos hidroxilo susceptibles de una reacción de derivatización con reactivos silanizantes, se ha recurrido a lo largo del trabajo experimental desarrollado a este tipo de reacciones de derivatización.

### **1.3. Estrategia de trabajo.**

Considerando que nuestro objetivo es proponer métodos sensibles y selectivos para la identificación y determinación de bisfenol A y de compuestos relacionados con él en matrices complejas, mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas, se propusieron tres líneas de trabajo diferentes:

- A. Estudio del comportamiento del bisfenol A en aguas cloradas. Dicho estudio se desarrolla ampliamente en el apartado 2 de este capítulo.
- B. Determinación conjunta de bisfenol A junto con bisfenol F y sus correspondientes diglicidiléteres BADGE Y BFDGE, compuestos utilizados en la fabricación de resinas epoxi (bisfenol F, BFDGE y BADGE), en aguas residuales previa extracción líquido-líquido. El método es desarrollado extensamente en el apartado 3 de este capítulo.
- C. Determinación conjunta de bisfenol A, bis-DMA, bis-GMA y TEGDMA, compuestos empleados en la fabricación de selladores y composites dentales, en salivas. Este estudio es ampliamente desarrollado en el apartado 4 de este capítulo.

## 2. IDENTIFICACIÓN DE LOS CLORODERIVADOS DEL BISFENOL A EN AGUAS CLORADAS. PROPIEDADES ESTROGÉNICAS.

En el capítulo anterior, dedicado al desarrollo de metodología analítica para la determinación de bisfenol A, y algunos compuestos relacionados como fenol y BADGE mediante medidas de fluorescencia, se proponen tres métodos para su determinación en aguas de pozo, río y mar. Los estudios de interferencias llevados a cabo pusieron de manifiesto la imposibilidad de aplicar dichos métodos a aguas en las que se encontraba presente el ion  $\text{ClO}^-$ , es decir en aguas cloradas y que es hoy día el tratamiento más habitual para aguas de abastecimiento público. En este tipo de matrices, el cloro libre presente ejerce una interferencia negativa de gran magnitud sobre el comportamiento fluorescente del bisfenol A, observándose una disminución de la señal en función de la razón de concentraciones entre cloro y bisfenol A y el tiempo de contacto de los reactivos. Así cuando la razón era 5:1, se observó una disminución del 50 % en la señal fluorescente mostrada por el compuesto en un tiempo de 4 minutos y su desaparición total tras 10 minutos. Así mismo cuando la razón de concentraciones de cloro:bisfenol A fue 10:1, la desaparición total de la señal se produjo en sólo 4 minutos.

Dada la ausencia de señal fluorescente en este tipo de matrices, se recurrió al empleo de la Cromatografía de Gases acoplada con Espectrometría de Masas (CG-EM) para investigar la naturaleza de esta interferencia demostrándose así la existencia de una reacción química entre el cloro libre presente en el agua clorada de consumo público y el bisfenol A. A continuación se estudió dicha reacción, identificándose los compuestos originados, previa separación de los mismos.

El interés de este estudio se basa en la posibilidad de cloración del bisfenol A al entrar en contacto con las en aguas de consumo público, incorporándose así a la cadena alimenticia a través de las redes de suministro de agua potable. Es conveniente por tanto poseer un buen conocimiento de esta reacción, así como de las posibles consecuencias que pueden llegar a ejercer sobre la salud este tipo de compuestos. Este trabajo se centró por tanto en tres puntos básicos:

1. Elucidar la evolución de la reacción del bisfenol A en aguas cloradas de abastecimiento público.
2. Identificar los posibles productos de reacción mayoritarios, con objeto de proceder a su síntesis y obtener así patrones puros.
3. Determinar la actividad biológica de los derivados formados, con objeto de evaluar el posible impacto de estos nuevos compuestos sobre la salud humana.

### 2.1. Caracterización de los compuestos mediante CG-EM.

Vílchez y colaboradores han propuesto un método para el análisis de bisfenol A en aguas de distinta procedencia mediante CG-EM previa microextracción líquido líquido y posterior derivatización del compuesto antes de su inyección cromatográfica<sup>7</sup>. Al reproducir el análisis en modo SIM en aguas cloradas, se observó la aparición de un pico cromatográfico correspondiente al bisfenol A. El análisis en modo SCAN pone así mismo de manifiesto la aparición de 4 nuevos picos cromatográficos no identificados con tiempos de retención y espectros de masas diferentes al bisfenol A.

Para la caracterización cromatográfica de estos cuatro compuestos originados a partir del bisfenol A, se siguió un procedimiento operatorio similar al propuesto por Vílchez y colaboradores. En un matraz aforado de 100 ml de capacidad, se preparó una disolución de bisfenol A de concentración  $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  en agua procedente de la red de abastecimiento de la ciudad de Granada. La disolución así preparada fue trasvasada a un embudo de decantación de 100 ml de capacidad, y transcurridos 10 minutos, se añadieron 30 gramos de ClNa y se extrajo con 2 ml de diclorometano, empleando para ello el dispositivo diseñado para disolventes más densos que el agua. A continuación, tras decantar las fases durante 10 minutos, se concentró la fase orgánica en rotavapor hasta un volumen aproximado de 100  $\mu\text{l}$  y se llevó a sequedad bajo una corriente de

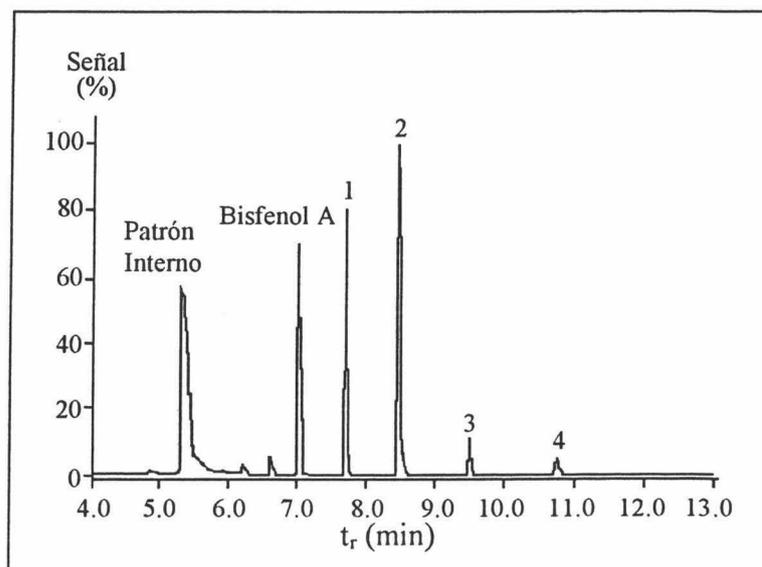
<sup>7</sup> González-Casado A., Navas N., del Olmo M. and Vílchez J.L. *Journal of Chromatographic Science*, 36 565 (1998).

nitrógeno en un vial cromatográfico. A continuación, se selló el vial y se adicionaron 50  $\mu\text{l}$  de una mezcla (4:1) de diclorometano y Sigma SIL-A, empleado como reactivo de silanización y que contenía además  $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de antraceno deuterado como patrón interno. Se agitó la mezcla a temperatura ambiente durante 1 minuto y se inyectó en el cromatógrafo de gases, fijando las condiciones instrumentales mostradas en la tabla IV.2.1.

*Tabla IV.2.1. Variables instrumentales.*

CG		MS	
Variable	Valor	Variable	Valor
Flujo total del gas portador	100 ml/min	Temperatura Interfase GC-MS	280°C
Flujo de purga Séptum	3 ml/min	Rango m/z del espectro de masas	45-510 m/z
Presión en cabeza de columna	10 psi	Modo	SCAN
Temperatura Inyector	200 °C	Voltaje del electro-multiplicador	1750-2100 eV
Temperatura inicial de la columna	150 °C	Dwell	100 ms
Programación Temperatura	30°C/min, 270°C (7 min)	---	---
Volumen Inyectado	2 $\mu\text{l}$	---	---

En la figura IV.2.1. se muestra el cromatograma obtenido bajo estas condiciones instrumentales:



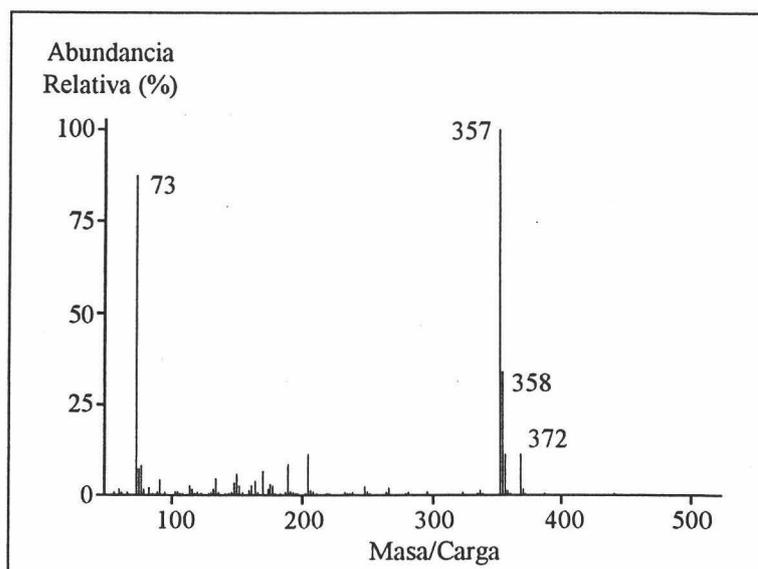
*Figura IV.2.1. Cromatograma en modo SCAN de los productos de reacción.*

En el cromatograma aparecen seis picos bien resueltos a tiempos de retención 5.40 min (patrón interno) y 7.04, 7.72, 8.49, 9.52 y 10.78 minutos correspondientes al bisfenol A y a cuatro nuevos compuestos, resultantes de la reacción de éste con el cloro libre presente en el agua.

A continuación se muestran los espectros de masas correspondientes a cada uno de los picos obtenidos, con objeto de dilucidar la naturaleza de los compuestos formados y de establecer el correspondiente método cromatográfico para estudiar la evolución de cada uno de los compuestos en función de las condiciones experimentales.

### *2.1.1. Espectro de masas de los compuestos silanizados.*

El pico cromatográfico que aparece a un tiempo de retención de 7.04 minutos, corresponde claramente a la presencia del bisfenol A que no reaccionó en la muestra. En la figura IV.2.2 se muestra el espectro de masas del compuesto silanizado.



*Figura IV.2.2. Espectro de masas del bisfenol A silanizado.*

Los fragmentos principales son los de  $m/z$  372, correspondiente al pico molecular y el de 357 correspondiente a la pérdida de un metilo. El fragmento de  $m/z$  73 corresponde al grupo trimetilsilil [-Si(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>].

Así mismo, en las figuras IV.2.3 a 6 se muestran los espectros de masas correspondientes a los picos con tiempos de retención 7.72 (1), 8.49 (2), 9.52 (3) y 10.78 (4) minutos de los compuestos silanizados, resultantes de la reacción del bisfenol A con el cloro libre presente en el agua.

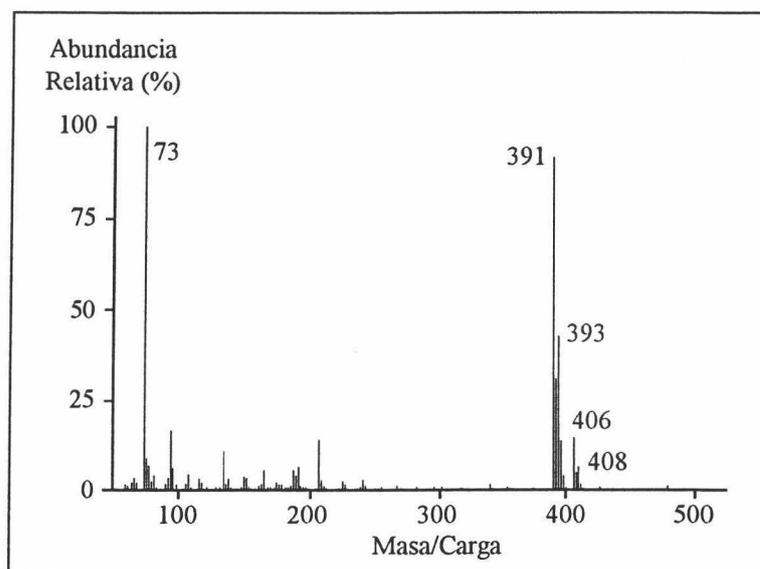


Figura IV.2.3. Espectro de masas del compuesto con  $t_R=7.72$  min.

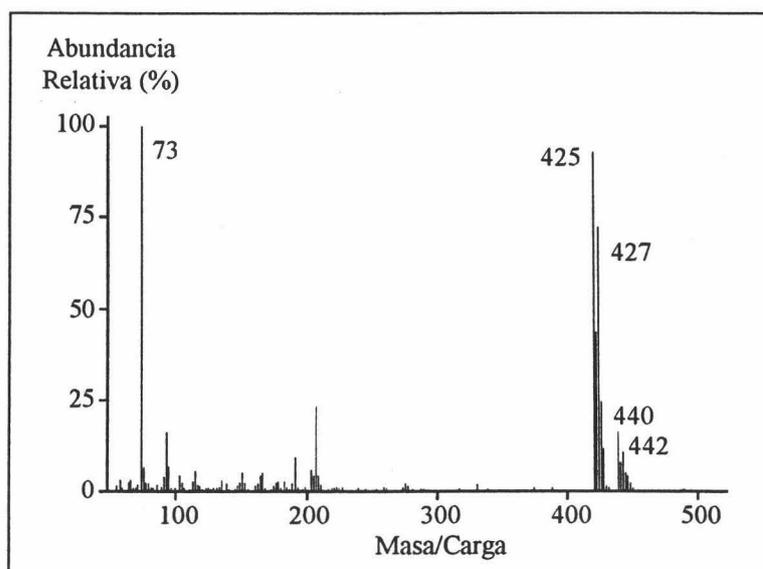


Figura IV.2.4. Espectro de masas del compuesto con  $t_R=8.65$  min.

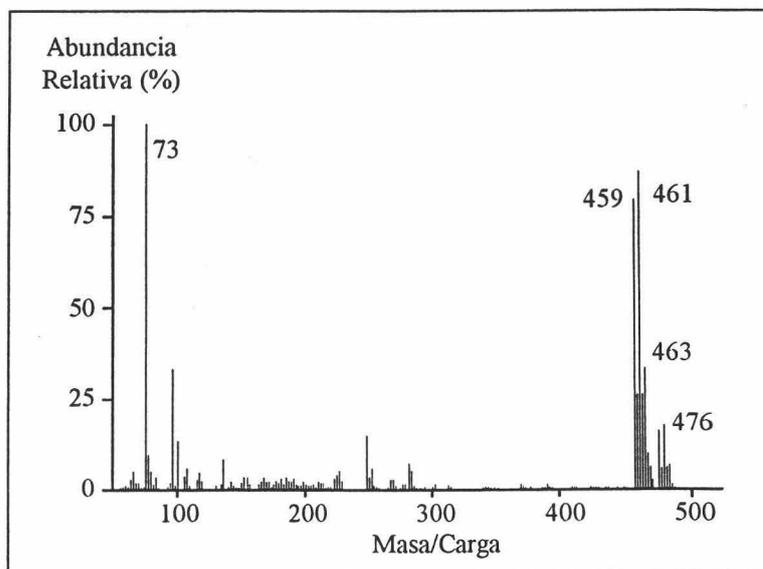


Figura IV.2.5. Espectro de masas del compuesto con  $t_R=9.52$  min

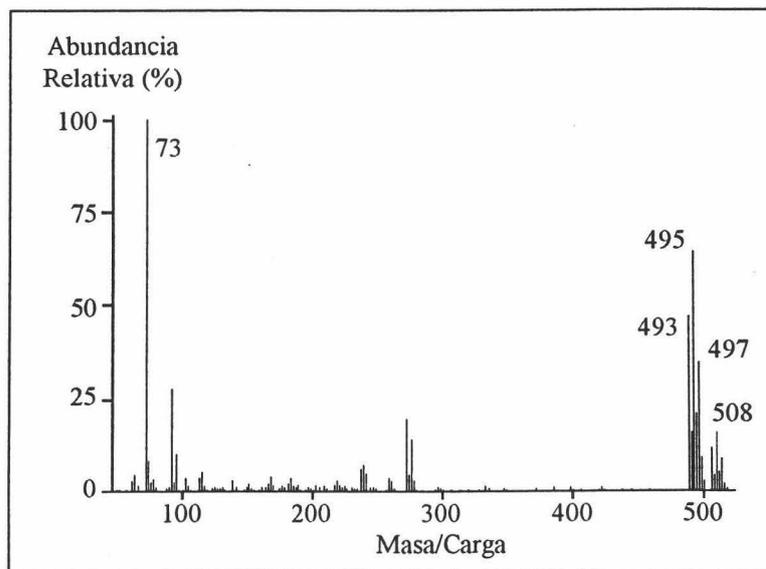


Figura IV.2.6. Espectro de masas del compuesto con  $t_R=10.78$  min.

En los espectros de masas de los cuatro compuestos desconocidos previamente y silanizados, se observa la aparición de los correspondientes picos moleculares a 406, 440, 474 y 508 m/z, mientras que el pico base, correspondiente a la pérdida de un grupo metilo (15 m/z) en todos los casos aparece a 391, 425, 459 y 493 m/z respectivamente. Así mismo, en todos los casos aparece un pico de gran abundancia con m/z 73 correspondiente al fragmento trimetilsilil. Por último, del estudio realizado se desprende que los cuatro compuestos originados presentan espectros de masas análogos y el fragmento del pico molecular de cada uno de ellos compuesto corresponde a la adición consecutiva de 35 unidades m/z respecto al pico molecular del bisfenol A. Por tanto, se deduce que los cuatro picos desconocidos corresponden a la presencia de 1, 2, 3 y 4 átomos de cloro respectivamente en la molécula de bisfenol A.

Como conclusión a este estudio, se estableció el modo SIM de trabajo, siguiendo las recomendaciones desarrolladas en la introducción de este capítulo. Se seleccionaron para ello los iones característicos de cada compuesto eligiendo aquellos fragmentos de mayor abundancia relativa y que no coincidían con ningún posible interferente.

En la tabla IV.2.2 se muestran los parámetros fijados en el establecimiento del modo SIM para el análisis cromatográfico de los compuestos silanizados: **tiempo de retención ( $t_r$ )** de cada analito, **tiempo de inicio del análisis de cada ion ( $t_i$ )** y **fragmentos de mayor abundancia**.

*Tabla IV.2.2. Parámetros seleccionados para el modo SIM.*

Compuesto	$t_r$ (min)	$t_i$ (min)	Fragmento (m/z)
Patrón interno	5.40	4.00	176, 178
Bisfenol A	7.16	6.90	357, 372
Cl-Bisfenol A	7.92	7.50	391, 406
Cl <sub>2</sub> -Bisfenol A	8.65	8.00	425, 440
Cl <sub>3</sub> -Bisfenol A	9.73	9.00	459, 474
Cl <sub>4</sub> -Bisfenol A	10.82	10.00	493, 508

## 2.2. Variables experimentales que afectan a la cloración del bisfenol A.

Se estudian a continuación las variables experimentales que afectan a la reacción de cloración del bisfenol A.

### 2.2.1. *pH del medio.*

Para estudiar la influencia del pH sobre la desaparición de bisfenol A y formación de derivados clorados, en una serie de matraces aforados de 100 ml de capacidad, se prepararon disoluciones de bisfenol A de concentración  $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  a las que se adicionaron 0.5 ml de disolución acuosa de cloro de  $100 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , previamente contrastada mediante yodometría. Se añadió agua desionizada hasta un volumen cercano al enrase y con disoluciones de HCl y NaOH de distintas concentraciones se fijó el pH deseado, a continuación se enrasó y se repitió la medida de pH. Seguidamente se transvasaron las disoluciones a embudos de decantación de 100 ml donde transcurridos 10 minutos se adicionaron 30 gramos de cloruro sódico y se extrajo con 2 ml de diclorometano agitando durante 1 minuto a 1700 r.p.m. A continuación se pasó la fase orgánica por una columna de sulfato sódico anhidro con objeto de eliminar las trazas de agua presentes y se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Finalmente se adicionaron 50  $\mu\text{l}$  de una mezcla 1:4 de reactivo de silanización (Sigma Sil-A) y diclorometano que contenía así mismo  $20 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de antraceno deuterado como patrón interno y se inyectó en el cromatógrafo de gases fijando las condiciones instrumentales establecidas en la tabla IV.2.1 para el método en modo SIM. En la tabla IV.2.3 y figura IV.2.7 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla IV.2.3. Influencia del pH.

pH	$A_{\text{pico}}/A_{\text{patrón}}$				
	BFA	BFA-Cl	BFA-Cl <sub>2</sub>	BFA-Cl <sub>3</sub>	BFA-Cl <sub>4</sub>
3.01	11.52	0.182	0.002	0.001	0.013
4.69	11.27	0.192	0.028	0.005	0.015
5.50	10.62	0.579	0.087	0.012	0.017
6.52	4.827	1.489	0.321	0.019	0.025
7.50	2.350	1.398	0.900	0.102	0.075
8.40	1.421	0.914	1.600	0.173	0.103
10.00	1.018	0.087	0.131	0.035	0.009
12.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

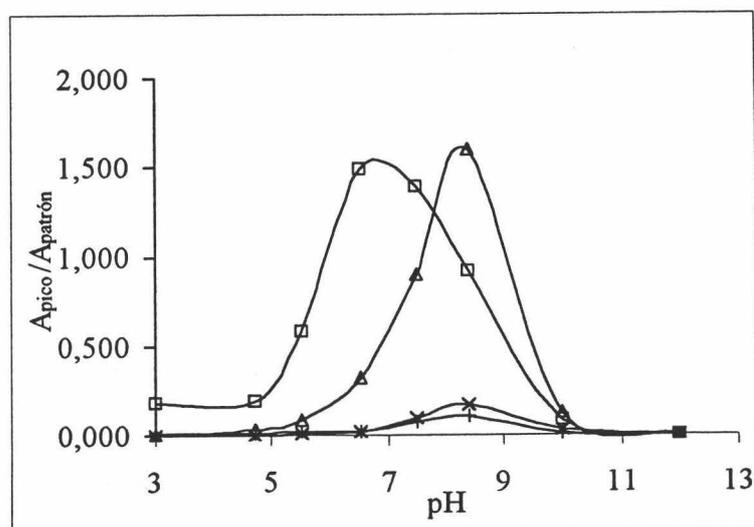
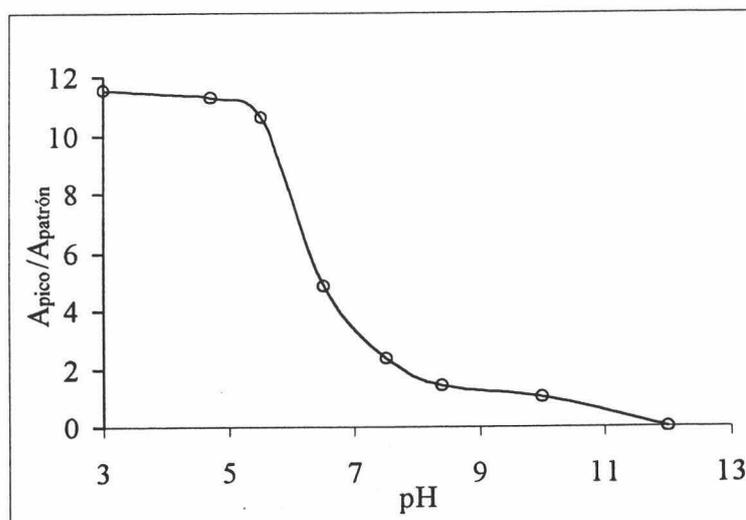


Figura IV.2.7. Evolución de la reacción con el pH bisfenol A (o), BFA-Cl ( $\square$ ), BFA-Cl<sub>2</sub> ( $\Delta$ ), BFA-Cl<sub>3</sub> (x), y BFA-Cl<sub>4</sub> (+).

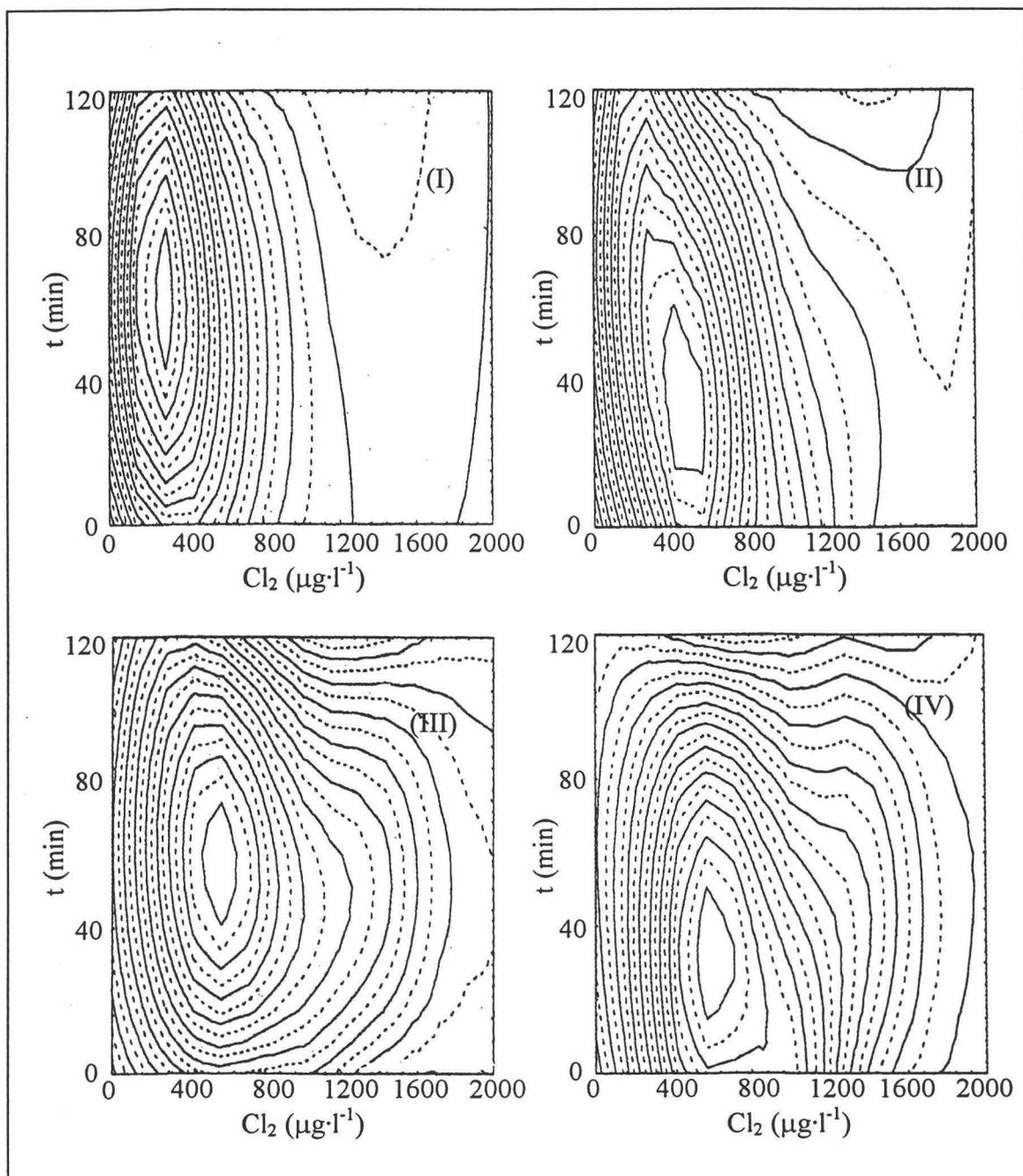
Se observa que la señal cromatográfica mostrada por el bisfenol A permanece constante hasta valores de pH próximos a 5.0, valor a partir del cual decrece rápidamente hasta desaparecer a valores de pH fuertemente básicos. Por otra parte, los derivados clorados aparecen en el intervalo de pH comprendido entre 5 y 10, mostrando las máximas señales a pH 6.9 para monoclorobisfenol A, 8.1 para diclorobisfenol A y 8.3 para tri y tetraclorobisfenol A. Este hecho indica que la reacción se inicia cuando el pH es superior a 5.0, alcanzando su máximo rendimiento a pH próximo a 8.0, valor que coincide con el encontrado en el agua potable de la red de abastecimiento público de la ciudad de Granada, en la que se hizo un seguimiento durante 30 días, obteniéndose un valor medio de pH 8.05.

### *2.2.2. Concentración de cloro y tiempo de reacción.*

Se estudió a continuación la influencia que ejercen estas dos variables sobre la reacción de cloración del bisfenol A. Debido a que ambas variables se encuentran estrechamente ligadas se procedió a la optimización conjunta de ambas. La experiencia llevada a cabo fue la que se describe a continuación: En una serie de matraces aforados de 100 ml de capacidad se prepararon disoluciones acuosas de bisfenol A de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de concentración a las que se adicionaron cantidades crecientes de una disolución de cloro de  $100 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  con objeto de obtener concentraciones finales comprendidas en el rango 100 a  $2000 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Se fijó  $\text{pH}=8$  mediante adición de NaOH y se dejó reaccionar durante tiempos crecientes, comprendidos en el intervalo 0 a 120 minutos. Transcurridos los correspondientes tiempos de reacción se extrajo cada disolución con diclorometano siguiendo el procedimiento operatorio descrito con anterioridad. En la tabla IV.2.4 y figura IV.2.8 se muestran los resultados obtenidos tras su análisis cromatográfico.

Tabla IV.2.4. Influencia de la concentración de cloro y el tiempo de reacción.

[Cl <sub>2</sub> ] (mg·l <sup>-1</sup> )	t <sub>reacción</sub> (min)	A <sub>pico</sub> /A <sub>patrón</sub>				
		Bisfenol A	BFA-Cl	BFA-Cl <sub>2</sub>	BFA-Cl <sub>3</sub>	BFA-Cl <sub>4</sub>
0.00	0.00	11.610	---	---	---	---
0.10	5	11.452	0.196	0.009	0.0003	0.0001
	10	10.581	0.227	0.012	0.0003	0.0001
	20	9.920	0.179	0.013	0.0004	0.0002
	40	9.851	0.251	0.019	0.0005	0.0008
	60	9.620	0.228	0.024	0.0006	0.0012
	90	9.615	0.215	0.098	0.0006	0.0085
	120	9.601	0.213	0.008	0.0004	0.0023
0.25	5	9.990	0.963	0.075	0.0001	0.0002
	10	8.501	0.970	0.100	0.0004	0.0003
	20	7.762	0.974	0.120	0.0004	0.0005
	40	6.627	1.012	0.173	0.0004	0.0008
	60	4.496	0.854	0.236	0.0004	0.0017
	90	2.615	0.835	0.240	0.0005	0.0019
	120	3.002	0.811	0.234	0.0005	0.0021
0.50	5	1.544	1.198	0.973	0.0010	0.0560
	10	0.381	0.598	0.784	0.0013	0.0598
	20	0.179	0.265	0.449	0.0014	0.0972
	40	0.023	0.008	0.009	0.0012	0.0025
	60	0.014	0.006	0.007	0.0008	0.0009
	90	0.012	0.004	0.005	0.0006	0.0006
	120	0.011	0.003	0.003	0.0004	0.0004
1.00	5	0.196	0.213	0.5810	0.0017	0.0154
	10	0.020	0.0087	0.0157	0.0011	0.0141
	20	0.016	0.0049	0.0046	0.0007	0.0010
	40	0.014	0.0034	0.0036	0.0006	0.0003
	60	0.001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001
	90	0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	120	0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2.00	5	0.045	0.0353	0.0280	0.0010	0.0015
	10	0.015	0.0036	0.0030	0.0030	0.0043
	20	0.000	0.0001	0.0000	0.0010	0.0001
	40	0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	60	0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	90	0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	120	0.000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000



**Figura IV.2.8.** Influencia de la concentración de cloro y del tiempo de reacción para monoclora (I), diclora (II), tricloro (III) y tetraclorobisfenol A (IV).

En los datos mostrados en la tabla IV.2.4 y las representaciones de contorno mostradas en la figura IV.2.8, se observa que la señal cromatográfica correspondiente al monoclorobisfenol A es máxima para una concentración de cloro de  $285 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  y 60 minutos de reacción, en el caso del diclorobisfenol A a  $430 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  y 40 minutos, para el triclorobisfenol A  $570 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  y 55 minutos y finalmente para el tetraclorobisfenol A,  $585 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  y 35 minutos. Por otra parte, la señal máxima del bisfenol A corresponde a la ausencia de cloro, descendiendo rápidamente al aumentar la concentración de éste. Se observa así mismo que el incremento en la concentración del reactivo produce un desplazamiento de la reacción hacia los compuestos con mayor número de átomos de cloro, acortándose así mismo el tiempo de reacción. Es importante destacar que para tiempos elevados y concentraciones de cloro altos, se produce la desaparición de los cuatro compuestos clorados descritos.

Finalmente y teniendo en cuenta que la concentración de cloro libre en el agua potable de la red de Granada se encuentra próxima a las  $500 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  y su pH es 8.05, se realizó un estudio comparativo de la evolución de la reacción con el tiempo en agua de la red y agua destilada en la que se fijarán las mismas condiciones de pH y contenido en cloro, observándose un comportamiento idéntico en ambos casos. Se concluye por tanto que la reacción de cloración no se ve afectada por la presencia de otros compuestos, como sales inorgánicas, en el medio.

### **2.3. Síntesis de los compuestos clorados (P2000/02432).**

De los cuatro cloroderivados originados en la reacción entre el bisfenol A y el cloro libre en las aguas cloradas, sólo el tetraclorobisfenol A estaba disponible como patrón comercial. Dada la necesidad de disponer de patrones puros de todos estos compuestos para su completa identificación y posterior cuantificación, se llevó a cabo la síntesis de los mismos en nuestro laboratorio de acuerdo con el siguiente procedimiento operatorio.

Para ello se partió de 500 mg de bisfenol A y de la cantidad estequiométrica de cloro necesaria para obtener el monoclorobisfenol A.

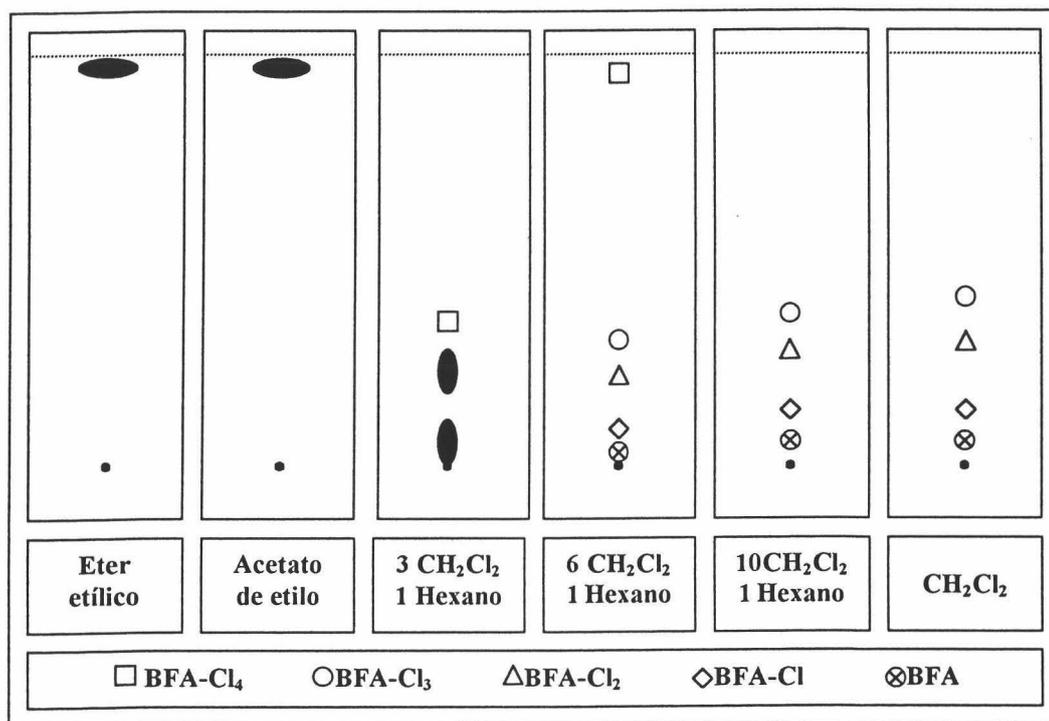
### 2.3.1. Cloración del bisfenol A.

En un vaso de precipitados de 500 ml de capacidad, se pesaron 500 mg de bisfenol A puro y se disolvieron en 250 ml de una mezcla 1:4 etanol:agua desionizada. Desde una bureta, y agitando continuamente, se adicionaron gota a gota 100 ml de disolución acuosa de  $\text{Cl}_2$  de 1.6 g/l de concentración, previamente contrastada. Durante este proceso se mantuvo constante un pH de 8 mediante la adición de disolución de NaOH de distintas concentraciones. Con objeto de acelerar la reacción, se elevó la temperatura de la disolución hasta 60 °C, manteniéndose constante durante 20 minutos una vez finalizada la adición de cloro. Transcurrido este tiempo, se enfrió y se centrifugó separándose por una parte, un precipitado sólido y por otra la disolución acuosa. Esta última fue extraída sucesivamente con tres porciones de 20 ml de diclorometano agitando manualmente durante cinco minutos. A continuación se disolvió la fracción sólida en el volumen de disolvente orgánico resultante de la extracción de la fase acuosa y, con objeto de eliminar las trazas de humedad presentes en la muestra, se pasó a través de una columna de sulfato sódico anhidro. Finalmente se llevó a sequedad, obteniéndose una mezcla de bisfenol A y de monoclora, dicloro, tricloro y tetracloro bisfenol A.

### 2.3.2. Separación por cromatografía en capa fina.

Con objeto de seleccionar las condiciones experimentales necesarias para el aislamiento de cada uno de los constituyentes de la muestra mediante cromatografía líquida en columna, se recurrió a la cromatografía en capa fina para realizar las pruebas preliminares.

Se empleó una placa de sílice como fase estacionaria, y como fase móvil disolventes orgánicos de polaridad variada: éter etílico, acetato de etilo, y mezclas en distintas proporciones de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y hexano. Los resultados obtenidos se muestran en la figura IV.2.9.



*Figura IV.2.9. Separación de los compuestos por cromatografía en capa fina.*

Los disolventes más polares empleados, como el éter etílico o el acetato de etilo no permitían la separación de los componentes de la mezcla avanzando todos ellos de forma simultánea con el frente de la fase móvil. Sin embargo, el uso de disolventes menos polares como son las mezclas entre diclorometano y hexano en las proporciones adecuadas permitieron la resolución de la muestra. Por tanto, según los resultados mostrados en la tabla IV.2.5 y en la figura IV.2.9, las fases móviles seleccionadas para llevar a cabo la separación de los compuestos fueron en primer lugar la mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y hexano 10:1 para eluir tetra, tri y diclorobisfenol A y CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> puro para la elución del monoclorobisfenol A. Finalmente, se seleccionó éter etílico para eliminar los restos de bisfenol A no que no había reaccionado.

### 2.3.3. Aislamiento por cromatografía líquida en columna.

Tras seleccionar las fases móviles adecuadas, se separaron los compuestos mediante cromatografía líquida en columna. Para ello se preparó una suspensión de 100 mg de sílice (de Presión) en una mezcla 10:1 de diclorometano y hexano. Dicha

suspensión fue introducida en una columna cromatográfica de vidrio de 50 cm de altura y 3 cm de diámetro interno, provista en su parte inferior de una llave de teflón, alcanzando la fase estacionaria una altura final de 20 cm. Con ayuda de una pipeta Pasteur se introdujo la mezcla disuelta en hexano:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1:10 y cuando la muestra entró en la columna de sílice se comenzó la separación cromatográfica adicionado de forma continua fase móvil para la elución de tetra, tri y diclorobisfenol A. A continuación se aumentó la polaridad de la misma empleando diclorometano con objeto de eluir el monoclorobisfenol A y finalmente se modificó de nuevo la fase móvil empleando en este caso éter etílico con objeto de eliminar el bisfenol A retenido en la columna.

Por último, se inyectaron en el cromatógrafo las distintas fracciones obtenidas y tras agrupar aquellas que contenían el mismo compuesto, se concentraron en rotavapor y se llevaron a sequedad con objeto de obtener los cuatro patrones sólidos. Se obtuvieron tras separar y secar los compuestos cuatro patrones sólidos en las proporciones en peso que se indican a continuación: 12 % de monoclorobisfenol A, 37 % de diclorobisfenol A, 42% de triclorobisfenol A y 2 % de tetraclorobisfenol A, así como un 7 % de bisfenol A no reaccionado.

#### **2.4. Identificación de los compuestos.**

Los cuatro compuestos aislados, se identificaron mediante las siguientes técnicas:

##### **2.4.1. Espectrometría de masas.**

Para caracterizar los compuestos mediante esta técnica se inyectaron en el cromatógrafo de gases en modo Scan disoluciones etanólicas de 1 mg·l<sup>-1</sup> de concentración de cada uno de los compuestos, empleando las condiciones instrumentales mostradas en la tabla IV.2.1.

### 2.4.1.1. Cromatogramas y espectros de masas de los compuestos clorados.

En la figuras IV.2.10 a 13 se muestran los cromatogramas y el espectros de masas correspondientes a los cuatro compuestos clorados aislados.

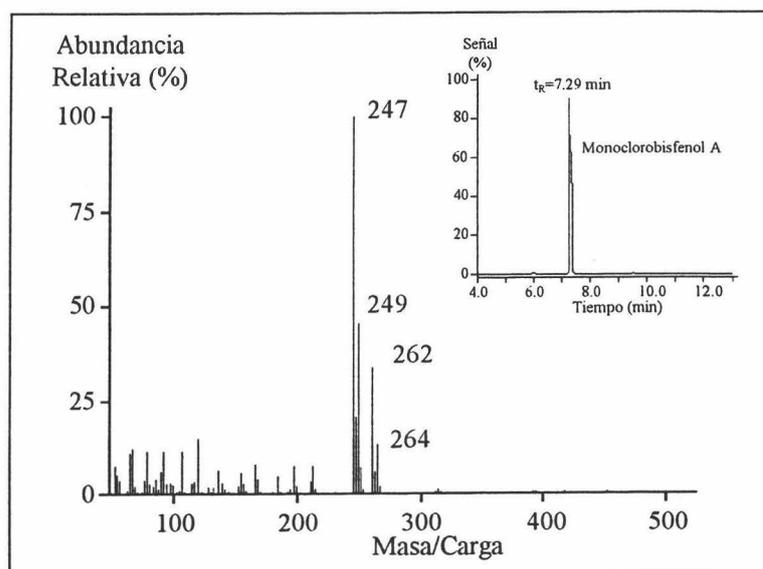


Figura IV.2.10. Cromatograma y espectro de masas del monoclorobisfenol A.

En la tabla IV.2.6 se identifican los fragmentos principales que corresponden al pico molecular y la pérdida de un metilo, según se observa en la figura.

Tabla IV.2.6. Fragmentos relevantes del espectro de masas.

m/z	Abundancia relativa	Ión	
247	100 %	$M^+[C_{14}H_{12}O_2Cl]^+$	
262	34 %	$M^+[C_{15}H_{15}O_2Cl]^+$	

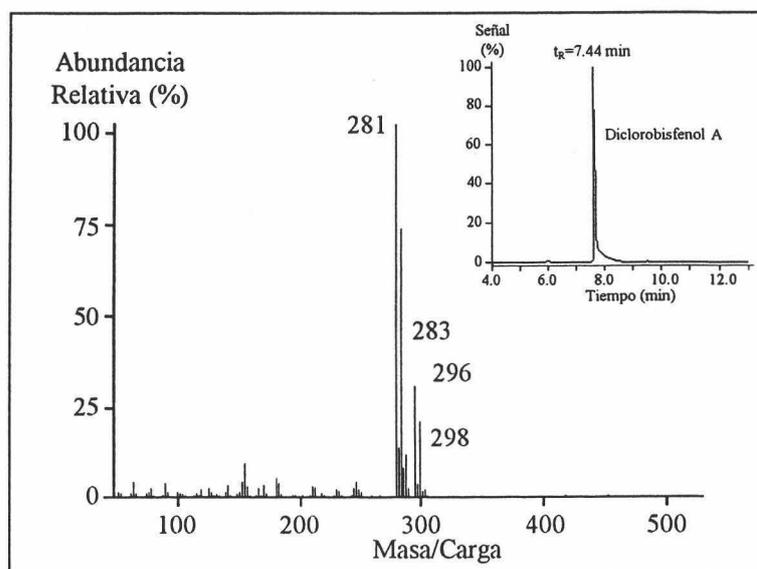


Figura IV.2.11. Cromatograma y espectro de masas del diclorobisfenol A.

En la tabla IV.2.7 se identifican los fragmentos principales que corresponden al pico molecular y la pérdida de un metilo, según se observa en la figura.

Tabla IV.2.7. Fragmentos relevantes del espectro de masas.

m/z	Abundancia relativa	Ion	
281	100 %	$M^+ [C_{14}H_{11}O_2Cl_2]^+$	
296	31 %	$M^+ [C_{15}H_{14}O_2Cl]^+$	

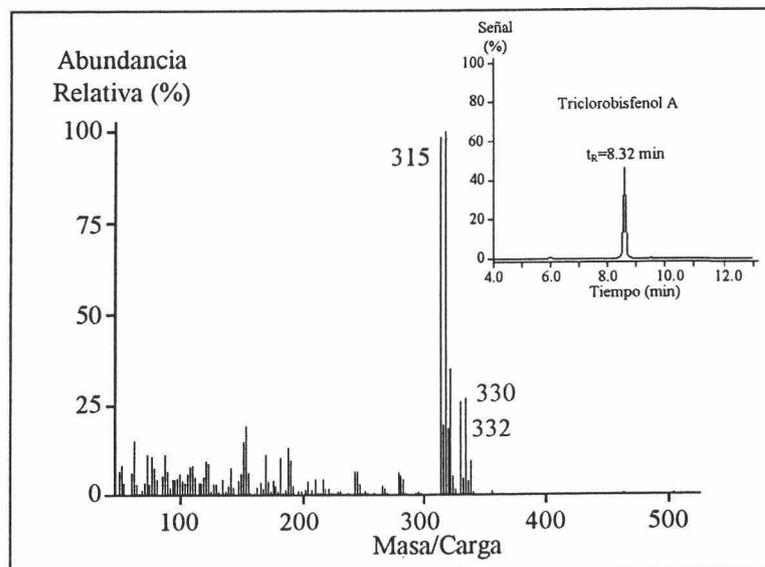


Figura IV.2.12. Cromatograma y espectro de masas del triclorobisfenol A

En la tabla IV.2.8 se identifican los fragmentos principales que se corresponden con el pico molecular y la pérdida de un metilo, según se observa en la figura.

Tabla IV.2.8. Fragmentos relevantes del espectro de masas.

m/z	Abundancia relativa	Ion	
315	98%	$M^+[C_{14}H_{10}O_2Cl_3]^+$	
330	23 %	$M^+[C_{14}H_{10}O_2Cl_3]^+$	

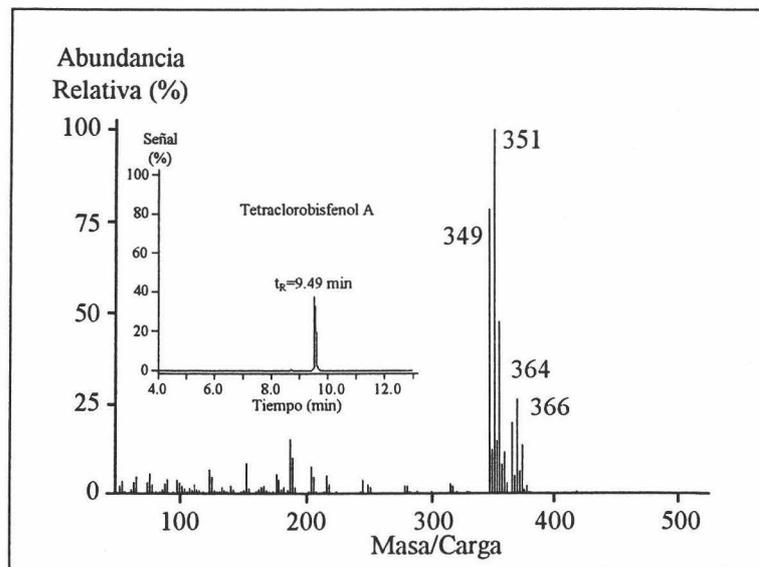


Figura IV.2.13. Cromatograma y espectro de masas del tetrachlorobisfenol A.

En la tabla IV.2.9 se identifican los fragmentos principales que se corresponden con el pico molecular y la pérdida de un metilo, según se observa en la figura.

Tabla IV.2.9. Fragmentos relevantes del espectro de masas.

m/z	Abundancia relativa	Ion	
351	100 %	$M^+ [C_{14}H_9O_2Cl_4]^+$	
366	26 %	$M^+ [C_{14}H_9O_2Cl_4]^+$	

### 2.4.1.2. Abundancias isotópicas.

Se observa en todos los espectros de masas, la aparición de numerosos fragmentos de similar razón carga/masa. El espectro de masas de aquellos compuestos que poseen átomos de cloro en su estructura suelen presentar varias líneas espaciadas en 2 unidades en su espectro de masas, debido a la mezcla isotópica de  $^{35}\text{Cl}$  y  $^{37}\text{Cl}$  que se da en este tipo de compuestos<sup>8</sup>. Por tanto, para confirmar el número de átomos de cloro presente en cada uno de los compuestos, se utilizó un método basado en la comparación de la abundancia relativa de dichos isótopos.

Teniendo en cuenta que la abundancia isotópica de ambos es 100:32.4, si en la molécula existe más de un átomo de cloro, las abundancias relativas varían en función del número de átomos. Es importante destacar, que existirán  $(n+1)$  picos isotópicos, donde  $n$  es el número de átomos de cloro presentes en la molécula. Así mismo, las intensidades relativas de las especies isotópicas pueden calcularse según la ecuación 1.

$$(a + b)^n \quad (1)$$

donde  $a$  es la abundancia del isótopo más ligero y  $b$  la del más pesado que en el caso del cloro valen aproximadamente 3 y 1 respectivamente, y  $n$  vale entre 1 y 4.

En la tabla IV.2.10 se muestra las abundancias isotópicas calculadas.

*Tabla IV.2.10. Abundancias isotópicas de las moléculas con cloro.*

m/z	Cl	Cl <sub>2</sub>	Cl <sub>3</sub>	Cl <sub>4</sub>
M	3	9	27	81
M + 2	1	6	27	108
M + 4		1	9	54
M + 6			1	12
M + 12				1

<sup>8</sup> Barker J. "Mass Spectrometry", 2<sup>nd</sup> Edition. Willey, Chinchester (1998).

Los resultados experimentales obtenidos para los cuatro derivados clorados del bisfenol A son los mostrados en la tabla IV.2.11.

*Tabla IV.2.11. Abundancias isotópicas experimentales.*

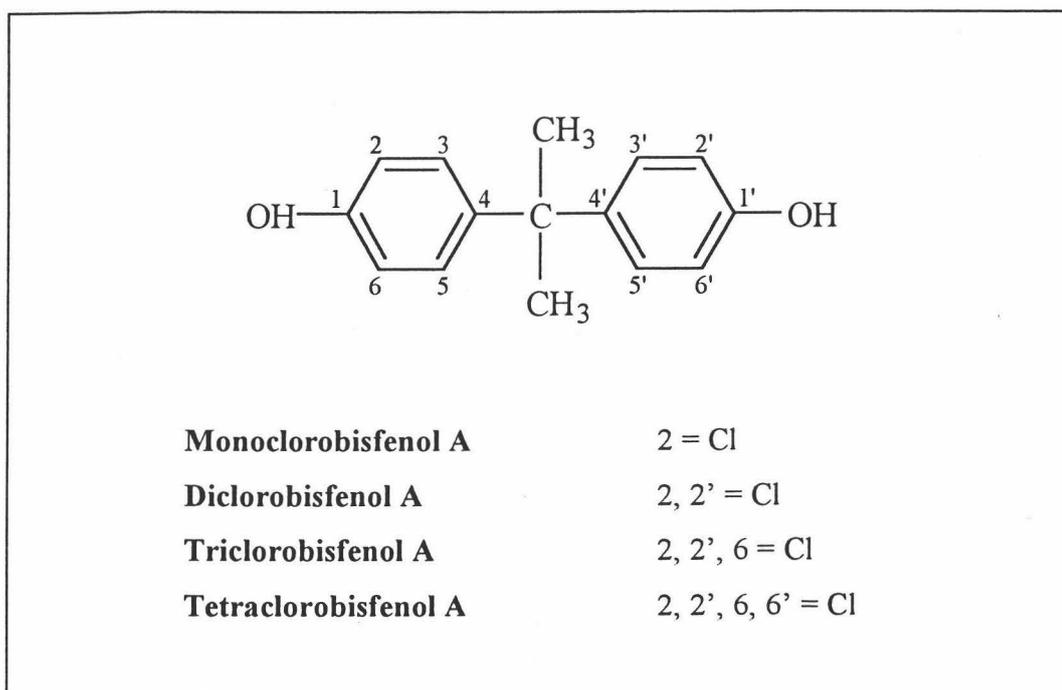
Pico	Compuesto	M	M + 2	M + 4	M + 6	M + 12
1	BFA	---				
2	BFA-Cl	3.00	1.00			
3	BFA-Cl <sub>2</sub>	9.00	6.02	1.07		
4	BFA-Cl <sub>3</sub>	27.00	26.70	8.87	0.95	
5	BFA-Cl <sub>4</sub>	80.80	108.00	53.20	11.00	0.98

La concordancia existente entre los datos experimentales calculados a partir de los correspondientes espectros de masas y los teóricos confirma la presencia de uno, dos, tres y cuatro átomos de cloro respectivamente en la molécula de bisfenol A.

Finalmente, se realizó una búsqueda de los espectros de masas en la librería<sup>9</sup> almacenada en la base de datos del cromatógrafo de gases-espectrómetro de masas y el algoritmo de búsqueda disponible identificó el pico 2 como diclorobisfenol A con un 98 % de probabilidad y el pico 4 como tetraclorobisfenol A con un 96 % de probabilidad. Los picos 1 y 3 no son identificados por dicha base de datos.

Por tanto teniendo en cuenta que la estructura química del bisfenol A es la mostrada en la figura IV.2.14, y que la reacción transcurre mediante una adición electrofílica, se concluye que esta reacción origina cuatro derivados clorados del bisfenol A con los átomos de cloro entrando alternativamente en posición orto respecto al grupo electrón donador (OH) y en posición meta respecto al grupo electrón aceptor (cadena carbonada) según se recogen en la figura.

<sup>9</sup> *Librería Cromatógrafo de gases-Espectrometro de masas*. Wiley 138.1.



*Figura IV.2.14. Estructura química del bisfenol A y de sus derivados clorados.*

### 2.4.2. Resonancia magnética nuclear de $^{13}\text{C}$ y de $^1\text{H}$ .

Se registraron así mismo los espectros de resonancia magnética nuclear de carbono trece y de protones empleando cloroformo deuterado como disolvente. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas IV.2.12 y 13.

Tabla IV.2.12. Espectros de RMN  $^1\text{H}$ .

*	Desplazamiento químico	Multiplicidad	J (Hz)	Hidrógeno identificado
(1)	1.58	Singlete	---	- CH <sub>3</sub>
	4.70	Singlete	---	- OH
	5.40	Singlete	---	- OH
	6.72	Multiplete	---	H <sub>2</sub> y H <sub>6</sub>
	6.89	Doblete	9	H <sub>6</sub> '
	7.00	Doble doblete	2.3 y 9	H <sub>5</sub> '
	7.07	Multiplete	---	H <sub>3</sub> y H <sub>5</sub>
	7.17	Doblete	2.3	H <sub>3</sub> '
(2)	1.58	Singlete	---	- CH <sub>3</sub>
	5.30	Singlete	---	- OH
	5.45	Singlete	---	- OH
	6.90	Doblete	9	H <sub>6</sub> y H <sub>6</sub> '
	6.98	Doble doblete	9 y 2,3	H <sub>5</sub> y H <sub>5</sub> '
	7.15	Doblete	2.3	H <sub>3</sub> y H <sub>3</sub> '
(3)	1.58	Singlete	---	- CH <sub>3</sub>
	5.30	Singlete	---	- OH
	5.45	Singlete	---	- OH
	6.92	Doblete	9	H <sub>6</sub> '
	6.98	Doble doblete	2.2 y 9.0	H <sub>5</sub> '
	7.07	Doblete	2.2	H <sub>3</sub> y H <sub>5</sub>
	7.13	Doblete	2.2	H <sub>3</sub> '
(4)	1.58	Singlete	---	- CH <sub>3</sub>
	5.75	Singlete	---	- OH
	7.10	Singlete	---	H <sub>3</sub> H <sub>3</sub> ' H <sub>5</sub> y H <sub>5</sub> '

\* (1) Monocloro (2), dicloro, (3) tricloro y (4) tetraclorobisfenol A.

Tabla IV.2.13. Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$ .

*	Desplazamiento químico	Carbono Identificado	Desplazamiento químico	Carbono Identificado
(1)	31.01	-CH <sub>3</sub>	128.00	C <sub>3</sub> y C <sub>5</sub>
	41.70	C-gemdimetil	142.60	C <sub>4</sub>
	115.0	C <sub>2</sub> y C <sub>6</sub>	144.60	C <sub>4</sub> '
	115.70	C <sub>6</sub> '	149.10	C <sub>1</sub> '
	119.30	C <sub>2</sub> '	153.50	C <sub>1</sub>
	127.10	C <sub>3</sub> ' y C <sub>5</sub> '	---	---
(2)	30.90	-CH <sub>3</sub>	127.10	C <sub>3</sub> , C <sub>3</sub> ' , C <sub>5</sub> y C <sub>5</sub> '
	42.00	C-gemdimetil	143.70	C <sub>4</sub> y C <sub>4</sub> '
	115.70	C <sub>6</sub> y C <sub>6</sub> '	149.30	C <sub>1</sub> y C <sub>1</sub> '
	119.50	C <sub>2</sub> y C <sub>2</sub> '	---	---
(3)	30.75	-CH <sub>3</sub>	126.70	C <sub>3</sub> y C <sub>5</sub>
	42.10	C-gemdimetil	127.00	C <sub>3</sub> ' y C <sub>5</sub> '
	116.00	C <sub>6</sub> '	142.90	C <sub>4</sub> y C <sub>4</sub> '
	119.60	C <sub>2</sub> '	145.70	C <sub>1</sub>
	120.70	C <sub>2</sub> y C <sub>6</sub>	149.60	C <sub>1</sub> '
(4)	30.60	-CH <sub>3</sub>	126.60	C <sub>3</sub> , C <sub>3</sub> ' , C <sub>5</sub> y C <sub>5</sub> '
	42.10	C-gemdimetil	143.10	C <sub>4</sub> y C <sub>4</sub> '
	120.70	C <sub>2</sub> , C <sub>2</sub> ' , C <sub>6</sub> y C <sub>6</sub> '	146.10	C <sub>1</sub> y C <sub>1</sub> '

\* (1) Monocloro (2), dicloro, (3) tricloro y (4) tetraclorobisfenol A.

El *monoclorobisfenol A* presenta como señales más relevantes en el espectro de resonancia magnética nuclear de  $^1\text{H}$  un doblete con un desplazamiento químico de 7.17 ppm respecto al tetrametilsilano (TMS). Esta señal corresponde al átomo de hidrógeno 3' acoplado con el 5'. Por otra parte, el espectro de  $^{13}\text{C}$  muestra una señal importante a 119.30 ppm correspondiente a un carbono cuaternario unido al átomo de cloro.

El *diclorobisfenol A* muestra en sus espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN una simetría mayor que el monocloro, debida a la presencia de dos átomos de cloro en diferentes

anillos, de forma que la molécula es completamente simétrica debido al libre giro del enlace  $C_{\text{central}}-C_{4 \text{ ó } 4'}$ .

El *triclorobisfenol A* presenta un doblete a 7.07 ppm correspondiente a los átomos de hidrógeno 3 y 5, y aparece así mismo una señal idéntica a la aparecida en el diclorobisfenol A. En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN aparecen tres carbonos cuaternarios unidos a los átomos de cloro a desplazamientos 120.70 y 119.60 ppm respectivamente.

Finalmente, el *tetraclorobisfenol A* presenta un espectro de  $^1\text{H}$ -RMN muy simple en el que los hidrógenos 3, 3', 5 y 5' aparecen como singlete a desplazamiento químico 7.10 ppm y el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN presenta por su parte cuatro series de carbonos aromáticos, correspondientes a los cuatro carbonos unidos a los átomos de cloro a desplazamiento 120.0 ppm, dos carbonos unidos a grupos hidroxilo a 146.10 ppm, dos carbonos con enlace C-C a desplazamiento 143.10 y finalmente a cuatro carbonos más asociados a enlaces C-H.

## 2.5. Estudios biológicos. Determinación de la actividad estrogénica.

Este estudio fue realizado en colaboración con el Laboratorio de Investigaciones Médicas de la Universidad de Granada. El ensayo realizado consiste en la observación de la evolución de las células de la línea MCF7 en presencia de los compuestos en estudio de acuerdo con una leve modificación<sup>10</sup> de la técnica propuesta por Sonnenschein y colaboradores denominado ensayo de E-Screen<sup>11</sup>. Para ello se cultivaron células de cáncer de mama humano, línea celular MCF7, en cajas de cultivo de 24 pocillos con concentraciones iniciales de 20000 células/pocillo. Grupos celulares "Control" recibieron medio de cultivo (Dulbecco, sin rojo fenol) suplementado con 10% de suero humano, previamente desprovisto de estrógenos. Otros grupos celulares quedaron expuestos durante las 144 horas que dura el ensayo a idéntico medio, pero

<sup>10</sup>Villalobos M., Brotons J.A., Olea M.F., Ruíz de Almodóvar J.M. and Pedraza V. *Environmental Health Perspectives*, **103**, 844 (1995).

<sup>11</sup>Soto A., Lin T.M., Justicia H., Silvia R.M. and Sonnenschein C., *Ed. T. Colborn and C. Clement*, 295 (1992).

conteniendo además estradiol-17 $\beta$  (10 nM - 1 pM), como control de proliferación positiva, o cualquiera de las sustancias a ensayar (10  $\mu$ M - 1 nM). Transcurrido este tiempo se detuvo el ensayo, eliminando el medio de cultivo, fijando las células y tiñiéndolas con sulforhodamina B (SRB) al 0.4 % (peso/volumen) durante 10 minutos. A continuación las células fueron tratadas en frío con tricloroacético al 10 %, incubadas a 4 °C durante 30 minutos, lavadas cinco veces con agua desionizada. Finalmente tras preparar los grupos celulares se cuantificó el número de células existentes y se calculó el valor relativo de crecimiento frente al grupo Control y al estradiol-17 $\beta$ .

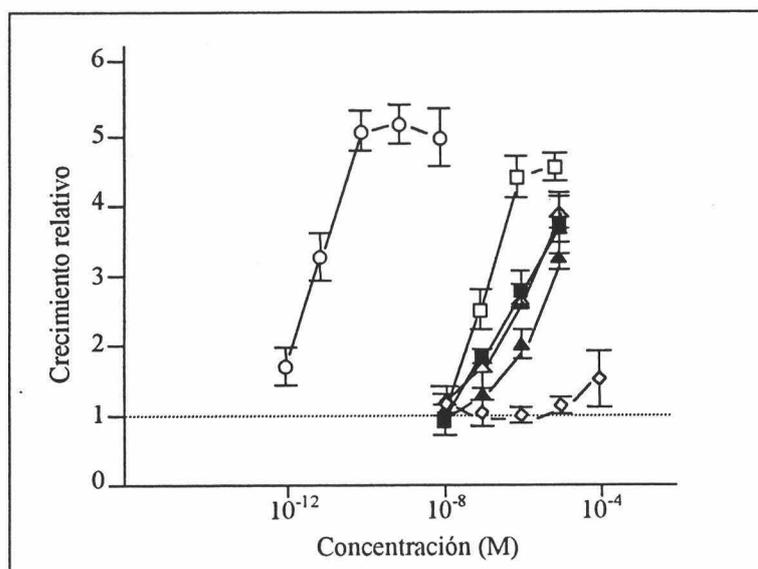
En la tabla IV.2.14 se muestran los resultados obtenidos. En ella aparece la mínima concentración ( $C_{min}$ ) para la cual el efecto proliferativo celular ( $PE$ ) es máximo. La potencia proliferativa relativa ( $RPP$ ) calculada como cociente entre la concentración mínima de estradiol necesaria para producir el máximo PE y la concentración mínima de la sustancia estudiada. Finalmente, se muestra el efecto proliferativo relativo ( $RPE$ ) calculado según la ecuación 3:

$$RPE = \frac{(PE - 1)_{\text{Compuesto}}}{(PE - 1)_{\text{Estradiol}}} \cdot 100 \quad (2)$$

*Tabla IV.2.14. Actividad estrogénica. Ensayo de E-Screen.*

Compuesto	$C_{min}$	RPP (%)	PE	RPE (%)
<b>Estradiol</b>	50 pM	100	5.9 $\pm$ 1.0	100
<b>Bisfenol A</b>	1 $\mu$ M	0.005	5.0 $\pm$ 0.5	82
<b>Cl-bisfenol A</b>	10 $\mu$ M	0.0005	4.5 $\pm$ 0.4	71
<b>Cl<sub>2</sub>-bisfenol A</b>	10 $\mu$ M	0.0005	4.5 $\pm$ 0.5	71
<b>Cl<sub>3</sub>-bisfenol A</b>	10 $\mu$ M	0.0005	3.9 $\pm$ 0.4	59
<b>Cl<sub>4</sub>-bisfenol A</b>	10 $\mu$ M	0.0005	2.0 $\pm$ 0.3	25

En la figura IV.2.15 se muestran gráficamente los resultados obtenidos.



**Figura IV.2.15.** Crecimiento relativo celular en presencia de: estradiol (o), bisfenol A (□), monocloro (■), dicloro (Δ), tricloro (▲) y tetraclorobisfenol A (⊙).

En ausencia de estradiol (compuesto de control positivo), las células proliferan mínimamente, mientras que en presencia de este compuesto la proliferación es máxima. El valor del rendimiento celular tanto de bisfenol A como de los cuatro derivados clorados es significativamente mayor que el observado en ausencia de estradiol. Si se comparan los efectos proliferativo relativos del estradiol y los cinco compuestos, se observa que el porcentaje de efecto proliferativo respecto al estradiol disminuye al aumentar el número de átomos de cloro en la molécula, de modo que el de mayor actividad biológica es el bisfenol A, seguido de monocloro, dicloro, tricloro y tetracloro bisfenol A respectivamente. Es decir, tanto bisfenol A como sus cuatro derivados clorados, presentan capacidad para mimetizar a la hormona estradiol, variando ésta entre un 82% en el caso del bisfenol A y un 25% en el caso del tetraclorobisfenol A.

### **3. DETERMINACIÓN DE BISFENOL F, BISFENOL A Y SUS CORRESPONDIENTES DIGLICIDIL ÉTER EN AGUAS RESIDUALES POR CROMATOLOGRAFIA DE GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS.**

El objetivo de este apartado es desarrollar un método sensible y selectivo para la determinación de Bisfenol F, Bisfenol A y sus correspondientes diglicidil éteres, bisfenol F diglicidiléter (BFDGE) y bisfenol A diglicidiléter (BADGE), empleando como técnica la cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (CG-MS), previa extracción líquido líquido y posterior derivatización antes de su inyección en el cromatógrafo, basándonos en una metodología similar a la descrita por Vélchez y colaboradores.

La importancia de optimizar métodos para la determinación de estos compuestos en matrices de naturaleza diversa se basa en la gran aplicabilidad que tienen hoy día, ya que son empleados en la fabricación de las llamadas resinas epoxi, base de numerosas aplicaciones industriales del bisfenol A y de otros compuestos fenólicos, como ya se indicó en la introducción de esta Memoria de Doctorado.

El método propuesto se aplica en la determinación de estos compuestos en aguas residuales empleándolos como signos de contaminación por resinas epoxi, ya que las aguas residuales son una vía y fuente para introducir estos contaminantes en el ambiente. Se han seleccionado tres tipos diferentes de aguas residuales procedentes de tres ciudades: Loja (Granada), Granada y Melilla.

#### **3.1. Caracterización de los compuestos mediante CG-MS.**

A continuación se establecen las características tanto cromatográficas como espectrométricas de los cuatro compuestos objeto de estudio. Para ello, en un vial cromatográfico de 200  $\mu\text{l}$  de capacidad se introdujo una disolución etanólica que contenía  $10.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de bisfenol F y de bisfenol A y  $100.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de los correspondientes diglicidiléteres. A continuación se eliminó el disolvente bajo corriente de  $\text{N}_2$  y se añadió

50  $\mu\text{l}$  de diclorometano que contenía además 20  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de antraceno deuterado, sustancia empleada como patrón interno. La disolución fue inyectada en el cromatógrafo de gases, fijando las condiciones instrumentales que se muestran en la tabla IV.3.1. En la tabla IV.3.1 se muestra el cromatograma obtenido.

Tabla IV.3.1. Variables instrumentales.

CG		MS	
Variable	Valor	Variable	Valor
Flujo total del gas portador	100 ml/min	Temperatura Interfase GC-MS	280°C
Flujo de purga Séptum	3 ml/min	Rango m/z del espectro de masas	45-510
Presión en cabeza de columna	10 psi	Modo	SCAN
Temperatura Inyector	200 °C	Voltaje del electro-multiplicador	1750-2100
Temperatura inicial de la columna	150 °C	Dwell	100
Gradiente de temperaturas	30°C/min, 270°C (7 min)		
Volumen Inyectado	2 $\mu\text{l}$		

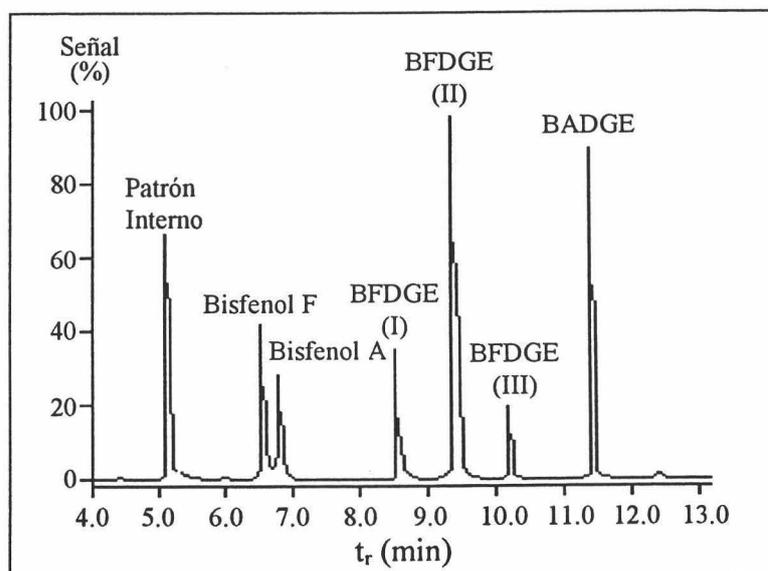


Figura IV.3.1. Cromatograma en modo Scan.

Aparecen siete picos cromatográficos con tiempos de retención 5.20 minutos para el patrón interno y 6.58 minutos para el bisfenol F, 6.70 minutos para el bisfenol A, 8.30 minutos, 9.10 minutos y 10.13 minutos para los tres isómeros del BFDGE y 11.12 minutos para el BFDGE.

Con objeto de seleccionar los fragmentos característicos y de mayor abundancia de cada uno de los compuestos, se estudiaron los espectros de masas correspondientes a los diferentes picos cromatográficos obtenidos.

#### *3.1.1.1. Espectro de masas del antraceno deuterado.*

Este pico corresponde a la presencia del antraceno deuterado, utilizado como patrón interno, los fragmentos seleccionados para el establecimiento del modo SIM, fueron los de relación carga/masa 176 y 178, correspondientes al pico molecular y a la pérdida de dos H respectivamente.

3.1.1.2. Espectros de masas de los compuestos objeto de estudio.

En las figuras IV.3.2 a 7 se muestran los espectros de masas correspondientes a bisfenol F, bisfenol A, BFDGE (tres isómeros) y BADGE. Así mismo en las tablas IV.3.2 a 6 se muestran los fragmentos principales.

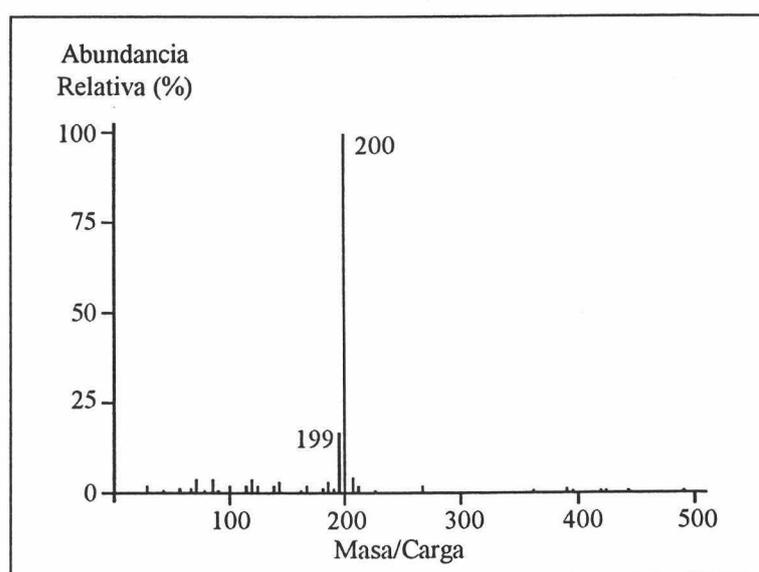


Figura IV.3.2. Espectro de masas del bisfenol F.

Tabla IV.3.2. Fragmentos relevantes del espectro de masas del bisfenol F.

M/z	Abundancia relativa	Ion	
199	17 %	$M^+ [C_{13}H_{11}O_2]^+$	$\left[ \text{OH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} \right]^+$
200	100 %	$M^+ [C_{13}H_{12}O_2]^+$	$\left[ \text{OH}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} \right]^+$

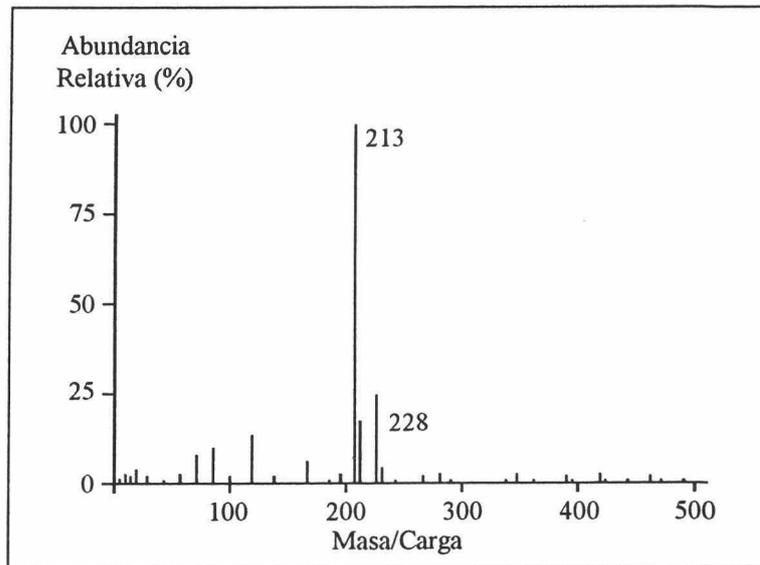


Figura IV.3.3. Espectro de masas del bisfenol A.

Tabla IV.3.3. Fragmentos relevantes del espectro de masas del bisfenol A.

M/z	Abundancia relativa	Ion	
213	100 %	$M^+ [C_{14}H_8O_2]^+$	$\left[ \text{OH}-\text{C}_6\text{H}_4-\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} \right]^+$
228	24 %	$M^+ [C_{15}H_{16}O_2]^+$	$\left[ \text{OH}-\text{C}_6\text{H}_4-\underset{\text{CH}_3}{\overset{\text{CH}_3}{\text{C}}}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} \right]^+$

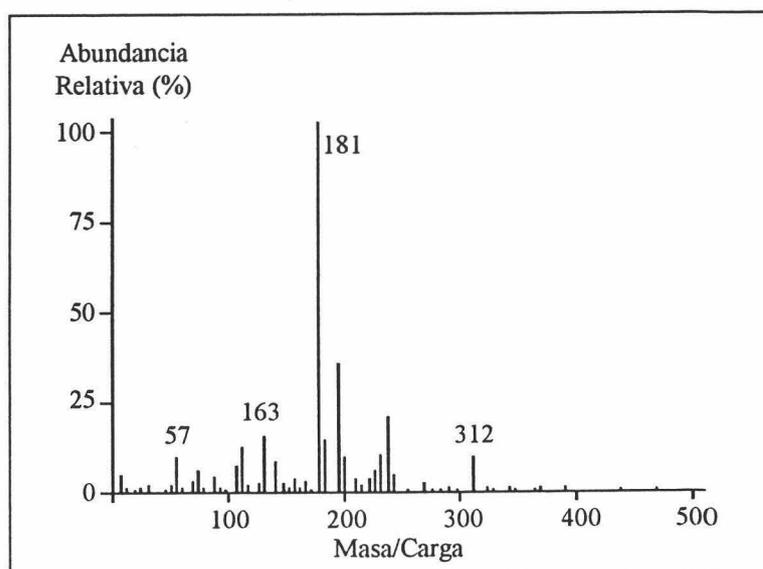


Figura IV.3.4. Espectro de masas del BFDGE (I).

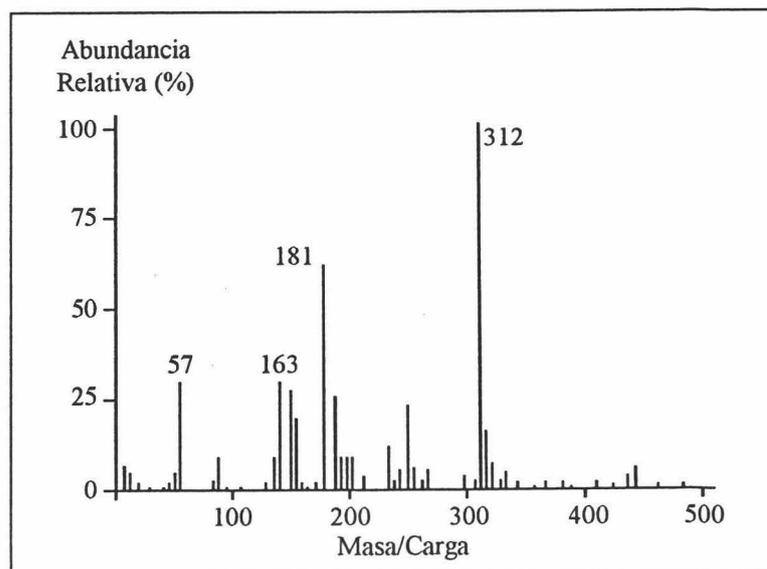


Figura IV.3.5. Espectro de masas del BFDGE (II).

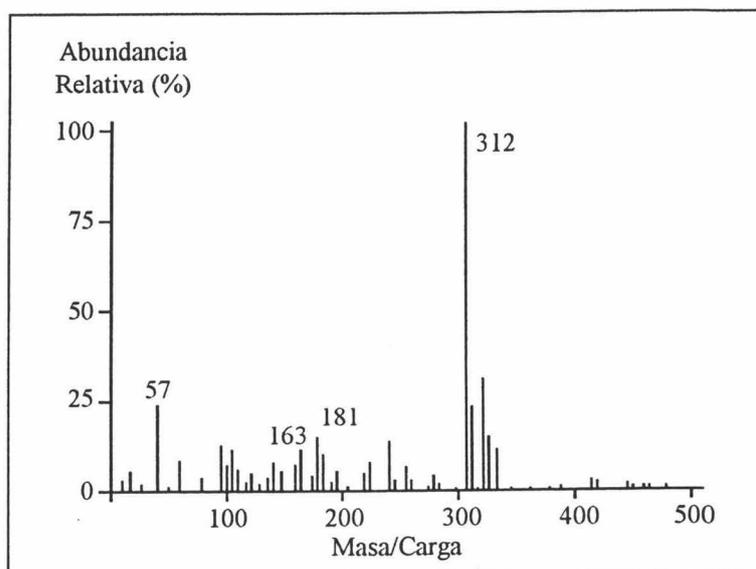


Figura IV.3.6. Espectro de masas del BFDGE (III).

Tabla IV.3.4. Fragmentos relevantes del espectro de masas.

m/z	Abundancia relativa			Ion
	I	II	III	
163	16 %	27 %	16 %	$M^+[C_{10}H_{11}O_2]^+$ $\left[ \text{H}_2\text{C} \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \end{array} \text{CH} - \text{CH}_2\text{O} - \text{C}_6\text{H}_4 - \begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{C} \\   \\ \text{H} \end{array} \right]^+$
181	100 %	62 %	14 %	$M^+[C_{10}H_{13}O_3]^+$ $\left[ \text{H}_2\text{C} \begin{array}{c} \text{OH} \\   \\ \text{O} \end{array} \text{CH} - \text{CH}_2\text{O} - \text{C}_6\text{H}_4 - \begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{C} \\   \\ \text{H} \end{array} \right]^+$
312	10 %	100 %	100 %	$M^+[C_{19}H_{20}O_4]^+$ $\left[ \text{H}_2\text{C} \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \end{array} \text{CH} - \text{CH}_2\text{O} - \text{C}_6\text{H}_4 - \begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{C} \\   \\ \text{H} \end{array} - \text{C}_6\text{H}_4 - \text{OCH}_2\text{CH} \begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \end{array} \text{CH}_2 \right]^+$

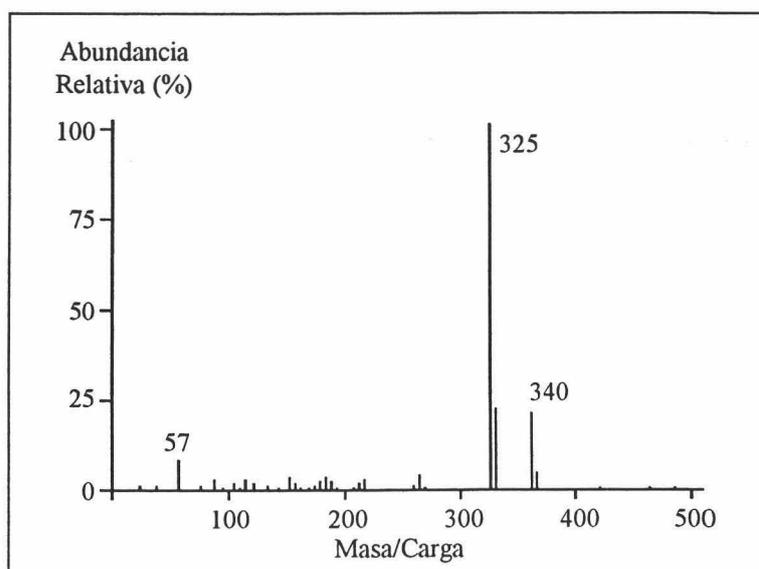
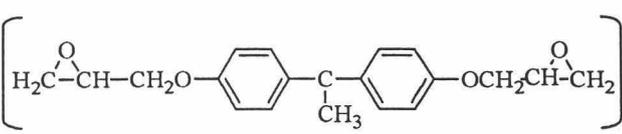
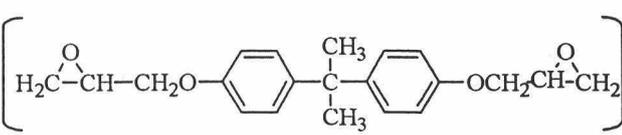


Figura IV.3.7. Espectro de masas del BADGE.

Tabla IV.3.5. Fragmentos relevantes del espectro de masas.

m/z	A* (%)	Ion	
325	100 %	$M^+[C_{20}H_{21}O_4]^+$	
340	23 %	$M^+[C_{21}H_{24}O_4]^+$	

\*A, abundancia relativa.

El espectro de masas del bisfenol F obtenido en modo Scan presenta una línea característica, correspondiente al pico molecular con una relación carga/masa de 200, y otra de menor abundancia con 199 m/z que corresponde a la pérdida de un hidrógeno (M-1). Por otra parte el bisfenol A muestra dos fragmentos característicos a 213 correspondientes al pérdida de un grupo metilo, seleccionado como pico base (M-15), y 228 m/z correspondiente al pico molecular. Así mismo el BFDGE presenta tres fragmentos característicos con m/z 163 y 181, siendo las abundancias relativas de cada

una de estas dos líneas diferentes para cada uno de los tres isómeros posicionales correspondientes, y  $m/z$  312, correspondiente al pico molecular. Finalmente, el espectro de masas del BADGE muestra un fragmento de mayor abundancia, pico base, a 325  $m/z$  correspondiente a la pérdida del grupo metilo, mientras que aparece otro fragmento de menor abundancia a 340  $m/z$  correspondiente al pico molecular.

En todos los casos la correspondencia entre los picos detectados y el analito correspondiente fue confirmada a través de una búsqueda en la librería de espectros Wiley almacenada en la memoria del ordenador acoplado al cromatógrafo de gases, siendo identificados con una probabilidad superior al 95% en todos los casos.

En la tabla IV.3.6 se recogen los fragmentos característicos de cada uno de los compuestos, así como el tiempo de retención al que aparece cada uno de ellos

*Tabla IV.3.6. Fragmentos característicos.*

Compuesto	$t_r$ (min)	Fragmento ( $m/z$ )
<b>Antraceno</b>	5.20	176, 178
<b>BFF</b>	6.59	199, 200
<b>BFA</b>	6.70	213, 228
<b>BFDGE</b>	8.30	163, 181, 312
	9.10	
	10.13	
<b>BADGE</b>	11.12	325, 340

### 3.2. Optimización de variables experimentales.

Se describe a continuación la optimización de la influencia ejercida por las principales variables experimentales que pueden afectar al comportamiento de los compuestos en estudio, distinguiendo entre aquellas que afectan al proceso de derivatización de los compuestos y las implicadas en el proceso de extracción líquido-líquido de la muestra acuosa.

### 3.2.1. Variables del proceso de derivatización.

En este apartado se estudian las variables que afectan al proceso de derivatización previo a la inyección de los compuestos en el cromatógrafo, haciendo uso de reactivos silanizantes.

#### 3.2.1.1. Elección del reactivo de silanización.

Con objeto de seleccionar el reactivo silanizantes más adecuado se estudió el comportamiento de cinco agentes silanizantes sobre la señal cromatográfica mostrada por los componentes de la mezcla. Como reactivos de silanización se estudiaron: N,O-bis(trimetilsilil) acetamida (TMSA), N-trimetilsilil imidazol (TMSI), N,O-bis(trimetilsilil)trifluoro acetamida (BSTFA), trimetil clorosilano (TMCS) y la mezcla formada por TMCS, hexametildisilizano (HMDS) y piridina como disolvente polar en una relación 1:3:9 y denominada por la casa comercial Sigma Sil-A.

Para llevar a cabo esta experiencia, en una serie de viales cromatográficos de 200  $\mu\text{l}$  de capacidad se introdujeron 5  $\mu\text{l}$  de disolución etanólica de bisfenol F y bisfenol A de  $10.0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  y de BFDGE y BADGE de  $1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . A continuación se evaporó el disolvente bajo corriente de nitrógeno y, tras sellar los viales para evitar la entrada de humedad se añadieron 50  $\mu\text{l}$  de una mezcla 1:4 del agente derivatizante correspondiente y diclorometano que contenía así mismo  $20 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de antraceno deuterado. Finalmente la mezcla se agitó durante un minuto a temperatura ambiente y se inyectó en el cromatógrafo de gases, fijando las condiciones instrumentales mostradas en la tabla IV.3.1.

En la tabla IV.3.8 se muestran los resultados obtenidos. En ella aparece el cociente entre la señal obtenida para cada uno de los reactivos ensayados y la obtenida cuando se empleó TMCS como agente derivatizante.

*Tabla IV.3.8. Derivación de los compuestos.*

Reactivo	$*A_x/A_{TMCS}$			
	Bisfenol F	Bisfenol A	BFDGE	BADGE
TMCS	1.0	1.0	1.0	1.0
SIL A	1.6	1.4	1.0	1.0
TMSI	2.9	2.7	1.0	1.0
TMSTFA	3.1	2.6	1.0	1.0
TMSA	3.4	2.7	1.0	1.0
No silanizado	≈ 0.0	≈ 0.0	1.0	1.0

\* Cociente entre el la señal obtenida con cada reactivo y la obtenida con TMCS.

Se seleccionó TMSA como reactivo silanizante, ya que tanto bisfenol F como bisfenol A presentaban el mayor cociente, aunque para el bisfenol A la señal también era máxima cuando se empleó TMSI, no observándose señal apreciable para estas concentraciones cuando no se añadió ningún reactivo de silanización. Por otra parte no se produjo ningún cambio en el comportamiento de los diglicidéteres, ya que el cociente obtenido fue aproximadamente 1 en todos los casos lo cual confirma la no silanización de los mismos dada la ausencia de hidrógenos activos en su molécula.

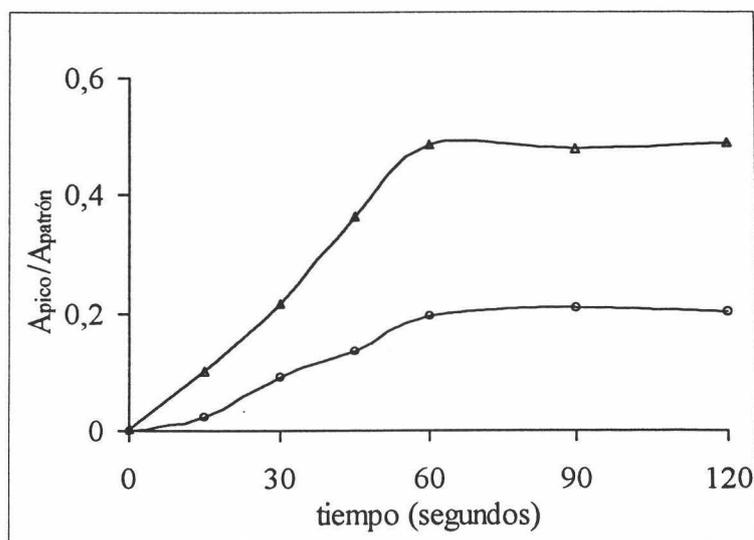
### 3.2.1.2. Tiempo de agitación de la muestra.

Para optimizar este parámetro, se preparó una serie de viales cromatográficos de 200 µl de capacidad en los que se introdujeron 5 µl de disolución etanólica de bisfenol F y bisfenol A de 10.0 mg·l<sup>-1</sup> y de BFDGE y BADGE de 1000 mg·l<sup>-1</sup>. A continuación se evaporó el disolvente bajo corriente de nitrógeno y, tras sellar los viales se añadieron 50 µl de la mezcla 1:4 de TMSA y diclorometano que contenía así mismo 20 mg·l<sup>-1</sup> de antraceno deuterado y se agitaron durante tiempos crecientes. Finalmente, tras su análisis cromatográfico empleando las condiciones instrumentales habituales, se midieron las áreas de los picos obtenidos y se dividieron entre las correspondientes al patrón interno.

En la tabla IV.3.9 y figura IV.3.8 se muestran los resultados obtenidos.

*Tabla IV.3.9. Influencia del tiempo de agitación*

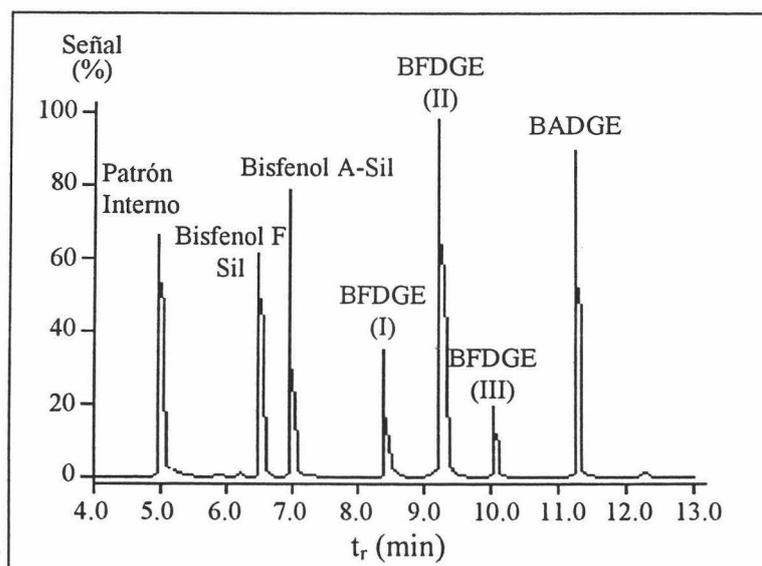
Tiempo (s)	Bisfenol F-Sil	Bisfenol A-Sil
0.0	0.001	0.003
15.0	0.025	0.102
30.0	0.092	0.215
45.0	0.135	0.365
60.0	0.195	0.486
90.0	0.209	0.478
120.0	0.201	0.489

*Figura IV.3.8.. Influencia del tiempo de agitación bisfenol F (○) y bisfenol A (△).*

La señal aumenta al hacerlo el tiempo de agitación hasta alcanzar el valor máximo a 60 segundos, tiempo a partir del cual permanece prácticamente constante. Se seleccionó por tanto un minuto como tiempo de agitación, suficiente para llevar a cabo la reacción de derivación a temperatura ambiente en experiencias posteriores.

Como se vio al principio de este apartado, los compuestos estudiados, presentan estabilidad térmica y volatilidad suficientes para ser determinados de forma directa

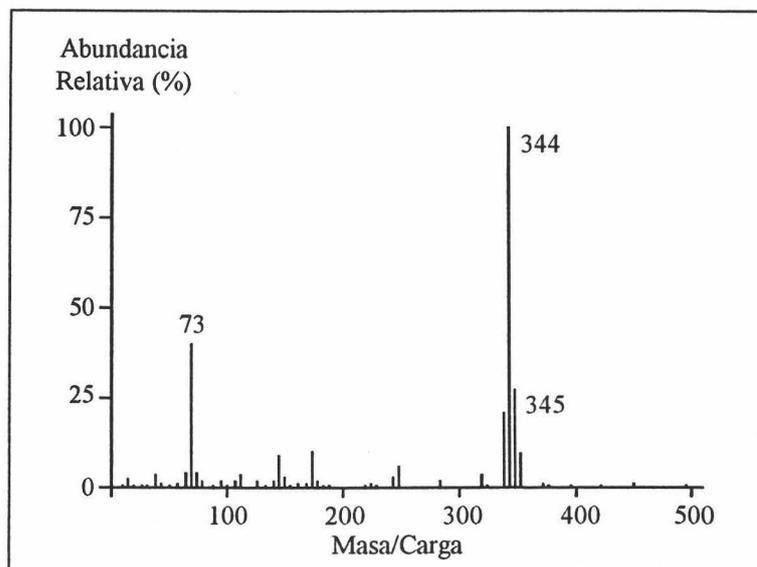
mediante cromatografía de gases. No obstante, el empleo de la reacción de silanización con TMSA ha demostrado que proporciona una mejora en las características cromatográficas de los picos obtenidos tanto para bisfenol F como para bisfenol A. En la figura IV.3.9 se muestra el cromatograma en modo Scan obtenido tras silanización con TMSA fijando las mismas condiciones instrumentales que para la obtención del cromatograma en ausencia de silanización.



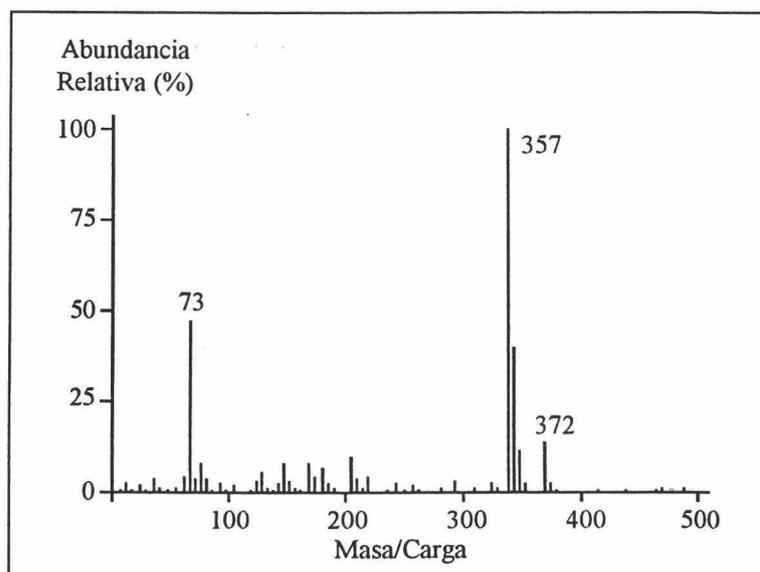
*Figura IV.3.9. Cromatograma en modo Scan.*

Aparecen siete picos cromatográficos con tiempos de retención 5.20 minutos para el patrón interno y 6.59 minutos para el bisfenol F-silanizado, 7.02 minutos para el bisfenol A-silanizado, 8.30 minutos, 9.10 minutos y 10.13 minutos para los tres isómeros del BFDGE y 11.12 minutos para el BADGE. Si se compara el cromatograma de los compuestos silanizados (figura IV.3.9) con el obtenido en ausencia de derivatización (figura IV.3.1), se observa que se ha producido un incremento notable tanto en la sensibilidad de los picos cromatográficos obtenidos para bisfenol F y bisfenol A, así como en la resolución de los mismos, no observándose modificación alguna en los picos correspondientes a los diglicidiléteres derivados.

Se obtuvieron así mismo los espectros de masas correspondientes a los derivados silanizados de bisfenol F y bisfenol A con objeto de determinar los fragmentos de mayor abundancia de los compuestos derivados.



*Figura IV.3.10. Espectro de masas del Bisfenol F silanizado.*



*Figura IV.3.11. Espectro de masas del bisfenol A silanizado.*

El espectro de masas del bisfenol F silanizado presenta una línea característica correspondiente al pico molecular con 344 de relación  $m/z$ , resultado de la adición de

dos grupos trimetilsilil ( $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ,  $P_m=73$  g/mol) a la molécula del compuesto. Para el establecimiento del modo SIM, se seleccionó además el fragmento de  $m/z$  345 correspondiente a la ganancia de un hidrógeno ( $M+1$ )<sup>+</sup>. Por otra parte el espectro de masas del bisfenol A presenta dos líneas características, correspondientes al pico molecular con  $372$   $m/z$  y al pico base de  $m/z$  357, correspondiente éste último a la pérdida de un grupo metilo ( $M-15$ ). En ambos espectros de masas aparece un pico de  $m/z$  73 correspondiente al grupo trimetilsilil.

Finalmente, para establecer el método en modo de trabajo SIM, siguiendo las recomendaciones desarrolladas en la introducción de este capítulo, se seleccionaron los iones característicos de cada compuesto, bisfenol F-silanizado, bisfenol A-silanizado y BFDGE y BADGE sin silanizar y se seleccionaron aquellos fragmentos de mayor abundancia relativa y que no coincidían con ningún posible interferente. En la tabla IV.3.10 se muestran los parámetros necesarios para el establecimiento del modo de trabajo SIM.

*Tabla IV.3.10. Parámetros seleccionados para el modo SIM.*

Compuesto	$t_r$ (min)	$t_i$ (min)	Fragmento ( $m/z$ )
<b>Antraceno</b>	5.20	4.00	176, 178
<b>BFF-Sil</b>	6.59	6.00	343, 344
<b>BFA-Sil</b>	7.02	6.80	357, 372
<b>BFDGE</b>	8.30	8.00	163, 181, 312
	9.10		
	10.13		
<b>BADGE</b>	11.12	10.50	325, 340

### 3.2.2. Variables que afectan a la extracción líquido-líquido.

Debido a la complejidad de la mezcla seleccionada para la aplicación del método, se empleó un procedimiento de extracción líquido-líquido para llevar a cabo la separación de los analitos de la muestra acuosa. La extracción líquido-líquido es una

técnica de bajo coste y que nos permite minimizar el tiempo requerido para el análisis; así mismo, si se emplean cantidades pequeñas de disolvente orgánico se reduce el impacto medioambiental ocasionado. Por otra parte, el empleo de grandes volúmenes de muestra acuosa permite un notable aumento en la sensibilidad de los métodos analíticos propuestos, como ya quedó demostrado en el capítulo dedicado a fluorescencia, donde se empleó microextracción líquido-líquido con el mínimo volumen de disolvente orgánico. En este apartado se emplea un procedimiento de extracción líquido líquido en el que no se ha limitado el volumen de disolvente, dando una mayor relevancia a la obtención de metodología sensible, sin imitación que introduce la posible saturación del disolvente. Por este motivo, se emplea un volumen de muestra de acuosa de 500 ml, y el volumen adecuado de disolvente orgánico para llevar a cabo la extracción de los compuestos.

### 3.2.2.1. Elección del disolvente orgánico.

Tanto bisfenol A como bisfenol F y sus diglicidil éter derivados, son compuestos poco solubles en agua, de este modo la elección de un disolvente orgánico adecuado para su extracción a partir de la muestra de agua residual vendrá determinada por el valor de la constante de distribución de cada uno de los compuestos entre la muestra acuosa y el disolvente empleado.

Para seleccionar el disolvente orgánico, en una serie de matraces aforados de 500 ml de capacidad se prepararon disoluciones acuosas de mezclas de bisfenol F y bisfenol A de  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  y de los correspondientes diglicidiléteres de  $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . A continuación se transvasaron a embudos de decantación de 500 ml de capacidad, y se agregaron 150 gramos de cloruro sódico, valor próximo a la saturación y 6 ml de cada uno de los disolventes orgánicos a ensayar, es decir, diclorometano (DCM), tricolorometano (TCM), tetracloruro de carbono (TCC), éter etílico (ET) y hexano (HEX) y mezclas en distinta proporción de DCM y TCC. A continuación se extrajo agitando mecánicamente durante un minuto con ayuda del dispositivo diseñado para microextracción líquido-líquido y, tras decantar las fases durante el tiempo necesario, se separó la fase orgánica con ayuda del sistema diseñado para disolventes más o menos

densos que el agua según correspondía. Por último, se evaporó el disolvente bajo una corriente de N<sub>2</sub>, y se añadió 50 µl de la mezcla de TMSA y triclorometano (1:4) que contenía 20 mg·l<sup>-1</sup> de antraceno deuterado. Los extractos fueron agitados durante 1 minuto a temperatura ambiente e inyectados en el cromatógrafo de gases en modo SIM, fijando las condiciones instrumentales establecidas en la tabla IV.3.1.

En la tabla IV.3.11 se muestran las señales cromatográficas, calculadas como cocientes de áreas del compuesto y del patrón interno, correspondiendo el área en el caso del BFDGE a la suma de las correspondientes a los picos cromatográficos de los tres isómeros.

*Tabla IV.3.11. Elección del disolvente.*

Disolvente	Bisfenol F-Sil	Bisfenol A-Sil	BFDGE	BADGE
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	0.384	0.933	0.268	0.184
CHCl <sub>3</sub>	0.270	0.870	0.281	0.325
CCl <sub>4</sub>	0.126	0.847	0.343	0.524
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CCl <sub>4</sub> (1:3)	0.360	0.912	0.286	0.220
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CCl <sub>4</sub> (1:1)	0.230	0.881	0.304	0.345
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :CCl <sub>4</sub> (3:1)	0.140	0.870	0.318	0.428
Eter etílico	0.210	0.631	0.041	0.068
n-hexano	0.009	0.356	0.000	0.000

Cada uno de los compuestos presenta un comportamiento distinto en función de su polaridad y del disolvente orgánico ensayado. Como solución de compromiso se seleccionó el triclorometano para la extracción, con el fin de obtener una señal adecuada para todos ellos.

### 3.2.2.2. Fuerza iónica y volumen de disolvente orgánico.

El volumen de disolvente orgánico y la fuerza iónica del medio son dos variables estrechamente relacionadas, por esta razón se llevó a cabo el estudio de la optimización simultánea de ambas mediante el empleo de la metodología de superficie de respuesta,

de esta forma se consigue obtener la máxima respuesta al variar ambas a la vez. Se aplicó para ello un diseño de dos factores central compuesto centrado en las caras<sup>12</sup>.

El procedimiento operatorio seguido fue el que se describe a continuación: En una serie de matraces aforados de 500 ml de capacidad se prepararon disoluciones que contenían  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de bisfenol F y bisfenol A y  $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de BFDGE y BADGE respectivamente. Tras trasvasar las disoluciones a los correspondientes embudos de decantación se añadieron cantidades variables de cloruro sódico y de disolvente orgánico, para realizar la extracción, en los rangos 3.0 ml a 9.0 ml para el disolvente orgánico y 0.0 a 150.0 g de cloruro sódico para la fuerza iónica, según el modelo experimental establecido por el diseño.

En la tabla IV.3.12 se muestran los resultados obtenidos para la razón de áreas compuesto/patrón interno en cada una de las condiciones experimentales ensayadas. En la figura IV.3.12 se muestran las superficies de respuesta obtenidas.

*Tabla IV.3.12. Influencia del volumen de disolvente y de la fuerza iónica.*

$V_{\text{dte}}$ (ml)		Fuerza iónica						
		0 g	75 g	150 g		0 g	75 g	150 g
3 ml	<b>BFF</b>	0.0044	0.0456	0.0386	<b>BFA</b>	0.0706	0.4372	0.422
6 ml		0.0226	0.1409 0.2584 0.2380	0.2849		0.3230	0.7760 0.6410 0.6060	0.8960
9 ml		0.0293	0.2290	0.1225		0.3546	0.7158	0.5729
$V_{\text{dte}}$ (ml)		Fuerza iónica						
		0 g	75 g	150 g		0 g	75 g	150 g
3 ml	<b>BFDGE</b>	0.0365	0.6300	0.1990	<b>BADGE</b>	0.0381	0.6121	0.2035
6 ml		0.1980	0.7647 0.5765 0.6666	0.2290		0.1702	0.5031 0.4802 0.5896	0.3210
9 ml		0.1876	0.2157	0.1449		0.1498	0.4154	0.2401

<sup>12</sup>Box G.W.P, Hunter W.G. and Hunter J.S. *Statistics for Experiments: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*, Wiley, New York, 1978.

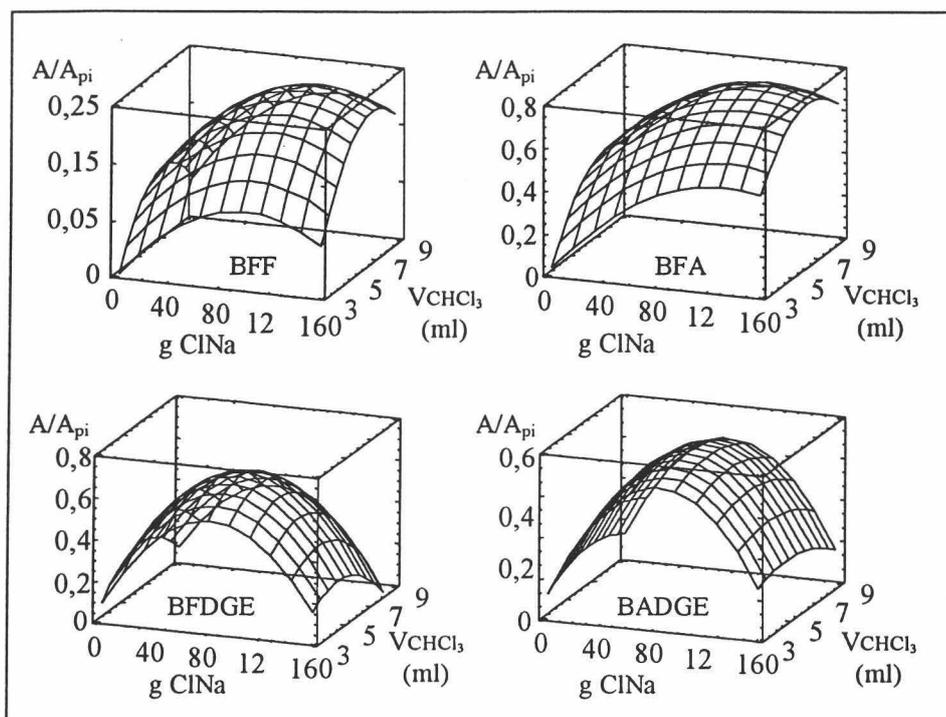


Figura IV.3.12. Influencia de la fuerza iónica y del volumen de disolvente.

Para el bisfenol F silanizado, la señal fue máxima cuando se adicionaron 100.0 g de  $ClNa$  y 7.0 ml de  $CHCl_3$ , para el bisfenol A silanizado, 120.0 g de  $ClNa$  y el mismo volumen de disolvente, son suficientes para obtener la máxima señal. Los correspondientes diglicidiléteres muestran un comportamiento muy similar respecto a estas dos variables, estando la cantidad óptima de  $NaCl$  necesaria comprendida entre 80.0 y 85.0 g y volumen de triclorometano en 5.5 ml, menor en ambos casos que los valores correspondientes a bisfenol F y bisfenol A respectivamente. Esta diferencia se puede atribuir a la menor polaridad de los diglicidiléteres que repercute en la necesidad de un menor efecto “salting out” y en una mayor solubilidad de los compuestos en triclorometano. Como solución de compromiso, se seleccionó 80 g de  $ClNa$  y 5.0 ml de triclorometano, valores próximos a los óptimos obtenidos para los diglicidiléteres, ya que estos compuestos presentan menores señales analíticas.

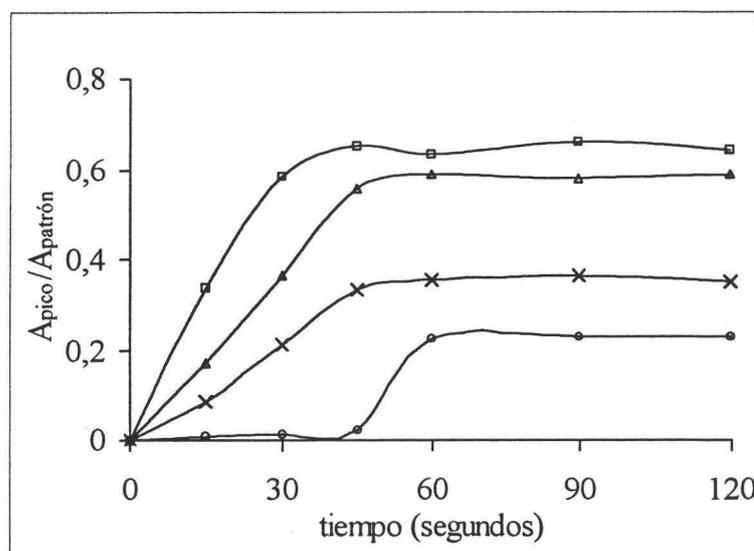
### 3.2.2.3. Influencia del tiempo de agitación.

Se estudió así mismo el tiempo de agitación mecánica necesario para llevar a cabo la extracción líquido-líquido. Para ello en una serie de matraces aforados de 500

ml de capacidad se prepararon disoluciones acuosas que contenían  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de bisfenol F y bisfenol A y  $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de los correspondientes diglicidiléteres. Tras transvasar las disoluciones a los correspondientes embudos de decantación, se añadieron 80 g de cloruro sódico y se extrajo con 5 ml de triclorometano agitando durante tiempos crecientes a 1700 r.p.m. Los extractos orgánicos se trataron del modo habitual y se inyectaron en el cromatógrafo de gases fijando las condiciones instrumentales mostradas en la tabla IV.3.1. Los resultados experimentales obtenidos, se muestran en la tabla IV.3.13 y se representan en la figura IV.3.13.

*Tabla IV.3.13. Influencia del tiempo de agitación.*

tiempo (s)	Bisfenol F-Sil	Bisfenol A-Sil	BFDGE	BADGE
0.0	0.000	0.000	0.0000	0.000
15.0	0.009	0.335	0.1690	0.086
30.0	0.015	0.584	0.3658	0.211
45.0	0.023	0.650	0.5563	0.333
60.0	0.224	0.635	0.5895	0.353
90.0	0.227	0.662	0.5799	0.362
120.0	0.231	0.641	0.5884	0.353



*Figura IV.3.13. Influencia del tiempo de agitación para bisfenol F (o), bisfenol A (□), BFDGE (Δ) y BADGE (x).*

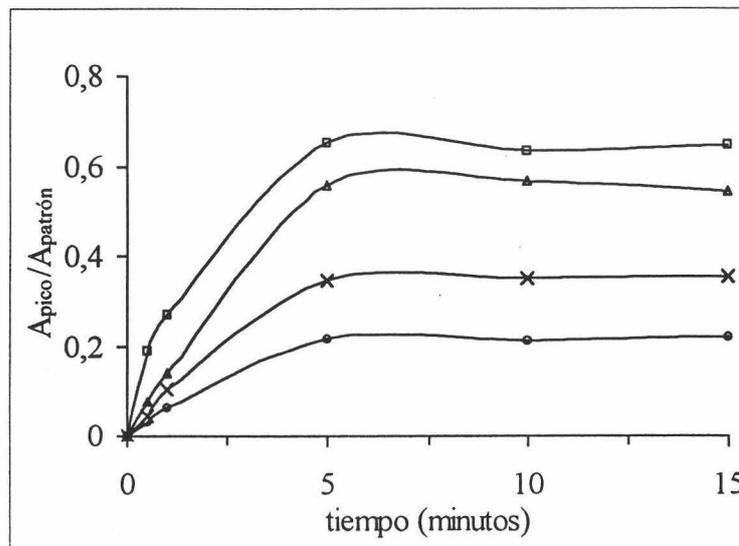
De la observación de la anterior gráfica IV.3.13. se deduce que el cociente de áreas se incrementa al hacerle el tiempo de agitación, hasta alcanzar un máximo aproximadamente a 60 segundos para el bisfenol F silanizado, 30 segundos para el bisfenol A silanizado, y 45 segundos para los correspondientes diglicidiléteres. Por tanto, el tiempo mínimo de agitación necesario, para llevar a cabo la extracción líquido-líquido, es de un minuto, tiempo que fue seleccionado para la realización de experiencias posteriores.

#### 3.2.2.4. *Tiempo de separación de las fases.*

Para llevar a cabo este estudio se preparó una serie de cuatro disoluciones que en un volumen final de 500 ml contenía  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de bisfenol F y bisfenol A y  $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de los correspondientes diglicidiléteres. Tras trasvasar las disoluciones a los correspondientes embudos de decantación, se disolvieron 80 g de cloruro sódico se extrajo según el procedimiento habitual. Los extractos orgánicos fueron recogidos y tras tratarlos del modo habitual se inyectaron en el cromatógrafo de gases fijando las condiciones instrumentales empleadas a lo largo de este apartado. En la tabla y figura IV.3.14 se muestran los resultados obtenidos.

*Tabla IV.3.14. Influencia del tiempo de separación de las fases*

tiempo (min)	Bisfenol F-Sil	Bisfenol A-Sil	BFDGE	BADGE
0.0	0.000	0.000	0.000	0.000
0.5	0.030	0.190	0.075	0.045
1.0	0.065	0.268	0.140	0.102
5.0	0.215	0.652	0.556	0.345
10.0	0.210	0.635	0.565	0.350
15.0	0.218	0.645	0.542	0.356



*Figura IV.3.14. Influencia del tiempo de agitación para bisfenol F (o), bisfenol A (□), BFDGE (Δ) y BADGE (x).*

Se observa que en todos los casos cinco minutos es tiempo suficiente para una adecuada separación de la fase orgánica y acuosa, alcanzándose la señal máxima a este tiempo y manteniéndose constante para tiempos mayores

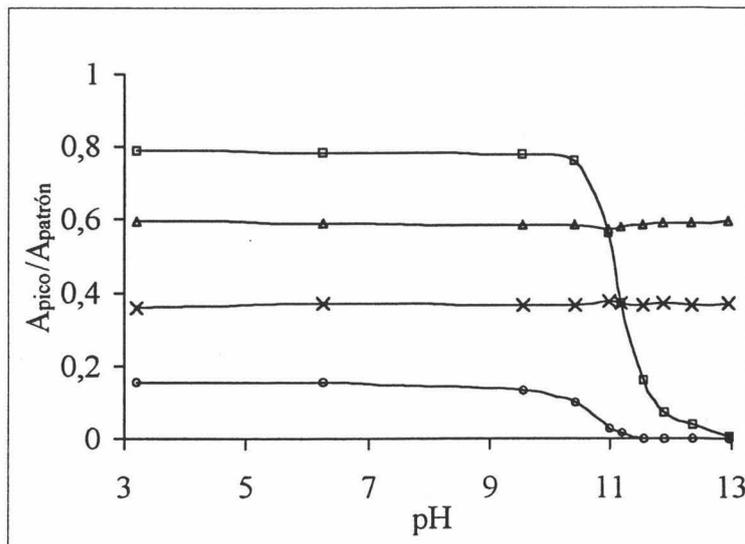
#### *3.2.2.5. Influencia del pH.*

Se estudió por último la influencia del pH del medio sobre el rendimiento de extracción mediante medidas cromatográficas. Para ello, en una serie de matraces aforados de 500 ml de capacidad se prepararon disoluciones acuosas que contenían  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de bisfenol F y bisfenol A y  $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de BFDGE y BADGE respectivamente. Se adicionó agua desionizada hasta un volumen próximo al enrase y mediante la adición de HCl o NaOH de diferentes concentraciones se fijó el pH deseado, tras lo cual se enrasó con agua desionizada y se repitió la medida del pH. A continuación se transvasaron las disoluciones a embudos de decantación de 500 ml de capacidad donde se extrajeron siguiendo el procedimiento operatorio habitual. Finalmente, se inyectó el extracto, previa derivatización con TMSA, fijando las condiciones instrumentales habituales.

Los resultados obtenidos, se muestran en la tabla IV.3.15 y se representan en la figura IV.3.15.

*Tabla IV.3.15. Influencia del pH del medio.*

pH	Bisfenol F-Sil	Bisfenol A-Sil	BFDGE	BADGE
3.20	0.154	0.787	0.596	0.361
6.25	0.153	0.783	0.590	0.372
9.56	0.132	0.778	0.583	0.365
10.42	0.101	0.761	0.585	0.362
11.00	0.025	0.563	0.575	0.375
11.21	0.016	0.369	0.579	0.37
11.56	0.002	0.157	0.586	0.364
11.90	0.001	0.072	0.589	0.368
12.35	0.000	0.036	0.593	0.365
12.95	0.000	0.004	0.595	0.372



*Figura IV.3.15. Influencia del pH del medio para bisfenol F-Sil (o), bisfenol A-Sil (□), BFDGE (Δ) y BADGE (x).*

El cociente de áreas para bisfenol F y bisfenol A ambos silanizados permanece constante y presenta un valor máximo para pH inferiores a 9 y 10 respectivamente, mientras que para pH superiores disminuye rápidamente, haciéndose prácticamente despreciable. Se concluye por tanto que son las formas protonadas de bisfenol F y A las

que se extraen en triclorometano, no haciéndolo las formas disociadas, hecho que coincide con las conclusiones alcanzadas en el capítulo dedicado a fluorimetría. Por otra parte los derivados diglicidiléter presentan una señal constante a lo largo de todo el intervalo de pH estudiado. Este hecho es atribuible a la no existencia de hidrógenos hidrolizables en sus moléculas y por tanto el pH no afecta sobre su extracción. El amplio intervalo de pH en el que permanece constante la señal permite que no sea necesario la adición de una disolución tampón para fijar el pH siempre que la muestra tenga un pH inferior a 9.

### 3.2.3. Resumen de las variables experimentales optimizadas.

En la tabla IV.3.16 se resumen las variables experimentales optimizadas para la determinación de bisfenol F silanizado, bisfenol A silanizado, BFDGE y BADGE en aguas residuales de distinta procedencia.

*Tabla IV.3.16. Resumen de las variables experimentales.*

Variable	Óptimo
Agente derivatizante	TMSA
$t_{\text{agitación}} (T_{\text{amb}})$ en silanización	1 min
Disolvente	CHCl <sub>3</sub>
$t_{\text{agitación}} (\text{min})$ en extracción	1 minuto
Volumen de disolvente	5 ml

## 3.3. Parámetros analíticos.

### 3.3.1. Establecimiento y verificación del modelo.

El modelo de calibración seleccionado fue el linear de regresión univariante por mínimos cuadrados. Se buscan los parámetros  $a$  y  $b$  partiendo de una serie de puntos experimentales correspondientes a valores de concentración y señal cromatográfica, calculada como cociente de áreas del compuesto y del patrón interno, siendo ésta como ya

se dijo con anterioridad en el caso del BFDGE, la suma de las áreas correspondientes a los picos cromatográficos de los tres isómeros.

Para establecer las funciones de calibrado se siguió el procedimiento que se describe a continuación. En una serie de seis matraces aforados de 500 ml de capacidad se introdujeron volúmenes crecientes (0.00, 0.10, 0.50, 1.00, 2.50 y 5.00 ml) de una disolución acuosa que contenía  $250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de bisfenol F,  $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de bisfenol A y  $5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de los correspondientes diglicidiléteres y tras enrasar con agua desionizada, se transvasaron las disoluciones así preparadas a embudos de decantación de 500 ml de capacidad, se disolvieron 80 gramos de ClNa, y se extrajeron con 5 ml de triclorometano, agitando mecánicamente durante 1 minuto a temperatura ambiente y a 1700 r.p.m. Tras decantar las fases durante 5 minutos, se separó la fase orgánica con ayuda del dispositivo diseñado para disolventes más densos que el agua y se secó con sulfato sódico anhidro, se preconcentró en rotavapor y se transfirió a un microvial cromatográfico de 200  $\mu\text{l}$  de capacidad se llevó hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno. Por último, se adicionaron 50  $\mu\text{l}$  de una mezcla 1:4 de TMSA y triclorometano que contenía  $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de antraceno deuterado, sustancia empleada como patrón interno. Se agitó durante un minuto a temperatura ambiente y se inyectó en el cromatógrafo de gases fijando las condiciones instrumentales mostradas en la tabla IV.3.1. De cada punto se realizaron dos réplicas experimentales. En la tabla IV.3.17 se muestran los principales parámetros estadísticos del modelo calculados según el procedimiento habitual y en la figura IV.3.16 se representan las señales obtenidas para cada compuesto.

*Tabla IV.3.17. Parámetros estadísticos de la regresión por mínimos cuadrados.*

Parámetro	Bisfenol F-Sil	Bisfenol A-Sil	BFDGE	BADGE
a	0.0005	0.0006	0.0099	0.0077
$s_a$	0.0007	0.0004	0.0223	0.0136
<b>b</b> ( $\text{l}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	0.0311	0.1552	0.0527	0.0313
$s_b$ ( $\text{l}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	0.0005	0.0014	0.0009	0.0053
$r^2$ (%)	99.54	99.93	99.78	99.76
$s_{RC}$	0.0015	0.0008	0.049	0.032
$P_{\text{lof}}$ (%)	42.26	30.09	20.58	30.33

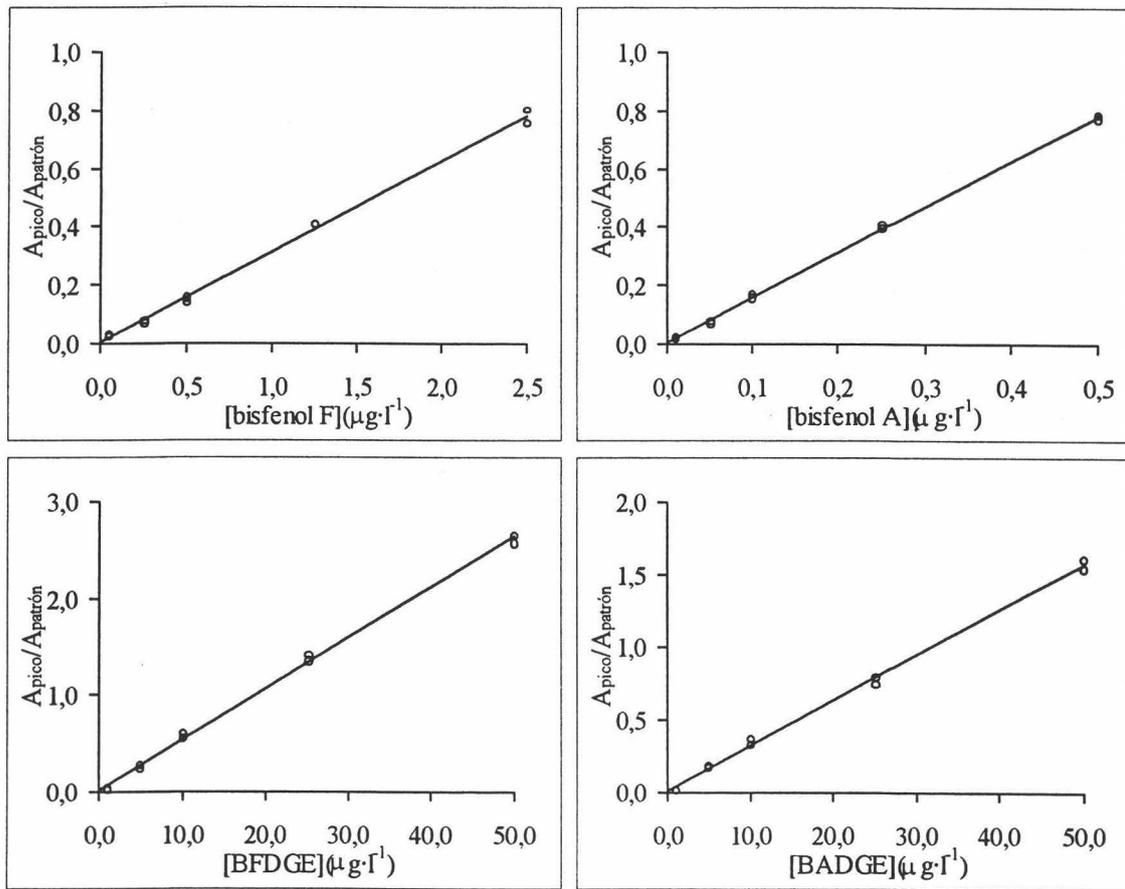
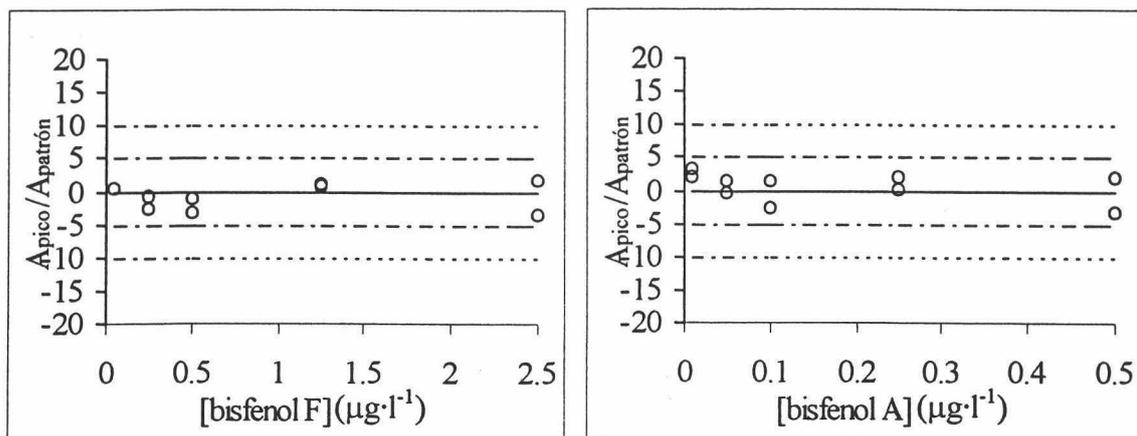


Figura IV.3.16. Calibrados con patrones.

Para evaluar el cumplimiento de homocedasticidad en los datos, se hizo uso del análisis gráfico de los residuales, comentado en el capítulo II. La representación gráfica de dichos residuales obtenida para los tres volúmenes utilizados es la mostrada en la figura IV.3.17.



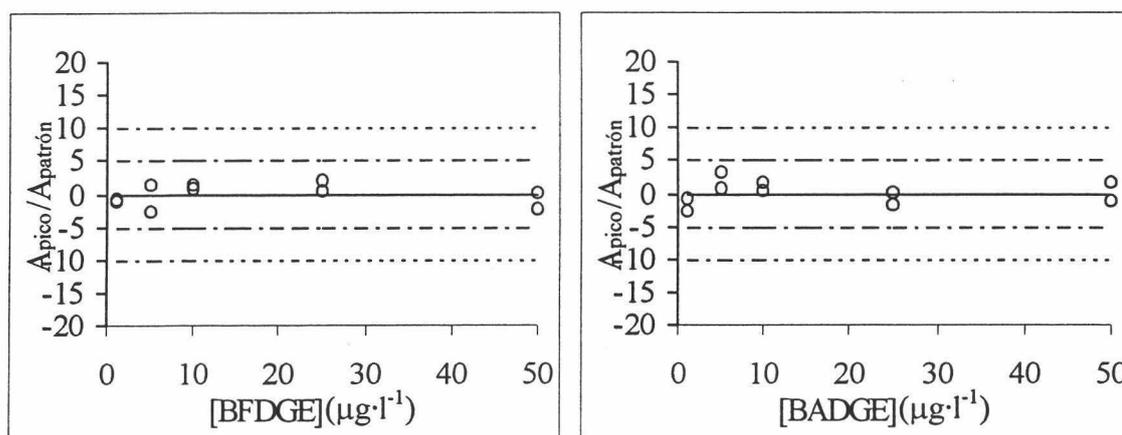


Figura IV.3.17. Evaluación de la condición de homocedasticidad.

Se cumplen las premisas fijadas en el capítulo II para el cumplimiento de la condición de homocedasticidad según el criterio adoptado en los cuatro casos. Por tanto es posible afirmar que los datos son homocedásticos.

### 3.3.2. Parámetros de calidad del método.

Los parámetros de calidad del modelo establecidos según los procedimientos descritos en el capítulo II de esta Memoria fueron: Rango dinámico lineal y linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión y sensibilidad analítica.

#### 3.3.2.1. Rango dinámico lineal y linealidad.

Los intervalos de trabajo seleccionados fueron  $0.05$  a  $2.50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para bisfenol F,  $0.01$  a  $0.50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para bisfenol A y  $1.0$  a  $50.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para ambos diglicidiléter.

Por otra parte la linealidad calculada resultó ser  $98.4 \%$  para el bisfenol F  $99.1 \%$  para el bisfenol A y  $98.3 \%$  y  $98.4 \%$  para los respectivos diglicidiléteres.

### 3.3.2.2. Límite de detección y cuantificación.

La determinación de estos dos parámetros de calidad, se realizó siguiendo la metodología descrita en el capítulo II.

#### A. Medida del blanco cromatográfico.

Para realizar esta experiencia, en matraces aforados de 500 ml de capacidad se prepararon diez disoluciones blanco, que se trataron según el procedimiento operatorio descrito con anterioridad. Los extractos finales fueron inyectados en el cromatógrafo de gases fijando las condiciones instrumentales habituales.

En la tabla IV.3.18 se muestran los valores de  $W_{0.5h}$  estimados a concentración "cero", los correspondientes  $W_{b0}$  calculados y los intervalos de integración para la obtención de la señal del blanco correspondientes a los cuatro analitos, siendo seleccionado en el caso del BFDGE el isómero que presentó una mayor sensibilidad.

*Tabla IV.3.18. Valores de  $W_{0.5h}$ ,  $W_{b0}$  y de los intervalos de integración.*

Blanco	$W_{0.5h}$	$W_{b0}$	$t_r \pm 0.5W_{b0}$
<b>BFF</b>	0.028	0.071	$6.590 \pm 0.036$
<b>BFA</b>	0.031	0.078	$7.020 \pm 0.039$
<b>BFDGE</b>	0.038	0.097	$9.100 \pm 0.049$
<b>BADGE</b>	0.048	0.121	$11.120 \pm 0.061$

Con estos datos se midió la señal correspondiente al blanco para cada una de las disoluciones empleadas. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.3.19.

Tabla IV.3.19. Señales del blanco.

Blanco	Bisfenol F-Sil	Bisfenol A-Sil	BFDGE	BADGE
01	$5.76 \cdot 10^{-4}$	$1.18 \cdot 10^{-4}$	$1.28 \cdot 10^{-4}$	$3.62 \cdot 10^{-4}$
02	$4.50 \cdot 10^{-4}$	$1.19 \cdot 10^{-4}$	$1.00 \cdot 10^{-4}$	$2.51 \cdot 10^{-4}$
03	$4.75 \cdot 10^{-4}$	$1.20 \cdot 10^{-4}$	$2.25 \cdot 10^{-3}$	$3.08 \cdot 10^{-3}$
04	$8.56 \cdot 10^{-4}$	$1.23 \cdot 10^{-4}$	$3.53 \cdot 10^{-3}$	$2.21 \cdot 10^{-3}$
05	$3.20 \cdot 10^{-4}$	$1.26 \cdot 10^{-4}$	$6.24 \cdot 10^{-3}$	$4.18 \cdot 10^{-3}$
06	$4.00 \cdot 10^{-4}$	$1.20 \cdot 10^{-4}$	$8.35 \cdot 10^{-4}$	$2.15 \cdot 10^{-4}$
08	$5.94 \cdot 10^{-4}$	$1.16 \cdot 10^{-4}$	$1.08 \cdot 10^{-3}$	$4.35 \cdot 10^{-3}$
09	$2.00 \cdot 10^{-4}$	$1.24 \cdot 10^{-4}$	$3.25 \cdot 10^{-4}$	$2.10 \cdot 10^{-4}$
10	$3.82 \cdot 10^{-4}$	$1.23 \cdot 10^{-4}$	$5.01 \cdot 10^{-3}$	$4.35 \cdot 10^{-3}$

B. Cálculo del límite de detección y de cuantificación.

El cálculo de los límites de detección y cuantificación se realizó suponiendo, de forma análoga a los métodos espectrofluorimétricos, que al límite de detección y cuantificación le corresponde una señal analítica que viene definida por la suma del valor medio de la señal correspondiente al blanco más tres veces la desviación estándar de dicha señal para el límite de detección y diez veces para el de cuantificación, de acuerdo con un nivel de confianza 99.5 %. En la tabla IV.3.20, se muestran los resultados obtenidos.

Tabla IV.3.20. Límite de detección y cuantificación del método.

	$S_{\text{blanco}}$	$b$ ( $\text{l} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ )	$C_L$ ( $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$ )	$C_Q$ ( $\text{ng} \cdot \text{l}^{-1}$ )
<b>Bisfenol F-Sil</b>	$1.88 \cdot 10^{-4}$	0.0311	18.0	60.0
<b>Bisfenol A-Sil</b>	$3.09 \cdot 10^{-4}$	0.1552	6.0	20.0
<b>BFDGE</b>	$2.28 \cdot 10^{-3}$	0.053	129.0	432.0
<b>BADGE</b>	$9.71 \cdot 10^{-4}$	0.031	93.0	310.0

3.3.2.3. *Precisión.*

La precisión del método analítico propuesto se ha evaluado a partir de la reproducibilidad de la señal analítica emitida por 10 disoluciones de concentración

constante e igual a  $1.25 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para bisfenol F,  $0.25 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para el bisfenol A y  $25 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para los diglicidiléter que corresponde en cada caso al valor central del rango lineal de concentraciones establecido con anterioridad. Las disoluciones fueron tratadas según el método establecido y los extractos inyectados en el cromatógrafo de gases fijando las condiciones instrumentales habituales. Finalmente se calcularon los parámetros mostrados en la tabla III.3.21.

*Tabla IV.3.21. Reproducibilidad del método analítico.*

	Bisfenol F-Sil	Bisfenol A-Sil	BFDGE	BADGE
<b>Señal media</b>	0.041	0.059	1.377	0.858
<b>Desviación estándar</b>	$2.26\cdot 10^{-3}$	$3.36\cdot 10^{-3}$	$8.35\cdot 10^{-2}$	$5.40\cdot 10^{-2}$
<b>DER (%)</b>	5.54	5.60	6.06	6.30

Las desviaciones estándar relativas son en todos los casos menores del 10 %. Puede concluirse por tanto que el método propuesto para la determinación de los analitos es reproducible en las condiciones de trabajo seleccionadas.

#### 3.3.2.4. Sensibilidad.

En la tabla IV.3.22 se muestran los valores de las sensibilidades del calibrado, así como de las sensibilidades analíticas para cada uno de los componentes de la mezcla, de acuerdo con la definición propuesta en el capítulo II de esta Memoria.

*Tabla IV.3.22. Sensibilidad del método analítico.*

	Bisfenol F-Sil	Bisfenol A-Sil	BFDGE	BADGE
<b>S<sub>RC</sub></b>	0.002	0.001	0.049	0.030
<b>b (<math>\text{l}\cdot\mu\text{g}^{-1}</math>)</b>	0.031	0.155	0.053	0.031
<b>S<sub>analítica</sub> (<math>\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math>)</b>	0.048	0.005	0.932	0.974

#### 3.3.2.5. Resumen de los parámetros analíticos.

En la tabla IV.3.23 se resumen los parámetros analíticos calculados.

*Tabla IV.3.23. Parámetros de calidad del método analítico.*

Parámetro	Bisfenol F-Sil	Bisfenol A-Sil	BFDGE	BADGE
<b>b</b> ( $l \cdot \mu g^{-1}$ )	0.0311	0.1552	0.0527	0.0313
<b>a</b>	0.0005	0.0006	0.0099	0.008
<b>r<sup>2</sup></b> (%)	99.76	99.93	99.78	99.77
<b>s<sub>RC</sub></b>	0.002	0.001	0.049	0.030
<b>RDL</b> ( $\mu g \cdot l^{-1}$ )	0.05-2.50	0.01-0.50	1.00-50.00	1.00-50.00
<b>C<sub>L</sub></b> ( $ng \cdot l^{-1}$ )	18.0	6.0	130.0	93.0
<b>C<sub>Q</sub></b> ( $ng \cdot l^{-1}$ )	60.0	20.0	432.0	310.0
<b>DER</b> (%)	5.54	5.60	6.06	6.30
<b>S<sub>analítica</sub></b> ( $ng \cdot l^{-1}$ )	48.0	5.0	932.0	974.0

### 3.4. Aplicaciones y validación del método.

El método analítico propuesto para la determinación de bisfenol F, bisfenol A y sus correspondientes diglicidiléteres por cromatografía de gases-espectrometría de masas se aplicó a muestras de agua residual urbana de las ciudades de Granada, Loja (Granada) y Melilla. En todos los casos la metodología empleada fue la de adición de patrón, ya desarrollada en el capítulo II de esta Memoria de doctorado. Esta metodología implica la realización de tres experiencias de calibrado, un calibrado con patrones, un calibrado de adición de patrón y otro calibrado empleando porciones crecientes de muestra, denominado de Youden.

Con objeto de minimizar la formación de emulsiones en la interfase entre el disolvente orgánico y la muestra acuosa, hecho que impide la separación adecuada del disolvente orgánico durante el proceso de extracción líquido-líquido, fue necesario llevar a cabo una dilución previa de las muestras. Se estudió para ello, el comportamiento de cada una de las aguas residuales adicionando en cada caso el volumen mínimo de agua destilada necesario para prevenir la formación de dichas emulsiones. Así, se observó que los volúmenes máximos de agua residual que se podían emplear eran de 50 ml para el agua de la ciudad de Granada, 250 ml para la de la ciudad de Loja (Granada) y 500 ml para la de la ciudad autónoma de Melilla,

suponiendo por tanto respecto al volumen final de 500 ml diluciones 1/10 para el agua procedente de la ciudad de Granada, 1/2 para la procedente de la ciudad de Loja (Granada) y por último, no se diluyó el agua residual procedente de la ciudad de Melilla. A continuación se muestran las tres experiencias de calibrado realizadas para aplicar la metodología de adición de patrón.

### 3.4.1. *Calibrados con patrones, adición de patrón y Youden.*

En primer lugar se realizó el calibrado con patrones. En el apartado anterior se desarrolló este calibrado para los cuatro compuestos, obteniéndose sus correspondientes parámetros de calidad. Para establecer la metodología de adición de patrón, se empleó la ordenada en el origen (*a*), la pendiente (*b*) y la desviación estándar de la regresión  $S_{RC}$ . Estos valores se recogen de nuevo en la tabla de validación correspondiente a cada compuesto.

En segundo lugar se estableció el calibrado con adición de patrón. Para ello, se tomaron cinco alícuotas diferentes para cada tipo de agua residual adecuadamente diluidas y dopadas de manera que las concentraciones finales después de diluir al volumen final de 500 ml, fueron  $0.250 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de bisfenol F,  $0.050 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de bisfenol A y  $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de los correspondientes diglicidiléter. A continuación se adicionaron volúmenes crecientes de disolución patrón de los cuatro compuestos, para obtener concentraciones finales comprendidas en los rangos 0.0 a  $2.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para el bisfenol F, 0.0 a  $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para el bisfenol A y 0.0 a  $40.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para los dos diglicidiléter y se extrajeron según el procedimiento habitual. Finalmente se inyectaron los extractos obtenidos en el cromatógrafo de gases fijando las condiciones instrumentales habituales. Los resultados obtenidos se recogen en la tabla de validación correspondiente a cada compuesto.

Por último se realizó el calibrado de Youden, para lo cual en matraces aforados de 500 ml de capacidad se tomaron volúmenes crecientes de agua residual y se enrasaron a un volumen final de 500 ml con agua desionizada de forma que se

obtuvieron las proporciones finales mostradas en la tabla. A continuación se extrajeron las disoluciones según el procedimiento operatorio habitual y se inyectó en el cromatógrafo de gases fijando las condiciones instrumentales empleadas a lo largo de este apartado.

*Tabla IV.3.24. Volúmenes empleados en el calibrado de Youden.*

Granada		Loja		Melilla	
$V_{\text{muestra}}$	$V_{\text{m}}/V_{\text{total}}$	$V_{\text{m}}$	$V_{\text{m}}/V_{\text{total}}$	$V_{\text{m}}$	$V_{\text{m}}/V_{\text{total}}$
20 ml	0.04	100 ml	0.20	200 ml	0.40
30 ml	0.06	150 ml	0.30	300 ml	0.60
40 ml	0.08	200 ml	0.40	400 ml	0.80

### 3.4.2. Comprobación de la exactitud del método.

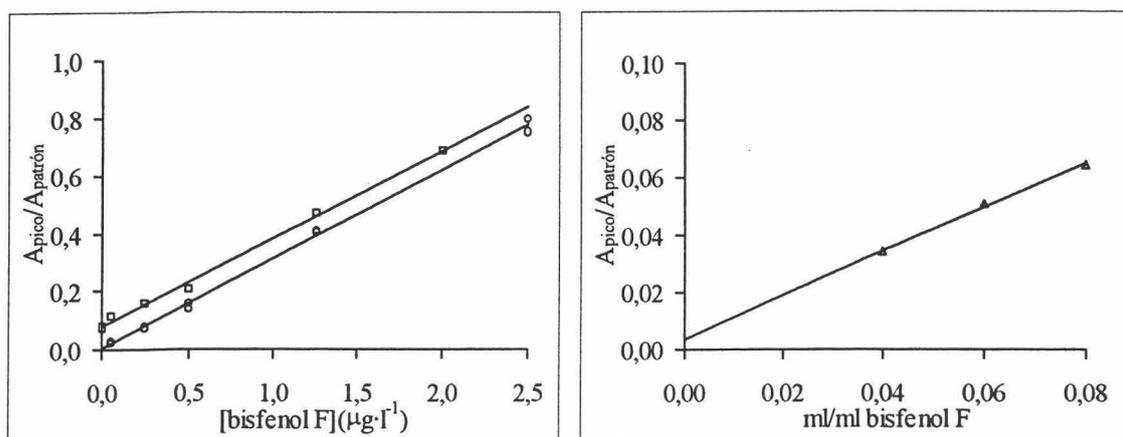
Para verificar la exactitud del método, con ayuda del programa informático Alamín, se llevó a cabo el cálculo estadístico desarrollado en el capítulo II de esta Memoria de Doctorado. Los resultados obtenidos para cada uno de los compuestos y en cada una de las muestras de agua residual consideradas para aplicar el método son mostrados en las tablas IV.3.25 a 28 y representados en las figuras IV.3.18 a IV.3.29.

#### 3.4.2.1. Parámetros del bisfenol F silanizado.

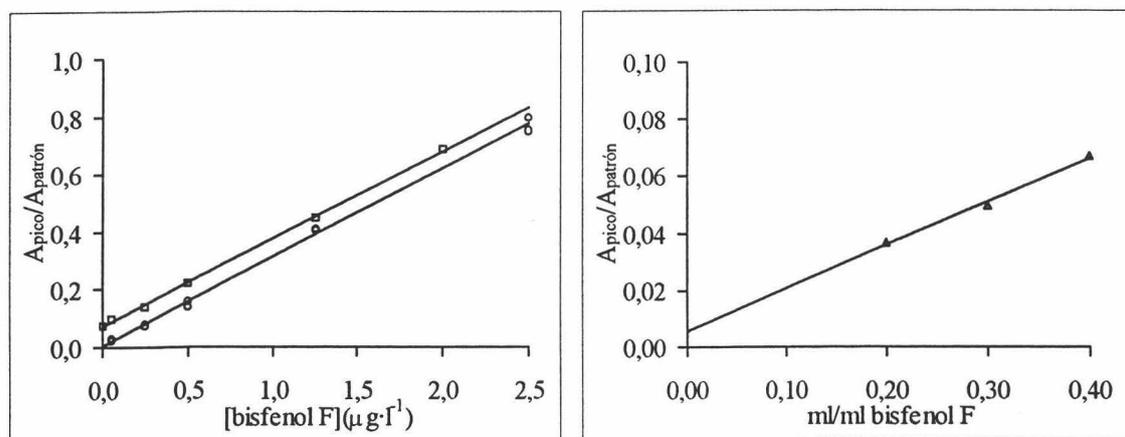
En la tabla IV.3.25 se muestran los parámetros calculados para el bisfenol F en las aguas residuales de Granada, Loja y Melilla.

*Tabla IV.3.25. Parámetros de los calibrados para el bisfenol F. Granada, Loja y Melilla.*

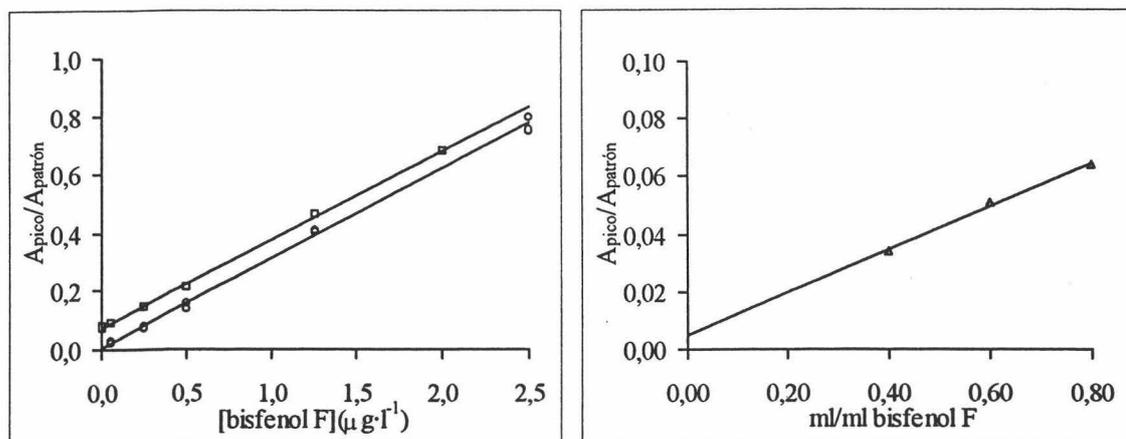
	CP	CA	CY	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>N</b>	10	5	3	10	5	5	10	5	3
<b>A</b>	0.0005	0.0082	0.0004	0.0005	0.0073	0.0005	0.0005	0.077	0.0005
<b>b (l·μg<sup>-1</sup>)</b>	0.0311	0.0304	0.0766	0.0311	0.0305	0.0152	0.0311	0.0305	0.0075
<b>s<sub>RC</sub></b>	0.0015	0.0017	0.0001	0.0015	0.0008	0.0001	0.0015	0.0012	0.0002
<b>S<sub>p</sub></b>	0.0016			0.0013			0.0014		
<b>t (b)</b>	0.6212 (P=54.70%)			0.6598 (P=52.28 %)			0.620 (P=51.40%)		
<b>b<sub>p</sub> (l·mg<sup>-1</sup>)</b>	0.0309			0.0309			0.0309		
<b>A'</b>	0.0007	0.0078	---	0.006	0.071	---	0.0006	0.0072	---
<b>BY</b>	-0.000			-0.001			0.0000		
<b>C<sub>X,S</sub> (mg·l<sup>-1</sup>)</b>	0.246	---	---	0.228	---	---	0.241	---	---
<b>C<sub>X,A</sub> (mg·l<sup>-1</sup>)</b>	---	0.241	---	---	0.218	---	---	0.233	---
<b>t (c)</b>	0.199 (P= 84.60%)			0.402 (P=69.60%)			0.300 (P=77.00%)		



**Figura IV.3.18.** Calibrado con patrones (○), adición de patrón (□) y Youden (Δ) para el bisfenol F en el agua residual de la ciudad de Granada.



**Figura IV.3.19.** Calibrado con patrones (○), adición de patrón (□) y Youden (Δ) para el bisfenol F en el agua residual de la ciudad de Loja.



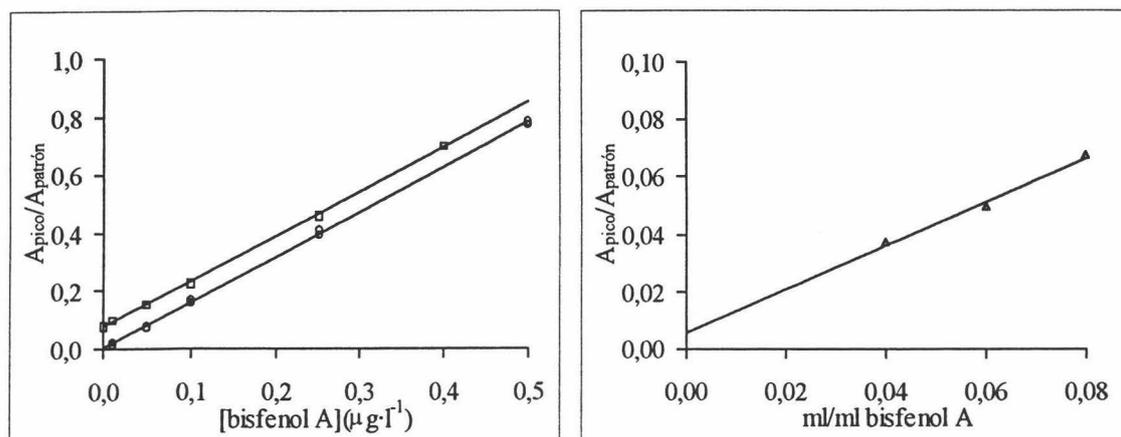
**Figura IV.3.20.** Calibrado con patrones (○), adición de patrón (□) y Youden (Δ) para el bisfenol F en el agua residual de la ciudad de Melilla.

3.4.2.2. *Parámetros del bisfenol A silanizado.*

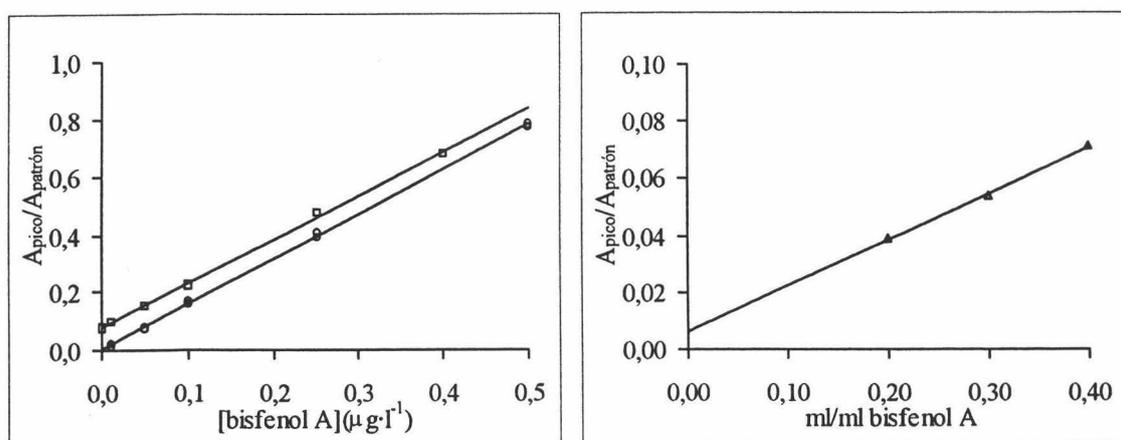
En la tabla IV.3.26 se muestran los parámetros calculados para el bisfenol F en las aguas residuales de Granada, Loja y Melilla.

*Tabla IV.3.26. Parámetros de los calibrados para el bisfenol A. Granada, Loja y Melilla.*

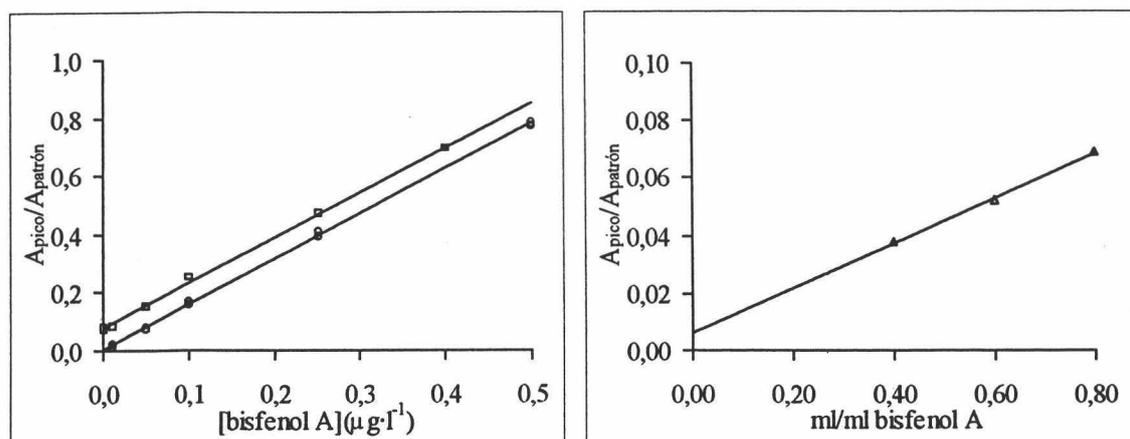
	CP	CA	CY	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>n</b>	10	5	3	10	5	3	10	5	3
<b>a</b>	0.0006	0.0077	0.0006	0.0006	0.0081	0.0006	0.0006	0.0079	0.0006
<b>b (l·μg<sup>-1</sup>)</b>	0.1552	0.1543	0.0765	0.1552	0.1529	0.0162	0.1552	0.1550	0.0078
<b>s<sub>RC</sub></b>	0.0008	0.0005	0.0001	0.0008	0.0009	0.0001	0.0008	0.0014	0.0002
<b>s<sub>p</sub></b>	0.0007			0.0009			0.0009		
<b>t (b)</b>	0.4328 (P=67.40%)			0.2992 (P= m37.30%)			0.0832 (P=93.40%)		
<b>b<sub>p</sub> (l·mg<sup>-1</sup>)</b>	0.1549			0.1544			0.1552		
<b>a'</b>	0.0001	0.0077	---	0.0001	0.0078	---	0.0007	0.0079	---
<b>BY</b>	0.0001			-0.0002			0.0000		
<b>C<sub>X,S</sub> (mg·l<sup>-1</sup>)</b>	0.046	---	---	0.051	---	---	0.047	---	---
<b>C<sub>X,A</sub> (mg·l<sup>-1</sup>)</b>	---	0.047	---	---	0.047	---	---	0.048	---
<b>t (c)</b>	0.404 (P=69.40%)			1.409 (P=18.60%)			1.283 (P=78.20%)		



*Figura IV.3.21. Calibrado con patrones (○), adición de patrón (□) y Youden (Δ) para el bisfenol A en el agua residual de la ciudad de Granada.*



*Figura IV.3.22. Calibrado con patrones (○), adición de patrón (□) y Youden (Δ) para el bisfenol A en el agua residual de la ciudad de Loja.*



*Figura IV.3.23. Calibrado con patrones (○), adición de patrón (□) y Youden (Δ) para el bisfenol A en el agua residual de la ciudad de Melilla.*

3.4.2.3. *Parámetros del bisfenol F diglicidiléter.*

En la tabla IV.3.27 se muestran los parámetros calculados para el bisfenol F en las aguas residuales de Granada, Loja y Melilla.

*Tabla IV.3.27. Parámetros de los calibrados para el BFDGE. Granada, Loja y Melilla.*

	CP	CA	CY	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>n</b>	10	5	3	10	5	3	10	5	3
<b>a</b>	0.0099	0.2789	0.0095	0.0099	0.2863	0.0095	0.0099	0.2715	0.0099
<b>b (l·μg<sup>-1</sup>)</b>	0.0527	0.0537	2.5750	0.0527	0.0528	0.5325	0.0527	0.0542	0.2735
<b>s<sub>RC</sub></b>	0.0494	0.0312	0.0012	0.0494	0.0791	0.0009	0.0494	0.0431	0.0099
<b>s<sub>p</sub></b>	0.0437			0.0573			0.0458		
<b>t (b)</b>	0.7181 (P=48.80%)			0.0478 (P=96.20%)			1.0540 (P=31.40%)		
<b>b<sub>p</sub> (l·mg<sup>-1</sup>)</b>	0.0530			0.0527			0.0532		
<b>a'</b>	0.0054	0.2874	---	0.0095	0.2841	---	0.0015	0.2878	---
<b>BY</b>	0.0041			0.0000			0.0085		
<b>C<sub>X,S</sub> (mg·l<sup>-1</sup>)</b>	4.90	---	---	4.83	---	---	5.10	---	---
<b>C<sub>X,A</sub> (mg·l<sup>-1</sup>)</b>	---	5.07	---	---	5.25	---	---	4.91	---
<b>t (c)</b>	0.363 (P=72.34%)			0.6850 (P=50.80%)			0.0387 (P=70.60%)		

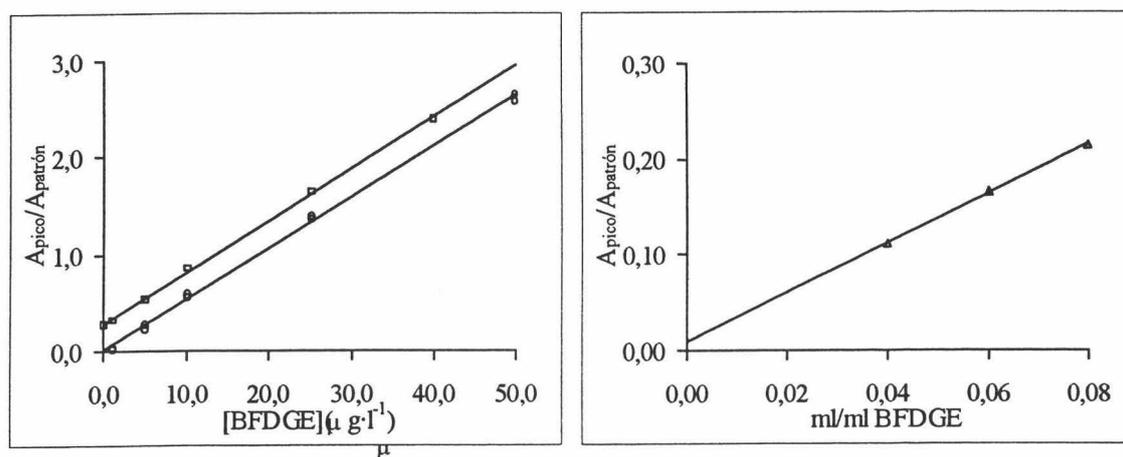


Figura IV.3.24. Calibrado con patrones (○), adición de patrón (□) y Youden (Δ) para el BFDGE en el agua residual de la ciudad de Granada.

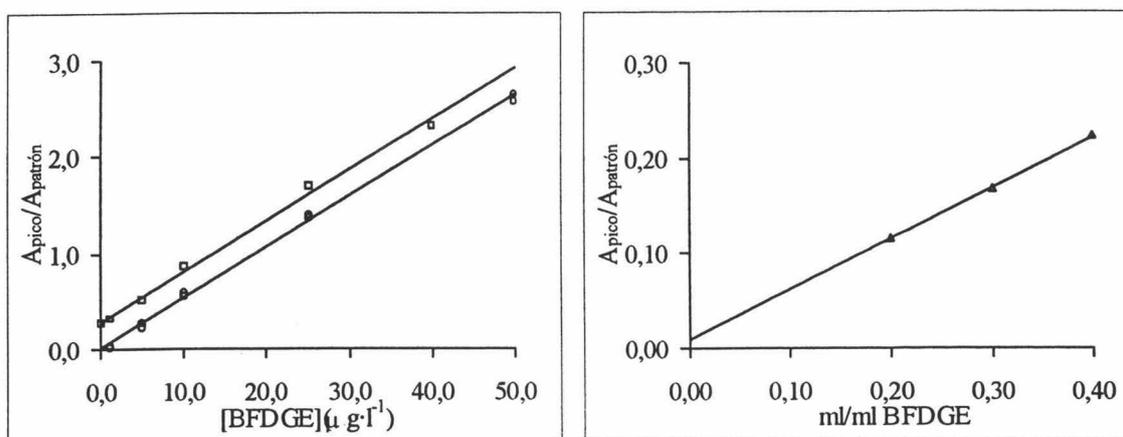


Figura IV.3.25. Calibrado con patrones (○), adición de patrón (□) y Youden (Δ) para el BFDGE en el agua residual de la ciudad de Loja.

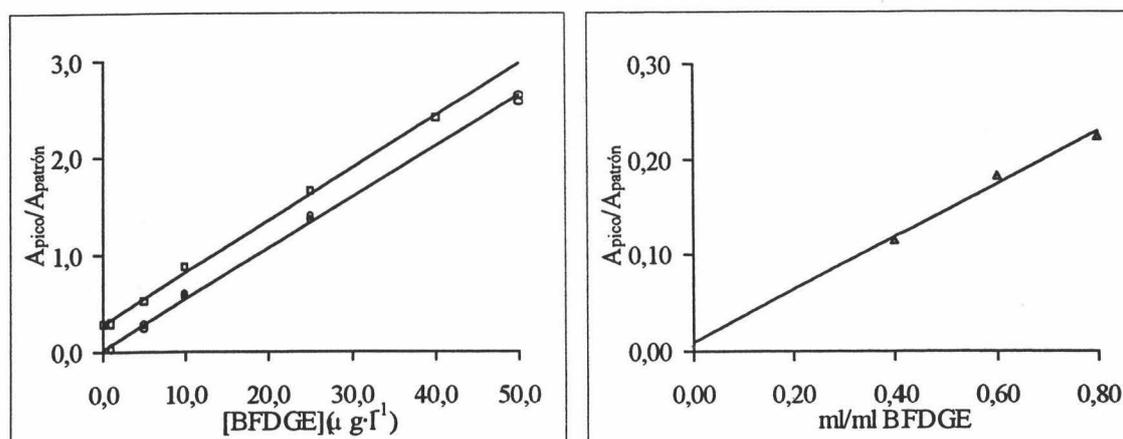


Figura IV.3.26. Calibrado con patrones (○), adición de patrón (□) y Youden (Δ) para el BFDGE en el agua residual de la ciudad de Melilla.

3.4.2.4. *Parámetros del bisfenol A diglicidiléter.*

En la tabla IV.3.28 se muestran los parámetros calculados para el bisfenol A diglicidiléter en las aguas residuales de Granada, Loja y Melilla.

*Tabla IV.3.28. Parámetros de los calibrados para el BADGE. Granada, Loja y Melilla.*

	CP	CA	CY	CP	CA	CY	CP	CA	CY
<b>n</b>	10	5	3	10	5	3	10	5	3
<b>a</b>	0.0078	0.1493	0.0078	0.0078	0.1538	0.0079	0.0078	0.1590	0.0078
<b>b (l·μg<sup>-1</sup>)</b>	0.0313	0.0310	1.5450	0.0313	0.0309	0.3080	0.0313	0.0305	0.1515
<b>s<sub>RC</sub></b>	0.0302	0.0358	0.0016	0.0302	0.0281	0.0015	0.0302	0.0283	0.0016
<b>s<sub>p</sub></b>	0.0323			0.0324			0.0306		
<b>t (b)</b>	0.333 (P=74.50%)			0.3946 (P=70.10%)			0.9546 (P=36.0%)		
<b>b<sub>p</sub> (l·mg<sup>-1</sup>)</b>	0.0312			0.0312			0.0310		
<b>a'</b>	0.0094	0.1462	---	0.1000	0.1485	---	0.0085	0.1509	
<b>BY</b>	0.0015			0.0021			0.0042		
<b>C<sub>X,S</sub> (mg·l<sup>-1</sup>)</b>	4.72	---		4.97	---		5.08	---	
<b>C<sub>X,A</sub> (mg·l<sup>-1</sup>)</b>	---	4.53		---	4.68		---	4.88	
<b>t (c)</b>	0.337 (P=74.20%)			0.180 (P=86.04%)			0.123 (P=90.40%)		

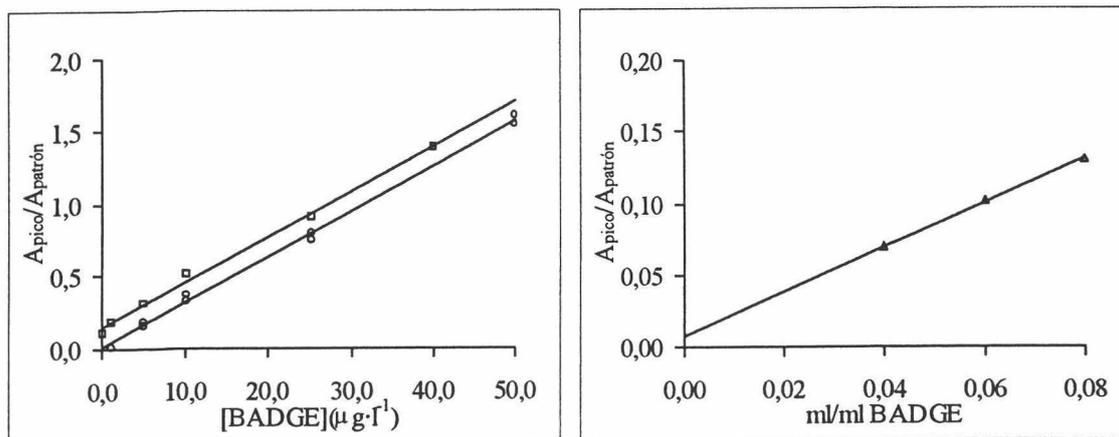


Figura IV.3.27. Calibrado con patrones (○), adición de patrón (□) y Youden (Δ) para el BADGE en el agua residual de la ciudad de Granada.

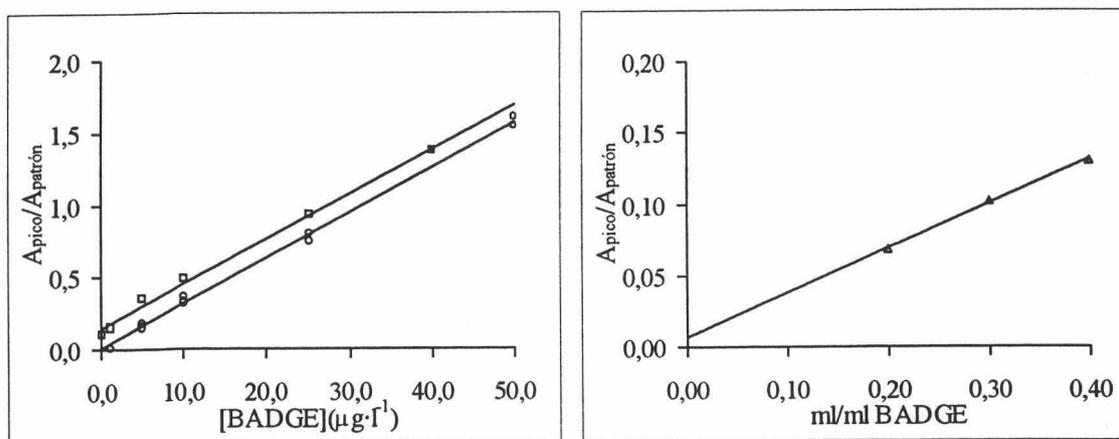


Figura IV.3.28. Calibrado con patrones (○), adición de patrón (□) y Youden (Δ) para el BADGE en el agua residual de la ciudad de Loja.

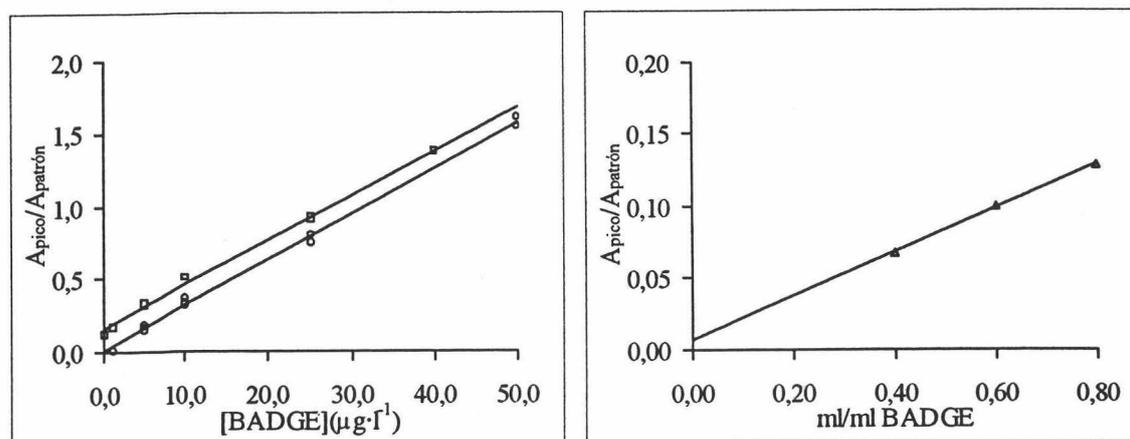


Figura IV.3.29. Calibrado con patrones (○), adición de patrón (□) y Youden (Δ) para el BADGE en el agua residual de la ciudad de Melilla.

Los resultados obtenidos, ponen de manifiesto que:

- En la comparación de las pendientes de ambos calibrados, en todos los casos se obtiene una conclusión no significativa, o sea, se concluye por  $H_0$  ( $P > 10\%$ ) las pendientes son iguales.
- En todos los casos el valor de  $a_Y$  estaba incluido en el intervalo calculado para la  $a'_S$ .
- Al comparar el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con patrones ( $c_{x,S}$ ) y el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con adición de patrón ( $c_{x,A}$ ), se observó que en todos los casos la conclusión es por  $H_0$  ( $P > 5\%$ ), es decir el método es exacto para los cuatro analitos con un nivel de significación mayor del 5%.

El método queda *validado* para la determinación de bisfenol F, bisfenol A y sus correspondientes diglicidil éteres en aguas residuales de las ciudades de Granada, Loja (Granada) y Melilla.

#### 4. DETERMINACIÓN DE TRIETILENGLICOL DIMETACRILATO (TEGDMA), BISFENOL A, BISFENOL A DIMETACRILATO (BIS-DMA) Y BISFENOL A DIGLICIDIL DIMETACRILATO (BIS-GMA) EN SALIVA HUMANA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

En este apartado se desarrolla un método sensible y selectivo para la determinación de trietilenglicol dimetacrilato (TEGDMA), bisfenol A, bisfenol A dimetacrilato (bis-DMA) y bisfenol A diglicidil dimetacrilato (bis-GMA) en saliva humana humana empleando como técnica la cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas (CG-MS).

Como ya se dijo en la introducción de esta Memoria, desde los años 60 este tipo de sustancias se han empleado en odontología para la fabricación de materiales utilizados tanto en la restauración de piezas dentales como en la fabricación de composites y selladores. Generalmente estas resinas se fabrican a partir de los monómeros bis-GMA y/o bis-DMA y suponen una alternativa al uso de las amalgamas. El primero de ellos es más ampliamente utilizado hoy día en la fabricación de este tipo de resinas, debido a sus adecuadas propiedades mecánicas, estabilidad química y térmica y su facilidad para simular el color natural de los dientes. En la fabricación de estas resinas, se emplea además el trietilenglicol dimetacrilato (TEGDMA) como diluyente para disminuir la viscosidad inicial de las resinas.

En la práctica de la odontología estas resinas se polimerizan en la boca del paciente, mediante un proceso de fotoactivación con luz visible. Sin embargo, este proceso no asegura la polimerización completa de las mismas, es decir, pueden quedar monómeros residuales no polimerizados tanto de bis-DMA como del bis-GMA, o TEGDMA. Además, el bisfenol A también puede estar presente como impureza o como producto de degradación de ambos monómeros. Por tanto, es posible encontrar restos de estos cuatro compuestos en las salivas de pacientes sometidos a este tipo de tratamientos. Dada la actividad biológica que presentan estos compuestos y que se

recoge en la Introducción de esta Memoria, es importante obtener métodos sensibles y selectivos para su determinación en muestras de saliva humana procedente de pacientes sometidos a este tipo de tratamientos.

#### **4.1. Caracterización de los compuestos mediante CG-MS. Establecimiento del método cromatográfico.**

Experiencias previas pusieron de manifiesto que tanto TEGDMA como bisfenol A y bis-DMA son compuestos que presentan estabilidad térmica y volatilidad suficientes para ser determinados de forma directa mediante cromatografía de gases. Sin embargo, la determinación de bis-GMA en las condiciones habituales de trabajo no fue posible debido probablemente a su baja volatilidad.

Se observó que el tratamiento térmico de este compuesto daba lugar a la aparición de tres picos cromatográficos mayoritarios identificados por la librería del cromatógrafo de gases como bisfenol A diglicidiléter, además de una pequeña cantidad de bisfenol A. Se pensó por tanto en la posibilidad de utilizar dicha característica para la determinación conjunta de los cuatro compuestos modificando la temperatura del portal de inyección y provocando así la descomposición térmica del bis-GMA.

Para establecer el comportamiento de cada uno de los compuestos al incrementar la temperatura de inyección, se prepararon cuatro disoluciones etanólicas individuales de cada analito que contenían  $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de TEGDMA,  $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de bisfenol A,  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  bis-DMA y  $500 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de bis-GMA respectivamente y todas ellas  $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de bisfenol F empleado como patrón interno. A continuación se inyectaron en el cromatógrafo de gases en modo Scan manteniendo constantes las condiciones instrumentales mostradas en la tabla IV.4.1 y modificando la del temperatura inyector en el intervalo comprendido entre  $200 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $300 \text{ }^\circ\text{C}$ , que es la máxima recomendada por las especificaciones de la columna cromatográfica.

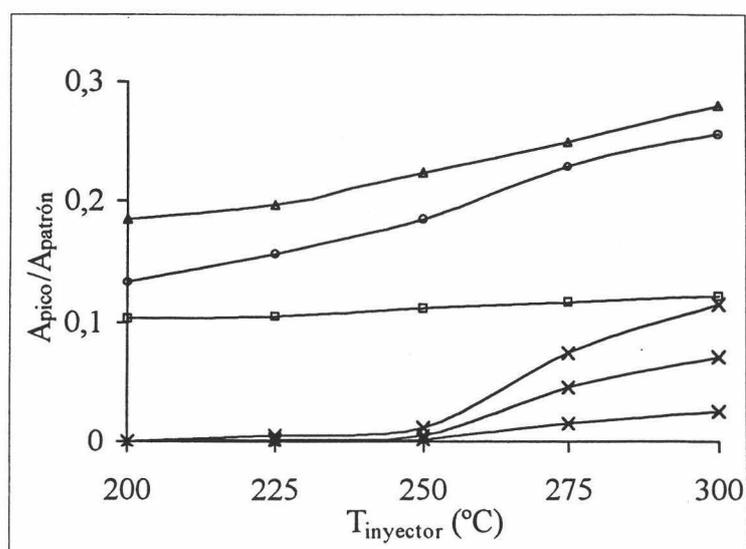
Tabla IV.4.1. Variables instrumentales.

CG		MS	
Variable	Valor	Variable	Valor
Flujo total del gas portador	100 ml/min	Temperatura Interfase GC-MS	280°C
Flujo de purga Séptum	3 ml/min	Rango m/z del espectro de masas	40-600
Presión en cabeza de columna	10 psi	Modo	SCAN
Temperatura Inyector	200 a 300 °C	Voltaje del electro-multiplicador	1750-2100
Temperatura inicial de la columna	150 °C	Dwell	100
Programación Temperatura del horno	30 °C/min 270°C (7min) 5°C/min, 300°C (1 min)		
Volumen Inyectado	2 µl		

En la tabla IV.4.2 y figura IV.4.1 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla IV.4.2. Evolución de la señal cromatográfica con la T<sup>a</sup> de inyección.

Compuesto	200 °C	225 °C	250 °C	275 °C	300 °C
TEGDMA	0.133	0.156	0.186	0.236	0.256
Bisfenol A	0.102	0.104	0.112	0.116	0.122
Bis-DMA	0.185	0.198	0.225	0.249	0.279
Bis-GMA	0.000	0.000	0.002	0.002	0.025
	0.000	0.005	0.011	0.075	0.115
	0.000	0.005	0.005	0.046	0.070



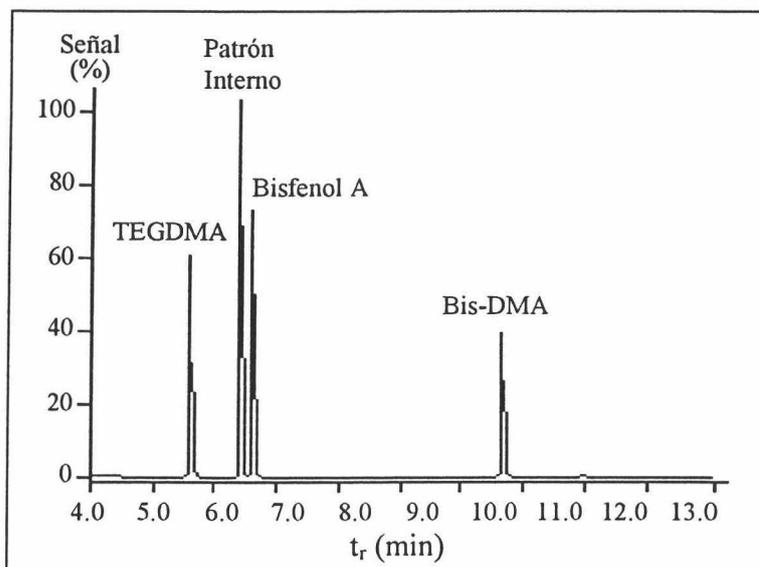
**Figura IV.4.1.** Evolución de la señal con la temperatura del portal de inyección para TEGDMA (o), bisfenol A (□), bis-DMA (Δ) y bis-GMA (tres picos) (x).

El incremento de temperatura en el inyector origina un aumento en las señales cromatográficas de los cuatro componentes de la mezcla, siendo el menos afectado el bisfenol A cuya señal se multiplica por un factor de 1.2, seguido del bis-DMA y el TEGDMA para los cuales la señal se multiplica por 1.5 y 2.0 respectivamente. En el caso del bis-GMA, el incremento de la temperatura originó la aparición de tres picos cromatográficos de abundancia mayor y un cuarto pico correspondiente a la presencia de bisfenol A.

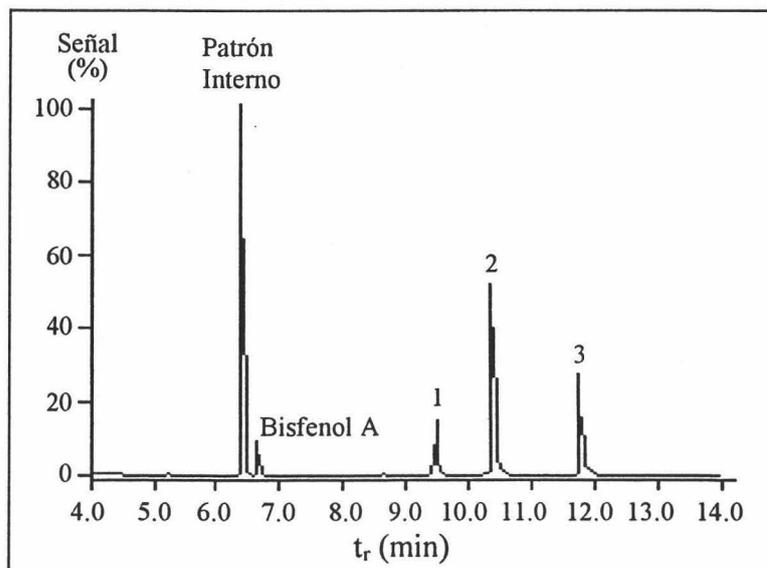
#### 4.1.1. Cromatogramas y espectros de masas de los compuestos.

Con objeto de caracterizar mediante cromatografía de gases-Espectrometría de masas los compuestos objeto de estudio, se inyectó en el cromatógrafo de gases una disolución etanólica que contenían 10 mg·l<sup>-1</sup> de TEGDMA, 50 mg·l<sup>-1</sup> de bisfenol A, 100 mg·l<sup>-1</sup> bis-DMA y 100 mg·l<sup>-1</sup> de bisfenol F como patrón interno, fijando la temperatura del inyector en 300 °C y el resto de condiciones instrumentales mostradas en la tabla IV.4.1. Por otra parte se inyectó una disolución etanólica de 500 mg·l<sup>-1</sup> de bis-GMA que contenía así mismo 100 mg·l<sup>-1</sup> de bisfenol F empleado como patrón interno pero fijando la temperatura del inyector en 300 °C.

En la figura IV.4.2 y 3 se muestran los cromatogramas obtenidos en modo Scan para ambas disoluciones.



*Figura IV.4.2. Cromatograma y espectro de masas de TEGDMA, bisfenol A y bis-DMA obtenidos a 300 °C.*



*Figura IV.4.3. Cromatograma y espectro de masas de Bis-GMA obtenido a 300 °C.*

Aparecen siete picos cromatográficos con tiempos de retención 5.65 minutos para el TEGDMA, 6.42 minutos para el patrón interno, 6.70 minutos para el bisfenol A,

10.70 minutos para el bis-DMA y 9.43 minutos, 10.40 minutos y 11.85 minutos para los tres compuestos generados a partir del bis-GMA.

Por tanto, se propuso para la determinación de estos cuatro compuestos en muestras en las que se encuentre presentes simultáneamente la realización de dos inyecciones para cada muestra a diferentes temperaturas del inyector. Se seleccionó la temperatura de 200 °C para la determinación de bisfenol A, temperatura a la cual se evita la interferencia por parte de los productos de degradación del bis-GMA y 300 °C para los demás compuestos, ya que a esta temperatura se produce la degradación del bis-GMA y tanto TEGDMA como bis-GMA, presentan mayores señales.

Con objeto de seleccionar los fragmentos característicos y de mayor abundancia de cada uno de los compuestos, se estudiaron los espectros de masas correspondientes a los diferentes picos cromatográficos obtenidos.

#### *4.1.1.1. Espectro de masas del bisfenol F (patrón interno).*

Este pico corresponde a la presencia del bisfenol F utilizado como patrón interno, los fragmentos seleccionados para el establecimiento del modo SIM, fueron los de relación carga/masa 200 y 199, correspondientes al pico molecular y a la pérdida de un H (M-1).

#### *4.1.1.2. Espectro de masas de los compuestos objeto de estudio.*

En las figuras IV.4.4 a 7 se muestran los espectros de masas correspondientes a TEGDMA, bisfenol A, bis-DMA y a los tres compuestos originados en la degradación térmica del bis-GMA. Así mismo en las tablas IV.4.3 a 7 se muestran los fragmentos principales.



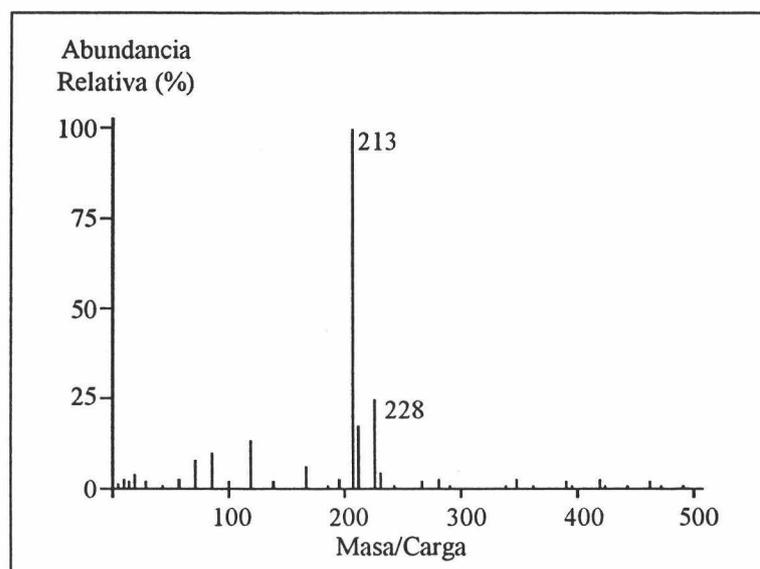


Figura IV.4.5. Espectro de masas del bisfenol A.

Tabla IV.4.4. Fragmentos relevantes del espectro de masas del bisfenol A.

m/z	Abundancia relativa	Ion	
213	20 %	$M^+ (C_{14}H_8O_2)^+$	$\left[ \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}(\text{CH}_3)-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} \right]^+$
228	100 %	$M^+ (C_{15}H_{16}O_2)^+$	$\left[ \text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH} \right]^+$

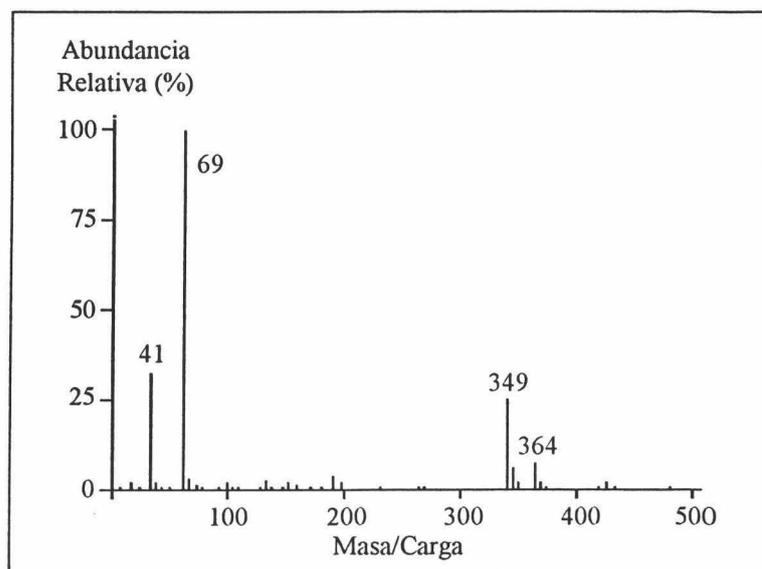


Figura IV.4.6. Espectro de masas del bisfenol A dimetacrilato.

Tabla IV.4.5. Fragmentos relevantes del espectro de masas del bis-DMA.

m/z	Abund	Ion	
41	35 %	$M^+ [C_3H_5]^+$	$\left[ \begin{array}{c} H_2C=C \\   \\ CH_3 \end{array} \right]^+$
69	100 %	$M^+ [C_4H_5O]^+$	$\left[ \begin{array}{c} H_2C=C-C \\    \\ O \\   \\ CH_3 \end{array} \right]^+$
349	35 %	$M^+ [C_{22}H_{21}O_2]^+$	$\left[ H_2C=C(CH_3)-C(=O)-O-C_6H_4-C(CH_3)_2-C_6H_4-O-C(=O)-C(CH_3)=CH_2 \right]^+$
364	8 %	$M^+ [C_{23}H_{24}O_2]^+$	$\left[ H_2C=C(CH_3)-C(=O)-O-C_6H_4-C(CH_3)_2-C_6H_4-O-C(=O)-C(CH_3)=CH_2 \right]^+$

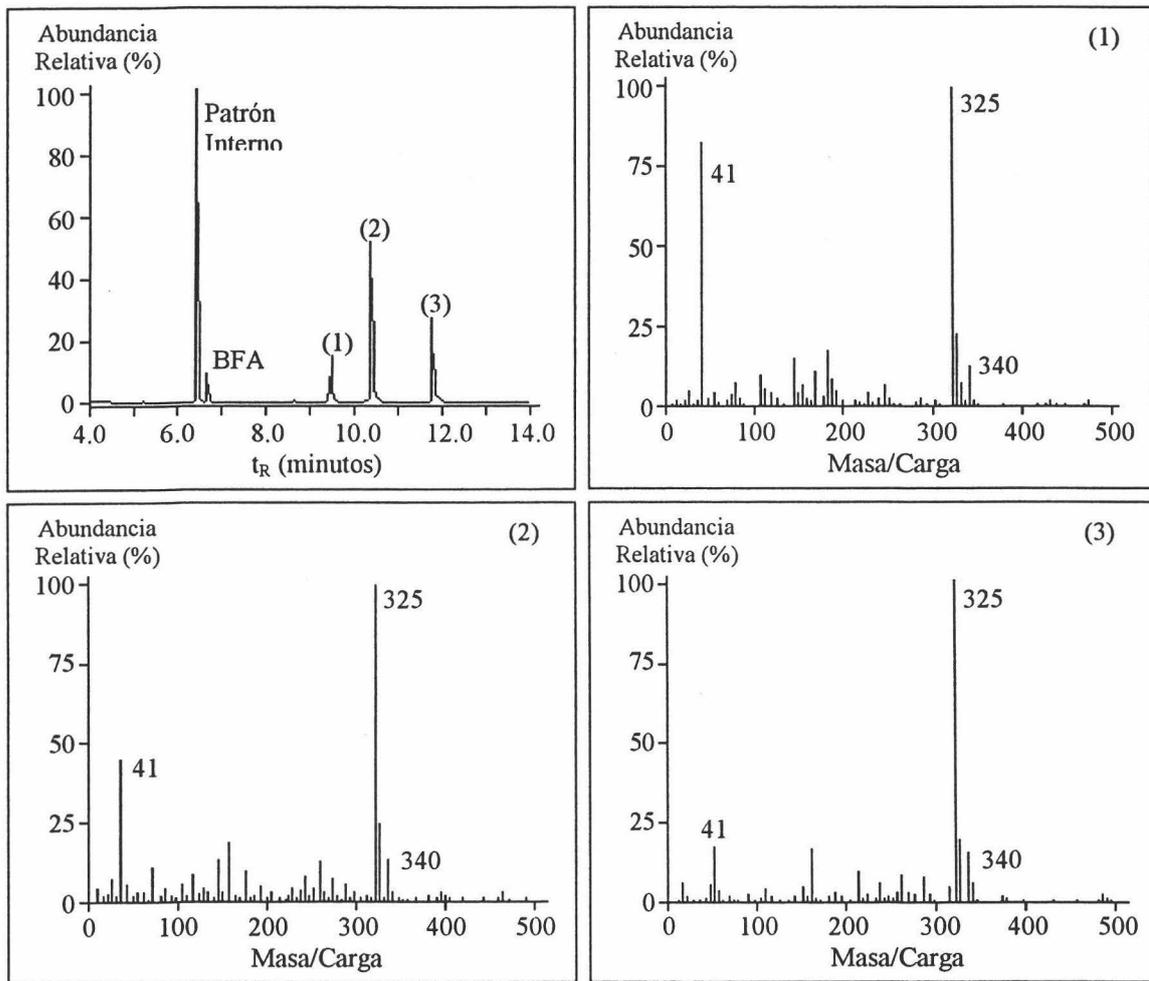


Figura IV.4.7. Cromatograma y espectros de masas del bis-GMA.

Tabla IV.4.6. Fragmentos relevantes del espectro de masas del bis-GMA (tres picos)

m/z	Abundancia relativa			Ion	
	83 %	46 %	17 %	$M^+ [C_3H_5]^+$	$\left[ \begin{array}{c} H_2C=C \\   \\ CH_3 \end{array} \right]^+$
325	100 %	100 %	100 %	$M^+ [C_{20}H_{21}O_4]^+$	$\left[ \begin{array}{c} OH \\   \\ CH_2-CH-CH_2-O- \end{array} \right] \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{C}(\text{CH}_3) \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{O}-CH_2-CH(OH)-CH_2 \text{---} \left. \right]^+$
340	13 %	13 %	15 %	$M^+ [C_{21}H_{24}O_4]^+$	$\left[ \begin{array}{c} OH \\   \\ CH_2-CH-CH_2-O- \end{array} \right] \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{C}(\text{CH}_3)_2 \text{---} \text{C}_6\text{H}_4 \text{---} \text{O}-CH_2-CH(OH)-CH_2 \text{---} \left. \right]^+$

#### 4.1.2. Establecimiento del método en modo SIM.

Para establecer el método de trabajo en modo SIM, se seleccionaron los iones característicos de cada compuesto de mayor abundancia relativa y que no coincidían con ningún posible interferente.

En la tabla IV.4.7 se muestran los principales parámetros seleccionados para el establecimiento del modo SIM: **tiempo de retención** ( $t_r$ ) de cada analito, **tiempo de inicio del análisis** de cada ion ( $t_i$ ) y **fragmentos** de mayor abundancia, así como la temperatura del inyector a la cual se realiza la inyección.

*Tabla IV.4.7. Parámetros seleccionados para el modo SIM.*

Compuesto	$t_r$ (min)	$t_i$ (min)	Fragmento (m/z)	$T_{iny}$ (°C)
<b>TEDGMA</b>	5.65	5.00	41, 69, 113	300
<b>Bisfenol F</b>	6.42	6.00	199, 200	200 y 300
<b>Bisfenol A</b>	6.70	6.60	213, 228	200
<b>Bis-DMA</b>	10.70	10.60	69, 349, 364	300
<b>Bis-GMA</b>	9.43	9.00	325, 340	300
	10.40	9.00		
	11.85	11.00		

#### 4.2. Optimización de variables experimentales.

La aplicación de un método de análisis a matrices biológicas, como es el caso de la saliva, implica en la mayoría de los casos un tratamiento de muestra diferente al empleado hasta ahora para el caso de muestras acuosas. Basándonos en el método propuesto por Corti y colaboradores para la precipitación de proteínas, en primer lugar se llevó a cabo dicha precipitación con acetonitrilo en medio fuertemente básico, a continuación se acidificó y se llevó a sequedad en estufa. Finalmente se redisolvió el residuo sólido resultante con un disolvente orgánico mediante agitación mecánica, con distintos tipos de agitadores, de la muestra con un volumen determinado de disolvente orgánico

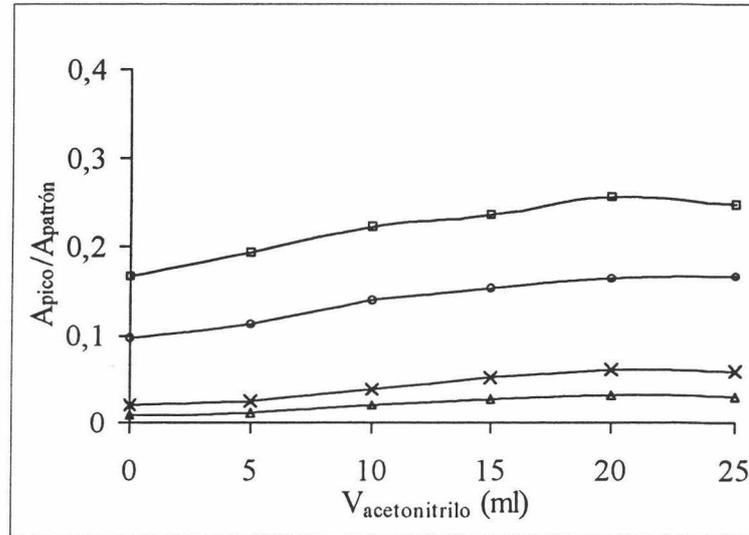
Se comentan a continuación cada una de las variables que afectan o pueden afectar al tratamiento de la muestra, previo a su inyección en el cromatógrafo.

#### 4.2.1. Volumen de acetonitrilo.

Se determinó la cantidad adecuada de acetonitrilo necesaria para la precipitación total de proteínas haciendo un seguimiento de la evolución de la señal cromatográfica en función del volumen empleado. Para ello en una serie de matraces aforados de 50 ml de capacidad se tomaron 10 ml de saliva humana que contenía  $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de TEGDMA,  $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de bisfenol A y bis-DMA y  $2500 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de bis-GMA. Se añadieron a continuación volúmenes crecientes de acetonitrilo (0 ml, 5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml y 25 ml) y 100  $\mu\text{l}$  de KOH de concentración 2 M, tras agitar vigorosamente, se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 15 minutos y se separó el precipitado originado por decantación. Se llevaron a sequedad las fases acuosas en una estufa a  $60^\circ\text{C}$  durante 12 horas y el sólido resultante se redisolvió agitando mecánicamente durante dos horas con 10 ml de diclorometano. Por último, la disolución fue llevada a sequedad en vial cromatográfico donde se adicionaron 50  $\mu\text{l}$  de diclorometano que contenían  $100 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de bisfenol F. A continuación se realizaron dos inyecciones en el cromatógrafo de gases fijando las condiciones instrumentales mostradas en la tabla IV.4.1 y la temperatura del inyector en  $200^\circ\text{C}$  y  $300^\circ\text{C}$  respectivamente. En la tabla y figura IV.4.8 se muestra la evolución de la señal cromatográfica para cada compuesto en función del volumen de acetonitrilo adicionado.

*Tabla IV.4.8. Influencia del volumen de acetonitrilo..*

V (ml)	TEGDMA	Bisfenol A	Bis-DMA	Bis-GMA
0	0.096	0.166	0.009	0.020
5	0.112	0.192	0.011	0.02
10	0.139	0.222	0.020	0.039
15	0.153	0.237	0.027	0.052
20	0.163	0.256	0.032	0.061
25	0.167	0.247	0.028	0.060



**Figura IV.4.8.** Influencia del volumen de acetonitrilo para TEGDMA (○), bisfenol A (□), bis-DMA (Δ) y bis-GMA (x).

Se observa que la señal aumenta al hacerlo el volumen añadido hasta alcanzar un valor máximo cuando se adicionaron 20 ml de acetonitrilo, manteniéndose constante a partir de este valor. Se fijó por tanto éste volumen para la realización de experiencias posteriores.

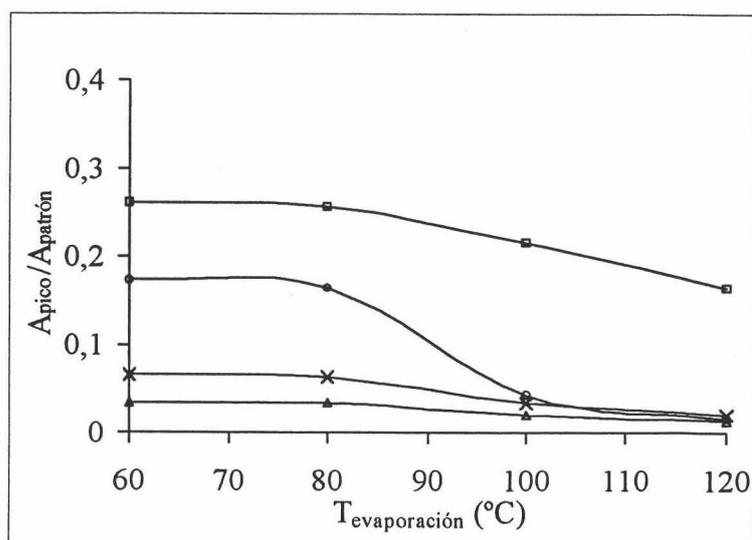
#### 4.2.2. Temperatura y tiempo de secado de la muestra.

Con objeto de eliminar el acetonitrilo y el agua contenido en la muestra, se estudió la influencia de la temperatura de secado de la misma, este parámetro, condiciona así mismo el tiempo necesario para eliminar completamente el disolvente. Para ello se realizó una experiencia similar a la anterior, pero en este caso se modificó la temperatura de la estufa a la cual se llevó a cabo la evaporación en el intervalo comprendido entre 60 y 120 °C y empleando 20 ml de acetonitrilo para la precipitación de las proteínas.

En la tabla y figura IV.4.9 se muestran los resultados obtenidos.

*Tabla IV.4.9. Influencia de la temperatura de evaporación sobre la señal.*

T (°C)	Tiempo (h)	TEGDMA	Bisfenol A	Bis-DMA	Bis-GMA
60	12.0	0.173	0.261	0.035	0.064
80	8.0	0.163	0.256	0.034	0.062
100	6.5	0.042	0.215	0.021	0.033
120	4.5	0.016	0.164	0.013	0.021

*Figura IV.4.9. Influencia la temperatura de evaporación para TEGDMA (○), bisfenol A (□), bis-DMA (Δ) y bis-GMA (x).*

Se observa que la señal permanece prácticamente constante hasta la temperatura de 80 °C para los cuatro compuestos. Sin embargo a temperaturas superiores la señal disminuye apreciablemente. Se seleccionó por tanto 80 °C como temperatura de evaporación de las muestras en experiencias posteriores, siendo el tiempo de secado a esta temperatura aproximadamente 8 horas.

#### 4.2.3. Tipo de agitación.

Se ensayaron tres sistemas mecánicos diferentes para la agitación de las muestras: agitador de matraces (1), ultrasonidos (2) y agitador magnético (3). Para ello, se llevó a cabo una experiencia similar a las realizadas con anterioridad, pero empleando en cada

caso uno de los diferentes tipos de agitadores propuestos. En la tabla IV.4.10 se muestran los resultados obtenidos.

*Tabla IV.3.10. Evolución de la señal en función del sistema de agitación.*

	<b>TEDGMA</b>	<b>Bisfenol A</b>	<b>Bis-DMA</b>	<b>Bis-GMA</b>
<b>(1)</b>	0.162	0.243	0.032	0.056
<b>(2)</b>	0.119	0.148	0.026	0.019
<b>(3)</b>	0.122	0.147	0.026	0.010

La señal obtenida cuando la agitación se lleva a cabo empleando un agitador de matraces (1) es máxima en todos los casos. Se seleccionó esta modalidad de agitación para experiencias posteriores.

#### *4.2.4. Tipo de disolvente orgánico y tiempo de redisolución.*

El disolvente empleado y el tiempo de disolución de la muestra son dos variables estrechamente relacionadas, por este motivo, se planteó la optimización conjunta de ambas. Para ello en matraces aforados de 50 ml de capacidad se tomaron 10 ml de saliva humana y se trataron según el procedimiento operatorio descrito con anterioridad empleando para la redisolución de los compuestos diferentes disolventes orgánicos: metanol, etanol, diclorometano (DCM), triclorometano (TCM), tetracloruro de carbono (TCC) y hexano (HEX), y agitando mecánicamente con ayuda de un agitador de matraces durante tiempos crecientes (0, 5, 30, 60, 120 y 240 minutos). Los extractos obtenidos en cada disolvente fueron concentrados hasta un volumen final de 50  $\mu$ l en un vial cromatográfico, e inyectados en el cromatógrafo de gases fijando las condiciones instrumentales habituales.

En la tabla IV.4.11 y en la figura IV.4.10 se muestran los resultados obtenidos cuando se empleó diclorometano, triclorometano, tetracloruro de carbono y hexano. Metanol y etanol fueron descartados ya que en ellos se disolvían gran cantidad de sales inorgánicas que producían la obturación de la columna cromatográfica, hecho que originó numerosos problemas instrumentales.

Tabla IV.4.11. Influencia del tiempo de agitación con diferentes disolventes.

	t (min)	0 min	5 min	30 min	60 min	120 min	240 min
<b>TEGDMA</b>	DCM	0.000	0.070	0.115	0.147	0.163	0.191
	TCM	0.000	0.002	0.006	0.009	0.009	0.100
	TCC	0.000	0.023	0.027	0.028	0.031	0.032
	HEX	0.000	0.003	0.004	0.005	0.005	0.006
<b>Bisfenol A</b>	DCM	0.000	0.061	0.132	0.203	0.266	0.267
	TCM	0.000	0.100	0.325	0.522	0.642	0.823
	TCC	0.000	0.017	0.024	0.037	0.037	0.038
	HEX	0.000	0.002	0.003	0.003	0.003	0.004
<b>Bis-DMA</b>	DCM	0.000	0.002	0.015	0.025	0.034	0.040
	TCM	0.000	0.004	0.010	0.018	0.025	0.027
	TCC	0.000	0.002	0.004	0.006	0.007	0.009
	HEX	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.003
<b>Bis-GMA</b>	DCM	0.000	0.007	0.020	0.031	0.068	0.082
	TCM	0.000	0.008	0.012	0.024	0.032	0.046
	TCC	0.000	0.005	0.006	0.009	0.015	0.014
	HEX	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.004

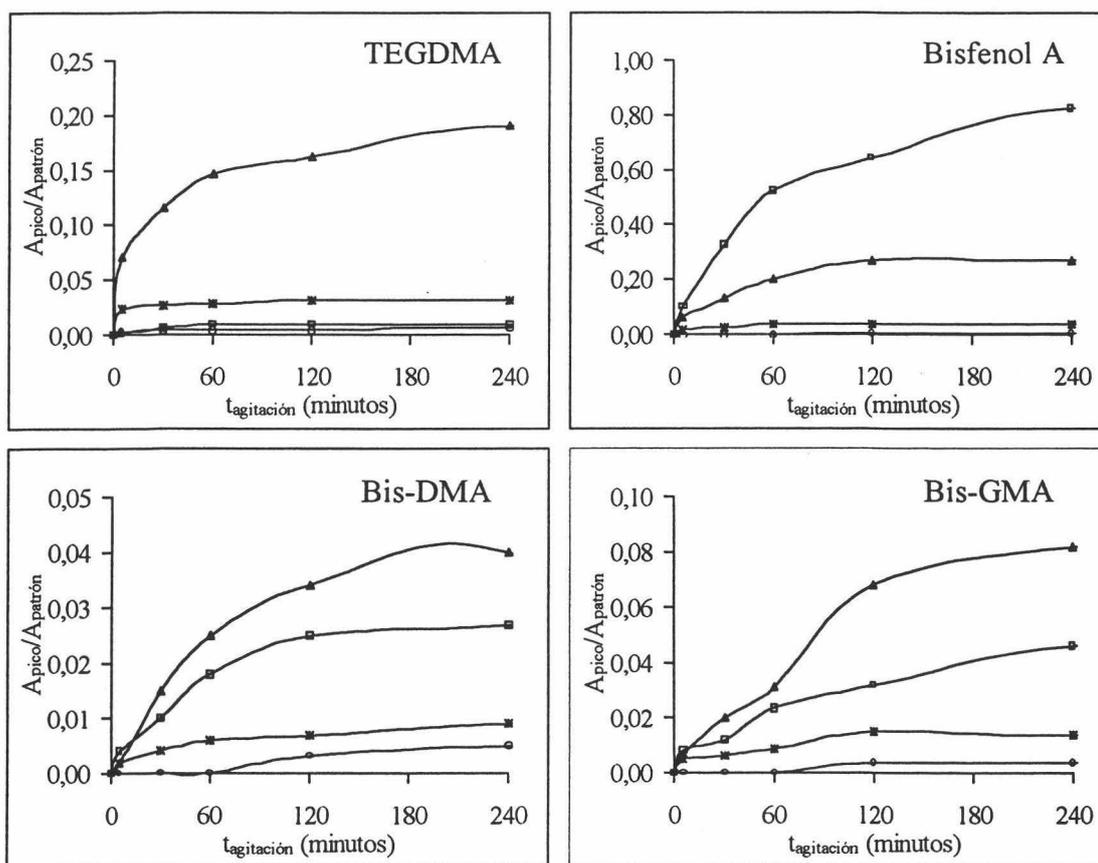


Figura IV.4.10. Influencia del tiempo de agitación y del tipo de disolvente para TCM (□), DCM (Δ), TCC (x) y HEX (o).

Se observa que las señales más elevadas se obtienen cuando se emplea diclorometano como disolvente, salvo en el caso del bisfenol A para el que es el triclorometano el disolvente adecuado. Por otra parte, la evolución de la razón de áreas del compuesto y el patrón interno con el tiempo de agitación, sigue la misma tendencia para los cuatro analitos, es decir la señal aumenta rápidamente hasta aproximadamente 120 minutos, manteniéndose prácticamente constante a partir de este valor. Con objeto de favorecer la redisolución de los compuestos que presentaban menor sensibilidad, se seleccionó el diclorometano como disolvente y se fijó el tiempo de agitación en 120 minutos.

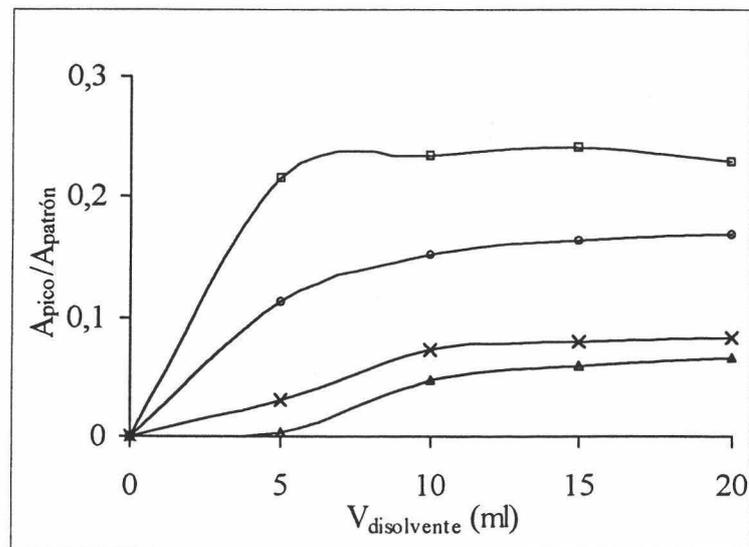
#### 4.2.5. *Volumen de disolvente orgánico*

Se estudió por último el volumen de diclorometano necesario para disolver completamente los compuestos. Para ello se realizó una experiencia similar a las anteriores, pero modificando en este caso el volumen de diclorometano adicionado en el intervalo 5 a 20 ml.

En la tabla IV.4.12 y figura IV.4.11 se muestran los resultados obtenidos.

*Tabla IV.3.12. Influencia del volumen de disolvente orgánico*

V (ml)	TEGDMA	Bisfenol A	Bis-DMA	Bis-GMA
0	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.113	0.215	0.004	0.031
10	0.151	0.235	0.048	0.073
15	0.163	0.241	0.059	0.080
20	0.169	0.230	0.066	0.082



**Figura IV.4.11.** Influencia del volumen de disolvente orgánico para TEGDMA (□), bisfenol A (○), bis-DMA (Δ) y bis-GMA (x)

Se observa que en todos los casos la señal aumenta hasta el volumen de 10 ml, manteniéndose prácticamente constante a partir de este valor. Se seleccionó por tanto este volumen como óptimo para experiencias posteriores.

#### 4.2.6. Resumen de las variables experimentales.

En la tabla IV.4.13 se resumen las variables experimentales optimizadas para la determinación de TEGDMA, bisfenol A, bis-DMA y bis-GMA en salivas humanas.

**Tabla IV.4.13.** Resumen de las variables experimentales.

Variable	Óptimo
Volumen de acetonitrilo	20 ml
Temperatura de evaporación	80 ° C
Tiempo de evaporación	8 horas
Agitación para redisolución	Agitador de matraces
Disolvente	Diclorometano
Volumen de disolvente	10 ml

### 4.3. Parámetros analíticos.

#### 4.3.1. Establecimiento y verificación del modelo.

El modelo de calibración seleccionado fue nuevamente el lineal de regresión univariante por mínimos cuadrados. Se buscan los parámetros  $a$  y  $b$  partiendo de una serie de puntos experimentales correspondientes a valores de concentración y señal cromatográfica, calculada ésta como cociente de las áreas correspondientes al compuesto y al patrón interno.

Para llevar a cabo esta experiencia de calibrado, en una serie de matraces aforados de 50 ml de capacidad se introdujeron 10 ml de agua desionizada que contenía concentraciones crecientes de los cuatro compuestos en los rangos 1.0 a 100.0  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para TEGDMA, 10.0 a 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para bisfenol A y bis-DMA y 0.1 a 10.0  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  para bis-GMA. Se adicionaron 20 ml de acetonitrilo y una gota de KOH (2 M) para precipitar proteínas. Tras agitar vigorosamente se centrifugó durante 10 minutos a 3000 r.p.m. y la fase acuosa fue decantada e introducida en una estufa a 80 °C durante 8 horas. A continuación se redisolvió el residuo seco originado con 10 ml de diclorometano agitando mecánicamente durante 120 minutos y, transcurrido este tiempo, se llevó a casi sequedad en rotavapor y a sequedad absoluta en un vial cromatográfico de 200  $\mu\text{l}$  de capacidad, se adiciono a continuación 50  $\mu\text{l}$  de diclorometano que contenía de 100  $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de bisfenol F. Por último se realizaron dos inyecciones de cada patrón a temperaturas de inyector de 200 y 300 °C, manteniendo constantes el resto las condiciones instrumentales mostradas en la tabla IV.4.1. De cada punto se realizaron dos réplicas experimentales.

En la tabla IV.4.14 se muestran los principales parámetros estadísticos del modelo calculados y en la figura IV.4.12 se representan los resultados obtenidos. En el caso del bis-GMA, de forma análoga al procedimiento seguido en el apartado anterior para el BFDGE, se han calculado a partir de la suma de las áreas obtenidas a 300 °C

para los tres picos situados en el cromatograma a tiempos de retención 9.43, 10.40 y 11.85 minutos.

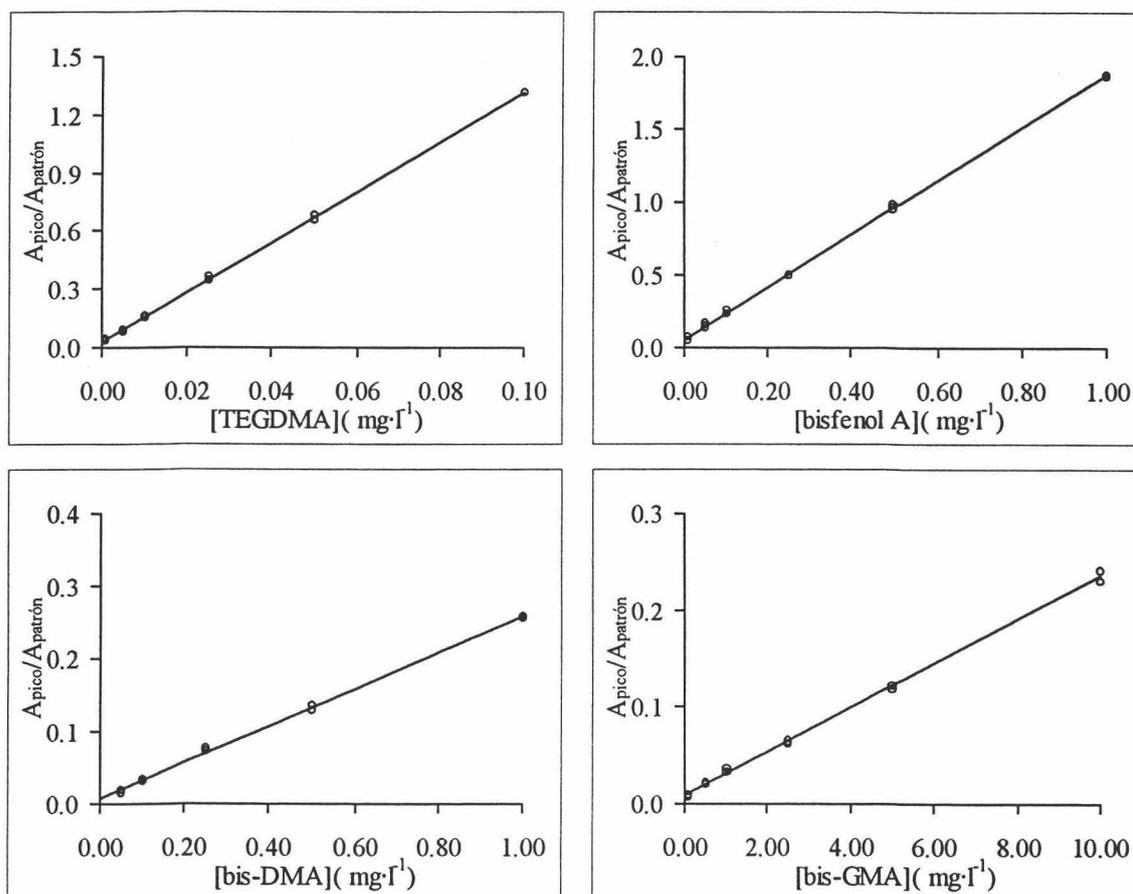
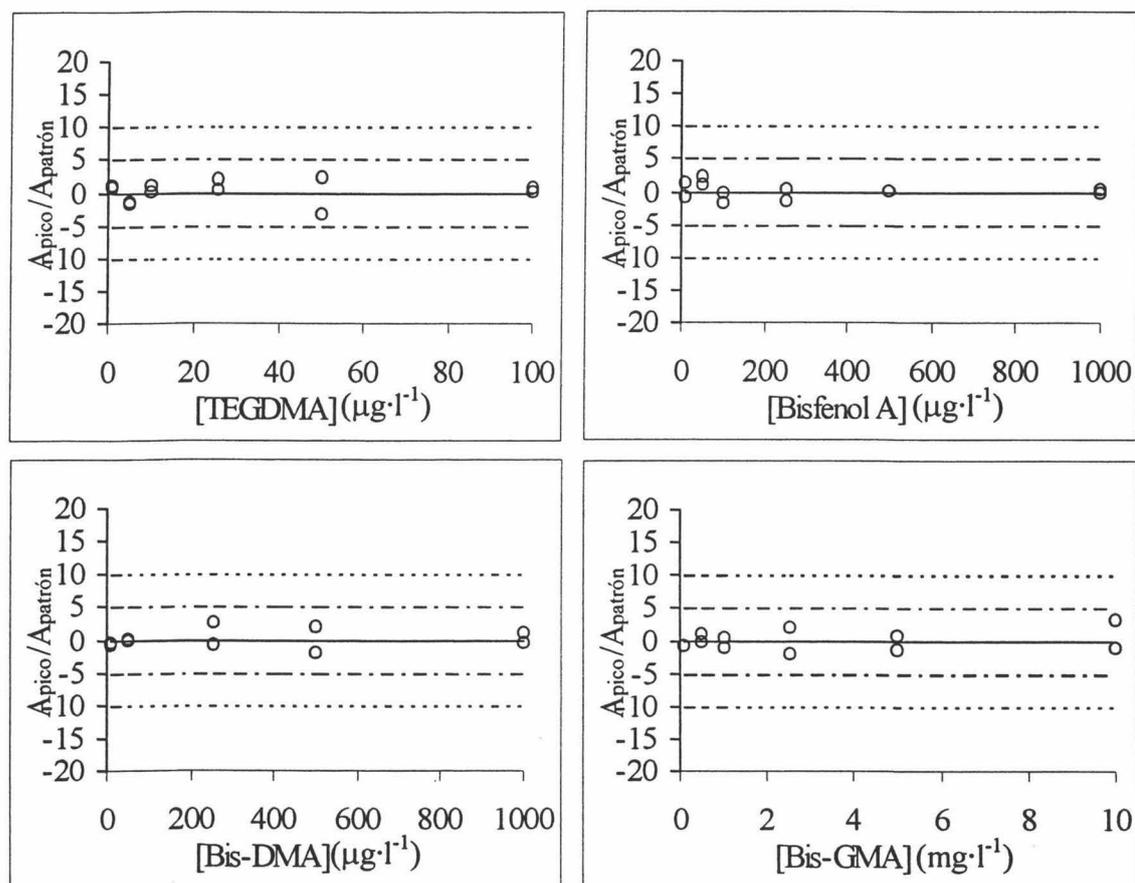


Figura IV.4.12. Calibrados con patrones.

Tabla IV.4.14. Parámetros estadísticos de la regresión por mínimos cuadrados.

Parámetro	TEGDMA	Bisfenol A	Bis-DMA	Bis-GMA
a	0.0287	0.0517	0.0085	0.0084
s <sub>a</sub>	0.0031	0.0066	0.0018	0.0013
b (l·mg <sup>-1</sup> )	12.920	1.8265	0.2498	0.0227
S <sub>b</sub> (l·mg <sup>-1</sup> )	0.0662	0.0140	0.0035	0.0003
r <sup>2</sup> (%)	99.97	99.94	99.84	99.85
s <sub>RC</sub>	0.0079	0.0168	0.0038	0.0033
P <sub>lof</sub> (%)	71.01	32.80	13.22	54.09

Se comprobó así mismo la condición de homocedasticidad de los datos. Para ello, se ha hecho uso del análisis gráfico de los residuales mostrado en el capítulo II de esta Memoria de doctorado. La representación gráfica de dichos residuales obtenida para los cuatro compuestos es la mostrada en la figura IV.4.13.



*Figura IV.4.14. Evaluación de la condición de homocedasticidad.*

En los cuatro casos se cumplen las premisas fijadas en el capítulo II para el cumplimiento de la condición de homocedasticidad según el criterio adoptado. Por tanto es posible afirmar que los datos son homocedásticos.

#### 4.3.2. *Parámetros de calidad del método.*

Los parámetros de calidad establecidos fueron: Rango dinámico lineal y linealidad, límite de detección y cuantificación, precisión y sensibilidad analítica.

##### 4.3.2.1. *Rango dinámico lineal y linealidad.*

Los intervalos de concentración seleccionados fueron  $1.0$  a  $100.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para TEGDMA,  $10.0$  a  $1000.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para bisfenol A y bis-DMA y  $0.1$  a  $10.0 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  para el bis-GMA.

Por otra parte, la linealidad calculada resultó ser  $99.49 \%$  para el TEGDMA,  $99.23 \%$  para el bisfenol A,  $98.60 \%$  para el bis-DMA y  $98.69 \%$  para el bis-GMA.

##### 4.3.2.2. *Límite de detección y cuantificación.*

Al igual que en la determinación de bisfenol F, bisfenol A y sus correspondientes diglicidiléteres, para el cálculo de ambos parámetros empleó la medida de blanco cromatográfico descrita en el capítulo II de esta Memoria.

#### A. Medida del blanco cromatográfico.

Para realizar esta experiencia, en matraces aforados de 50 ml de capacidad se prepararon diez disoluciones blanco, a las que se les aplicó el mismo procedimiento operatorio empleado para los patrones y los extractos finales fueron inyectados en el cromatógrafo de gases fijando las condiciones instrumentales habituales.

En la tabla IV.4.15 se muestran los valores de  $W_{0.5h}$  determinados a concentración "cero", los correspondientes  $W_{b0}$  calculados y los intervalos de integración para la obtención de la señal del blanco correspondiente a cada uno de los

cuatro componentes de la mezcla. En el caso del bis-GMA, se consideró únicamente la señal correspondiente al isómero de mayor señal.

*Tabla IV.4.15. Valores de  $W_{0.5h}$ ,  $W_{b0}$  extrapolados a "concentración cero".*

Blanco	$W_{0.5h}$	$W_{b0}$	$t_r \pm 0.5W_{b0}$
<b>TEDGMA</b>	0.015 min	0.038 min	$5.627 \pm 0.019$ min
<b>Bisfenol A</b>	0.035 min	0.089 min	$6.603 \pm 0.045$ min
<b>Bis-DMA</b>	0.042 min	0.107 min	$10.679 \pm 0.054$ min
<b>Bis-GMA</b>	0.032 min	0.082 min	$10.479 \pm 0.041$ min

En la tabla IV.4.16 se muestra las señales del blanco obtenidas por integración de la línea base en los intervalos mostrados.

*Tabla IV.4.16. Señales del blanco.*

Blanco	TEGDMA	Bisfenol A	Bis-DMA	Bis-GMA
<b>01</b>	$3.80 \cdot 10^{-2}$	$1.08 \cdot 10^{-2}$	$1.49 \cdot 10^{-3}$	$2.32 \cdot 10^{-4}$
<b>02</b>	$4.02 \cdot 10^{-2}$	$1.60 \cdot 10^{-2}$	$3.43 \cdot 10^{-3}$	$2.23 \cdot 10^{-4}$
<b>03</b>	$3.75 \cdot 10^{-2}$	$1.13 \cdot 10^{-2}$	$3.27 \cdot 10^{-3}$	$2.28 \cdot 10^{-4}$
<b>04</b>	$3.95 \cdot 10^{-2}$	$1.45 \cdot 10^{-2}$	$2.00 \cdot 10^{-3}$	$3.08 \cdot 10^{-4}$
<b>05</b>	$3.82 \cdot 10^{-2}$	$1.55 \cdot 10^{-2}$	$3.05 \cdot 10^{-3}$	$4.16 \cdot 10^{-4}$
<b>06</b>	$3.91 \cdot 10^{-2}$	$1.20 \cdot 10^{-2}$	$3.60 \cdot 10^{-3}$	$3.95 \cdot 10^{-4}$
<b>07</b>	$3.85 \cdot 10^{-2}$	$1.49 \cdot 10^{-2}$	$1.85 \cdot 10^{-3}$	$3.60 \cdot 10^{-4}$
<b>08</b>	$3.91 \cdot 10^{-2}$	$1.25 \cdot 10^{-2}$	$1.28 \cdot 10^{-3}$	$1.50 \cdot 10^{-4}$
<b>09</b>	$3.54 \cdot 10^{-2}$	$1.54 \cdot 10^{-2}$	$3.93 \cdot 10^{-3}$	$1.08 \cdot 10^{-4}$
<b>10</b>	$3.95 \cdot 10^{-2}$	$1.32 \cdot 10^{-2}$	$1.40 \cdot 10^{-3}$	$095 \cdot 10^{-4}$

**B. Cálculo del límite de detección y de cuantificación.**

En la tabla IV.4.17 se muestran los límites de detección y cuantificación calculados según el método propuesto.

*Tabla IV.4.17. Límite de detección y cuantificación del método.*

	S <sub>blanco</sub>	b (l·mg <sup>-1</sup> )	C <sub>L</sub> (μg·l <sup>-1</sup> )	C <sub>Q</sub> (μg·l <sup>-1</sup> )
<b>TEGDMA</b>	1.35·10 <sup>-3</sup>	12.92	0.3	1.0
<b>Bisfenol A</b>	1.89·10 <sup>-3</sup>	1.826	3.1	10.3
<b>Bis-DMA</b>	1.07·10 <sup>-3</sup>	0.250	12.3	40.9
<b>Bis-GMA</b>	1.14·10 <sup>-4</sup>	0.023	15.1	50.3

#### 4.3.2.3. Precisión.

La precisión del método analítico propuesto se evaluó a partir de la reproducibilidad de la señal analítica mostrada por 10 disoluciones de concentración constante e igual a 25.0 μg·l<sup>-1</sup> de TEGDMA, 250.0 μg·l<sup>-1</sup> de bisfenol A, 250.0 μg·l<sup>-1</sup> para bis-DMA y 2.5 mg·l<sup>-1</sup> de bis-GMA, que corresponden al punto central del rango lineal de concentraciones establecido para cada uno de ellos. Las disoluciones fueron tratadas según el método establecido y los extractos inyectados en el cromatógrafo de gases fijando las condiciones instrumentales habituales.

En la tabla IV.4.18 se muestran los parámetros calculados.

*Tabla III.3.18. Reproducibilidad del método analítico.*

	TEGDMA	Bisfenol A	Bis-DMA	Bis-GMA
<b>Señal media</b>	0.3578	0.4753	0.0745	0.0655
<b>Desviación estándar</b>	1.66·10 <sup>-2</sup>	2.52·10 <sup>-2</sup>	3.58·10 <sup>-2</sup>	4.49·10 <sup>-2</sup>
<b>DER (%)</b>	4.65	5.30	4.80	6.85

Las desviaciones estándar relativas son en todos los casos menores del 10 %. Puede concluirse por tanto que el método propuesto para la determinación de los analitos es reproducible en las condiciones de trabajo seleccionadas.

#### 4.3.2.4. Sensibilidad.

En la tabla IV.4.19 se muestran los valores de las sensibilidades del calibrado y analíticas para cada uno de los componentes de la mezcla, de acuerdo con la definición propuesta.

*Tabla IV.3.19. Sensibilidad del método analítico.*

	TEGDMA	Bisfenol A	Bis-DMA	Bis-GMA
$s_{RC}$	0.0079	0.0168	0.0038	0.0033
$b$ ( $l \cdot mg^{-1}$ )	12.920	1.825	0.250	0.023
$S_{analítica}$ ( $\mu g \cdot l^{-1}$ )	0.61	9.20	15.20	145.4

#### 4.3.2.5. Resumen de los parámetros analíticos.

En la tabla IV.4.20. se resumen los parámetros de calidad del método calculados.

*Tabla IV.4.20. Parámetros de calidad del método analítico.*

Parámetro	TEGDMA	Bisfenol A	Bis-DMA	Bis-GMA
$b$ ( $l \cdot \mu g^{-1}$ )	12.920	1.826	0.250	0.023
$a$	0.029	0.052	0.009	0.008
$r^2$ (%)	99.97	99.94	99.84	99.85
$s_{RC}$	0.0079	0.0168	0.0038	0.0033
RDL ( $mg \cdot l^{-1}$ )	0.001-0.100	0.010-1.000	0.050-1.000	0.100-10.0
$C_L$ ( $\mu g \cdot l^{-1}$ )	0.3	3.1	12.3	15.1
$C_Q$ ( $\mu g \cdot l^{-1}$ )	1.0	10.3	40.9	50.3
DER (%)	4.65	5.30	4.80	6.85
$S_{analítica}$ ( $\mu g \cdot l^{-1}$ )	0.6	9.2	15.2	145.4

#### 4.4. Aplicación y validación del método propuesto.

El método analítico propuesto para la determinación de TEGDMA, bisfenol A, bis-DMA y bis-GMA fue aplicado a salivas humanas. La metodología empleada fue la de adición de patrón, ya desarrollada en el capítulo II de esta Memoria. Esta metodología implica la realización de tres experiencias de calibrado, un calibrado con patrones, un calibrado de adición de patrón y otro calibrado empleando porciones crecientes de muestra y denominado calibrado de Youden.

##### 4.4.1. Calibrado con patrones, adición de patrón y Youden.

En primer lugar se realizó el calibrado con patrones. En el apartado anterior se desarrolló este calibrado para los cuatro componentes de la mezcla, obteniéndose sus correspondientes parámetros de calidad. Para establecer la metodología de adición de patrón, se empleó la ordenada en el origen ( $a$ ), la pendiente ( $b$ ) y la desviación estándar de la regresión  $s_{R.C.}$ . Estos valores quedan indicados en la tabla de validación correspondiente a cada compuesto

En segundo lugar, se realizó el calibrado con adición de patrón, para ello siguiendo el procedimiento operatorio descrito con anterioridad, en matraces aforados de 50 ml de capacidad se introdujeron 10 ml de saliva humana que contenía  $10.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de TEGDMA,  $100.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  de bisfenol A y bis-DMA y  $1.0 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  de bis-GMA. A continuación se adicionaron volúmenes crecientes de disolución patrón de los cuatro compuestos, para obtener concentraciones finales comprendidas en los rangos 0.0 a  $50.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para TEGDMA, 0.0 a  $500.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para bisfenol A y bis-DMA y 0.0 a  $5.0 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  para bis-GMA. Por último se realizaron dos inyecciones de cada muestra tras adicionar el patrón interno a temperaturas del inyector de 200 y 300 °C, manteniendo constantes el resto las condiciones instrumentales mostradas en la tabla IV.4.1.

Por último se estableció el calibrado de Youden, para ello en matraces aforados de 50 ml de capacidad se tomaron volúmenes crecientes de la muestra de saliva dopada

con los cuatro compuestos y se adicionó agua desionizada hasta un volumen de 10 ml de forma que se obtuvieron las proporciones finales mostradas en la tabla IV.4.21. A continuación las muestras se procesaron según el procedimiento habitual y se inyectaron finalmente los extractos obtenidos en el cromatógrafo de gases fijando las condiciones instrumentales habituales.

*Tabla IV.4.21. Volúmenes empleados en el calibrado de Youden.*

$V_{\text{muestra}}$	$V_{\text{total}}$	$V_{\text{m}}/V_{\text{total}}$
2.0	10 ml	0.2
4.0	10 ml	0.4
8.0	10 ml	0.8

#### *4.4.2. Comprobación de la exactitud del método.*

Con ayuda del programa informático ALAMÍN, se llevó a cabo el cálculo estadístico desarrollado en el capítulo II de esta Memoria para comprobar la exactitud del método propuesto. Los resultados obtenidos son mostrados en las tablas IV.4.22 a 25 y representados en las figuras IV.4.15 a 18.

Tabla IV.4.22. Parámetros de los calibrados para el TEGDMA.

	CP	CA	CY
<b>n</b>	12	6	3
<b>a</b>	0.0287	0.1750	0.0273
<b>b (l·mg<sup>-1</sup>)</b>	12.920	12.620	0.1395
<b>s<sub>RC</sub></b>	0.0079	0.0124	0.0025
<b>s<sub>p</sub></b>	0.0094		
<b>t (b)</b>	1.289 (P=21.8 %)		
<b>b<sub>p</sub> (l·mg<sup>-1</sup>)</b>	12.887		
<b>a'</b>	0.0299	0.1714	---
<b>BY</b>	---	-0.0026	---
<b>C<sub>X,S</sub> (mg·l<sup>-1</sup>)</b>	0.0102	---	---
<b>C<sub>X,A</sub> (mg·l<sup>-1</sup>)</b>	---	0.0112	---
<b>t (c)</b>	1.713 (P=16.2%)		

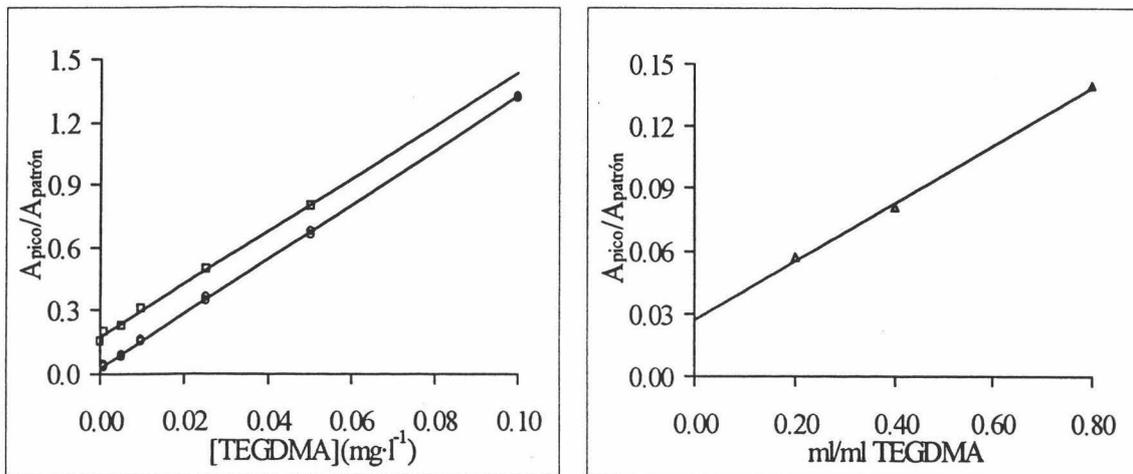


Figura IV.4.15. Calibrado con patrones (○), adición de patrón (□) y Youden (Δ) para el TEGDMA.

Tabla IV.4.23. Parámetros de los calibrados para el bisfenol A.

	CP	CA	CY
n	12	6	3
a	0.0517	0.2390	0.0432
b (l·mg <sup>-1</sup> )	1.8265	1.8010	0.1818
s <sub>RC</sub>	0.0168	0.0126	0.0068
s <sub>p</sub>	0.0200		
t (b)	0.543 (P= 59.4%)		
b <sub>p</sub> (l·mg <sup>-1</sup> )	1.8251		
a'	0.0492	0.2359	---
BY	---	0.0003	---
C <sub>X,S</sub> (mg·l <sup>-1</sup> )	0.1012		
C <sub>X,A</sub> (mg·l <sup>-1</sup> )	0.1056		
t (c)	0.795 (P= 47.1 %)		

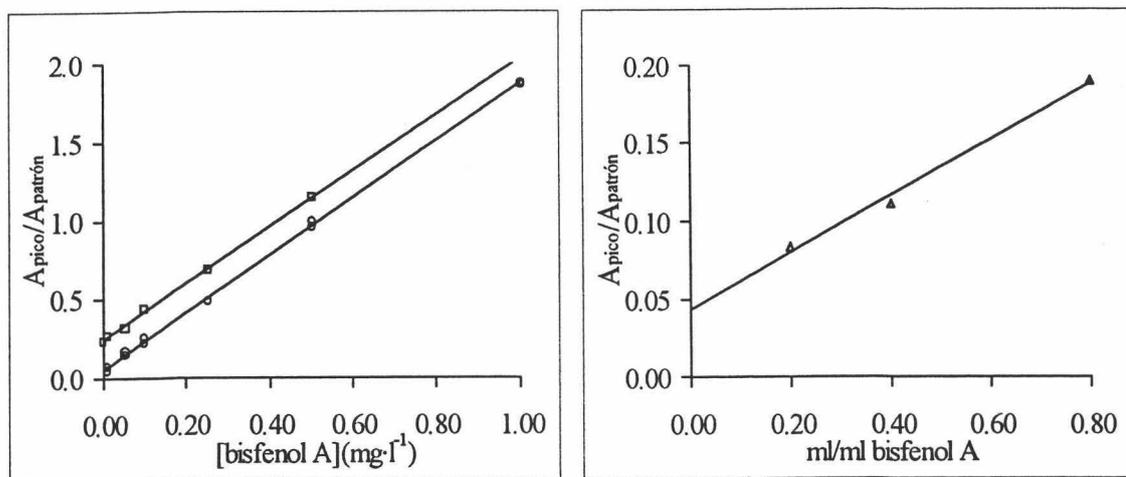


Figura IV.4.16. Calibrado con patrones (○), adición de patrón (□) y Youden (Δ) para el bisfenol A

Tabla IV.4.24. Parámetros de los calibrados para el bis-DMA.

	CP	CA	CY
<b>n</b>	10	6	3
<b>a</b>	0.0085	0.0339	0.0081
<b>b (l·mg<sup>-1</sup>)</b>	0.2498	0.2488	0.0229
<b>s<sub>RC</sub></b>	0.0038	0.0041	0.0005
<b>s<sub>p</sub></b>	0.0040		
<b>t (b)</b>	0.089 ( P= 93.2%)		
<b>b<sub>p</sub> (l·mg<sup>-1</sup>)</b>	0.2497		
<b>a'</b>	0.0085	0.0338	---
<b>BY</b>	---	0.0008	---
<b>C<sub>X,S</sub> (mg·l<sup>-1</sup>)</b>	0.0971	---	---
<b>C<sub>X,A</sub> (mg·l<sup>-1</sup>)</b>	---	0.0979	---
<b>t (c)</b>	0.0907 ( P=92.6%)		

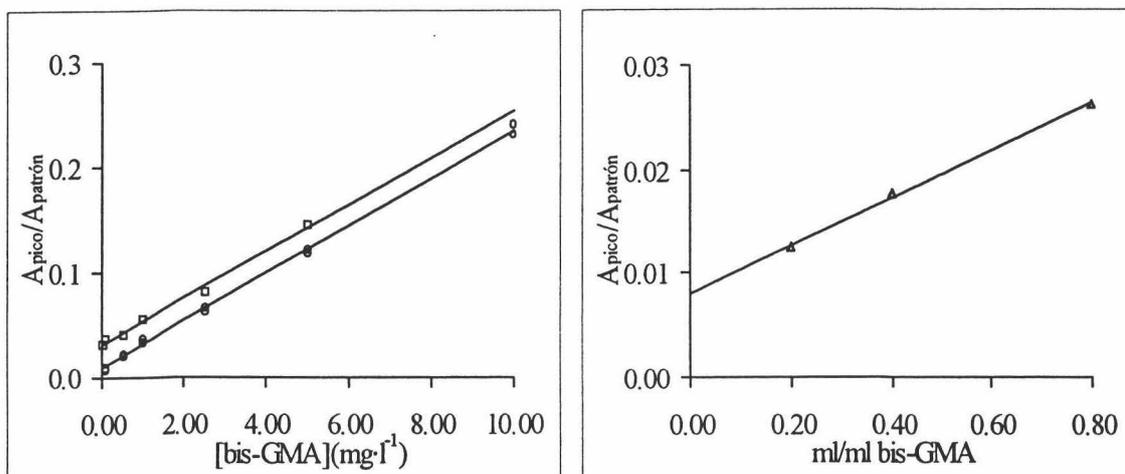


Figura IV.4.17. Calibrado con patrones (○), adición de patrón (□) y Youden (Δ) para el bis-DMA.

Tabla IV.4.25. Parámetros de los calibrados para el bis-GMA.

	CP	CA	CY
n	12	6	3
a	0.0084	0.0310	0.0081
b (l·mg <sup>-1</sup> )	0.0227	0.0223	0.0023
s <sub>RC</sub>	0.0033	0.0036	0.0005
s <sub>p</sub>	0.0034		
t (b)	0.5282 ( P=60.6%)		
b <sub>p</sub> (l·mg <sup>-1</sup> )	0.0227		
a'	0.0086	0.0304	---
BY	---	-0.0014	---
C <sub>X,S</sub> (mg·l <sup>-1</sup> )	1.00	---	---
C <sub>X,A</sub> (mg·l <sup>-1</sup> )	---	0.98	---
t (c)	0.2383 ( P=92.2%)		

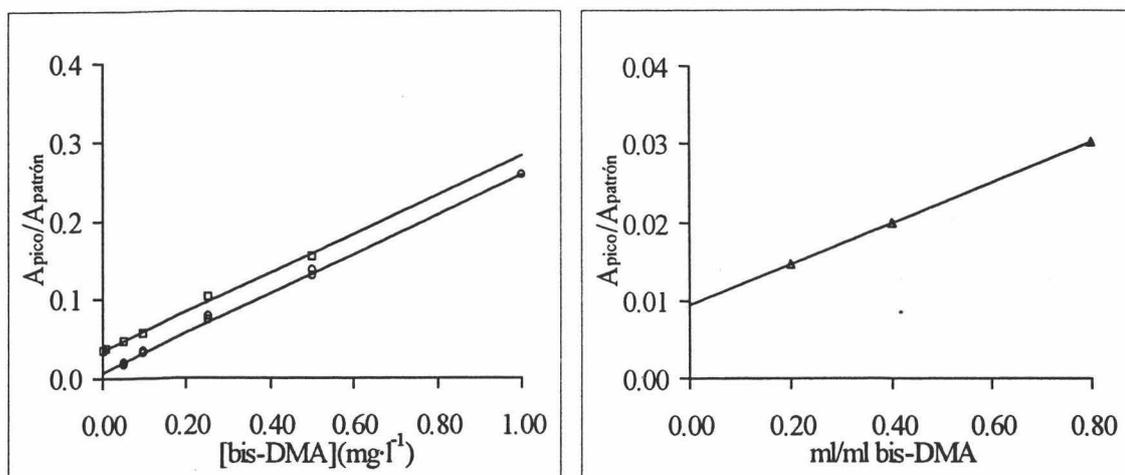
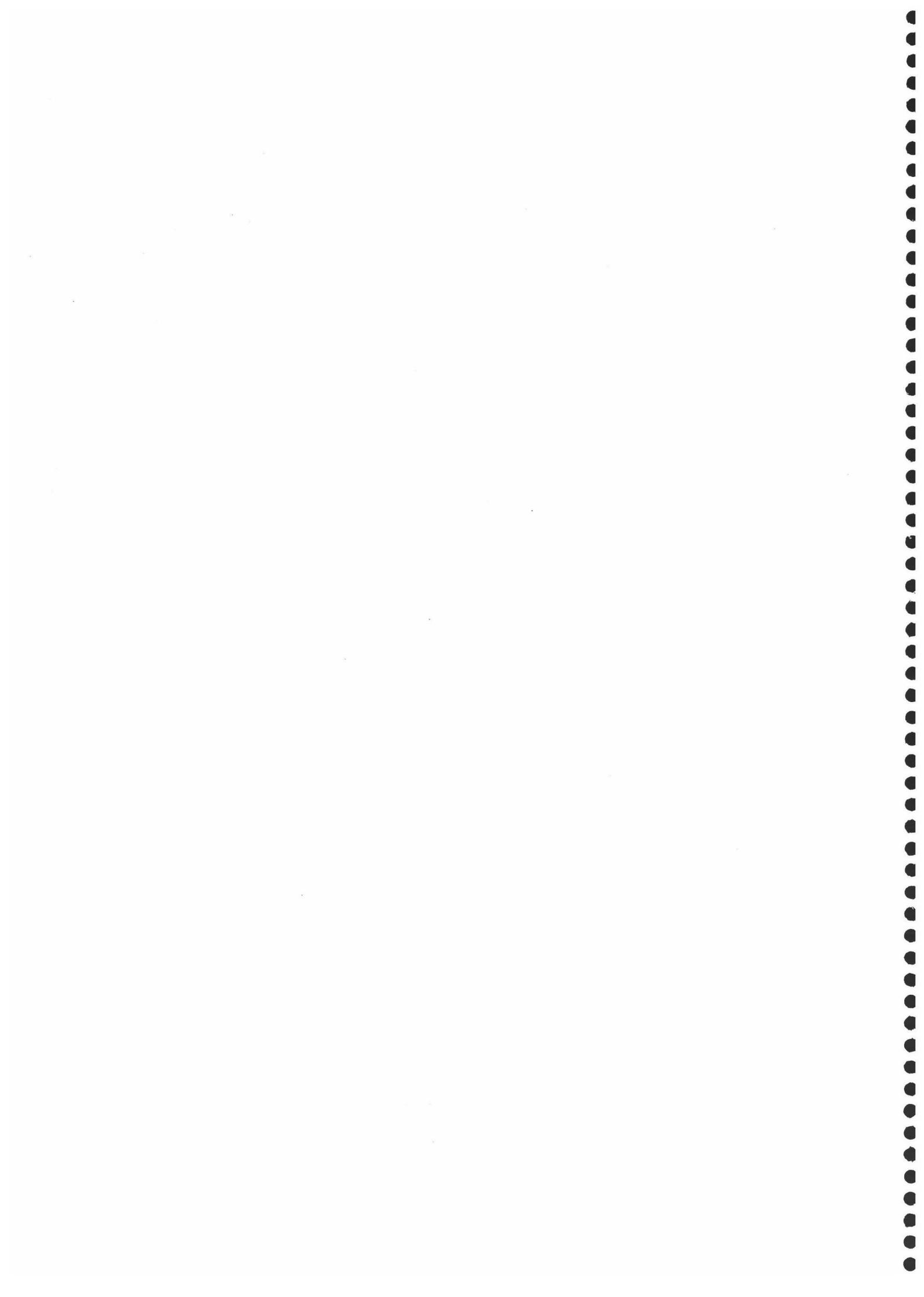


Figura IV.4.18. Calibrado con patrones (○), adición de patrón (□) y Youden (Δ) para el bis-GMA.

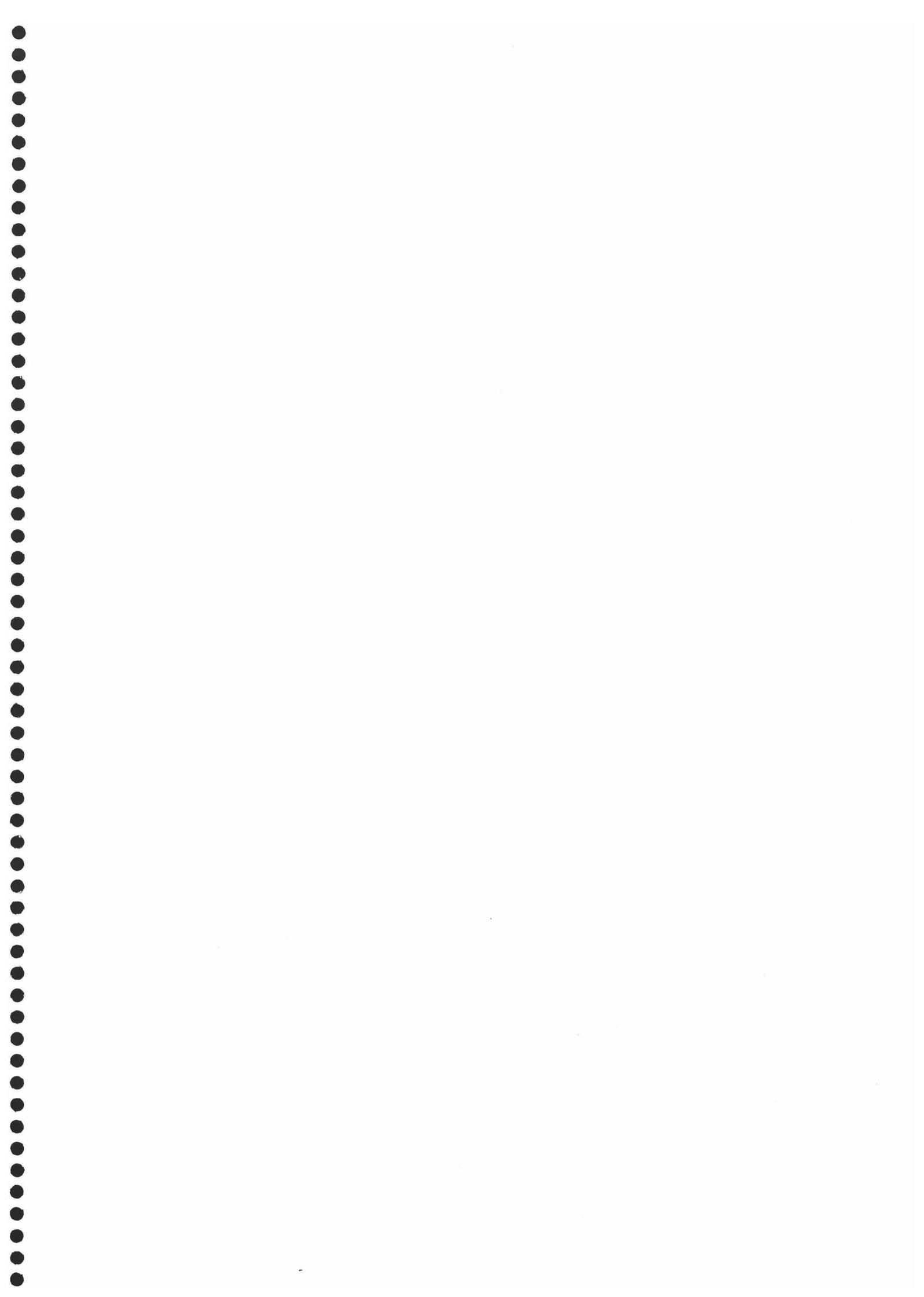
Los resultados obtenidos, ponen de manifiesto que:

- En la comparación de las pendientes de ambos calibrados, en todos los casos se obtiene una conclusión no significativa, o sea, se concluye por  $H_0$  ( $P > 10\%$ ) las pendientes son iguales.
- En todos los casos el valor de  $a_Y$  estaba incluido en el intervalo calculado para la  $a'_S$ .
- Al comparar el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con patrones ( $c_{x,S}$ ) y el contenido de analito en la disolución calculado a partir del calibrado con adición de patrón ( $c_{x,A}$ ), se observó que en todos los casos la conclusión es por  $H_0$  ( $P > 5\%$ ), es decir el método es exacto para los cuatro analitos con un nivel de significación mayor del 5%.

El método queda *validado* para la determinación de TEGDMA, bisfenol A, bis-DMA y bis-GMA en saliva humana.



CONCLUSIONES



La investigación desarrollada a lo largo de esta Memoria ha conducido a las siguientes conclusiones:

1.- El bisfenol A presenta fluorescencia en diferentes disolventes orgánicos, observándose una disminución de su rendimiento cuando se encuentra en disolución acuosa.

Para la modificación del entorno químico se ha seguido una doble estrategia: la adición de modificadores de señal en medio acuoso y la extracción del bisfenol A en diferentes disolventes orgánicos.

Los estudios realizados han permitido seleccionar la  $\beta$ -ciclodextrina como el modificador de señal más adecuado en medio acuoso y el éter etílico como disolvente y donde el bisfenol A presenta mejor rendimiento fluorescente.

2.- Se ha comprobado que el bisfenol A origina en medio acuoso un complejo de inclusión de estequiometría 1:1 con la  $\beta$ -ciclodextrina.

Se han estudiado las variables experimentales que afectan a la formación de este complejo, estableciéndose el valor de su constante de formación, así como su constante de acidez. Se ha llevado a cabo así mismo un estudio de interferencias por parte de las especies químicas que se encuentran habitualmente en las aguas objeto de estudio.

Como consecuencia de los estudios realizados, se ha propuesto un método para la determinación de bisfenol A en aguas naturales mediante espectrofluorimetría y formación de complejos de inclusión con  $\beta$ -ciclodextrina. En la tabla 1 se muestran los valores de los parámetros de calidad del método optimizado.

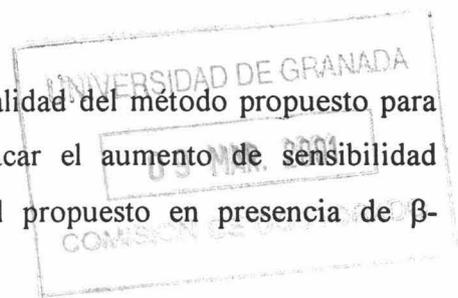
*Tabla 1. Parámetros de calidad del método analítico.*

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
<b>b</b> ( $\text{l}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ )	$2.91 \pm 0.03$	<b>C<sub>L</sub></b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	0.5
<b>a</b> (UF)	$1.82 \pm 0.84$	<b>C<sub>Q</sub></b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	1.7
<b>r<sup>2</sup></b> (%)	99.94	<b>DER</b> (%)	0.92
<b>s<sub>RC</sub></b>	5.035	<b>S<sub>analítica</sub></b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	1.73
<b>RDL</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	10.0-200.0	---	---

3.- Se ha propuesto un método para la determinación de bisfenol A en presencia de fenol como interferente, en aguas naturales, mediante espectrofluorimetría derivada previa microextracción líquido-líquido con éter etílico.

Se han establecido funciones de calibrado para bisfenol A en presencia de cantidades crecientes de fenol, observándose la independencia de la señal analítica emitida por el bisfenol A.

En la tabla 2 se muestran los parámetros de calidad del método propuesto para tres volúmenes de muestra diferentes. Es de destacar el aumento de sensibilidad experimentado en este segundo método respecto al propuesto en presencia de  $\beta$ -ciclodextrina.



*Tabla 2. Parámetros de calidad del método analítico.*

Parámetro	100 ml	250 ml	500 ml
<b>b</b> ( $\text{l}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ )	$65.5 \pm 7.3$	$135.0 \pm 2.5$	$138 \pm 1.3$
<b>a</b> (uf)	$0.56 \pm 0.8$	$14.9 \pm 1.0$	$14.0 \pm 5.3$
<b>r<sup>2</sup></b> (%)	99.8%	99.9%	99.9%
<b>s<sub>RC</sub></b>	3.92	5.56	2.86
<b>RDL</b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	1.0-20.0	0.5-10.0	0.5-10.0
<b>C<sub>L</sub></b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	0.14	0.07	0.07
<b>C<sub>Q</sub></b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	0.48	0.23	0.23
<b>DER</b> (%)	2.37	2.92	2.86
<b>S<sub>analítica</sub></b> ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	0.06	0.04	0.02

4.- Haciendo uso de la microextracción líquido-líquido, se ha propuesto un método analítico para la determinación conjunta de bisfenol A, fenol y bisfenol A diglicidiléter en aguas naturales, mediante calibración multivariante PLS. Se ha establecido el modelo de calibración, PLS-1, el cual se ha empleado para la predicción de la concentración de los tres compuestos en muestras reales.

En la tabla 3 se recogen los parámetros analíticos del método propuesto.

*Tabla 3. Parámetros estadísticos para PLS-1.*

	Parámetro	PLS-1		
		Fenol	Bisfenol A	BADGE
(*)	Factores	3	5	6
	RMSD	0.328	0.216	0.417
	r <sup>2</sup> (%)	0.997	0.998	0.998

(\*) Datos centrados con respecto de la media

Los estudios de recuperación realizados en muestras reales conteniendo diferentes relaciones de los tres compuestos, han ofrecido buenos resultados, encontrándose errores en predicción inferiores al 5%.

5.- Se ha estudiado la reacción que tiene lugar entre el bisfenol A y el cloro libre presente en las aguas cloradas de abastecimiento público. Se ha comprobado que este compuesto reacciona originando los correspondientes derivados mono, di, tri y tetraclorados. Una vez estudiadas las variables experimentales que influyen sobre las reacciones, se han sintetizado y aislado estos compuestos mediante cromatografía líquida en columna y se han caracterizado mediante espectrometría de masas (MS) y resonancia magnética nuclear (<sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN).

6.- Se aplicó la cromatografía de gases-espectrometría de masas al estudio de la mezcla formada por bisfenol F, bisfenol A y sus correspondientes diglicidiléteres en aguas residuales, como índice de contaminación por resinas epoxi, previa extracción

líquido-líquido con triclorometano y silanización de los compuestos antes de la inyección cromatográfica.

La optimización de las principales variables experimentales que afectan tanto a la extracción de los compuestos, como a la derivatización de los mismos ha permitido proponer un método para la determinación conjunta de estos compuestos. El método ha sido aplicado a su determinación en aguas residuales de urbanas de las ciudades Granada, Loja (Granada) y Melilla.

En la tabla 4, se muestran los principales parámetros analíticos del método propuesto.

*Tabla 4. Parámetros de calidad del método analítico.*

Parámetro	Bisfenol F-Sil	Bisfenol A-Sil	BFDGE	BADGE
<b>b</b> ( $l \cdot \mu g^{-1}$ )	0.0311	0.1552	0.0527	0.0313
<b>a</b>	0.0005	0.0006	0.0099	0.008
<b>r<sup>2</sup></b> (%)	99.76	99.93	99.78	99.77
<b>s<sub>RC</sub></b>	0.002	0.001	0.049	0.030
<b>RDL</b> ( $\mu g \cdot l^{-1}$ )	0.05-2.50	0.01-0.50	1.00-50.00	1.00-50.00
<b>C<sub>L</sub></b> ( $ng \cdot l^{-1}$ )	18.0	6.0	130.0	93.0
<b>C<sub>Q</sub></b> ( $ng \cdot l^{-1}$ )	60.0	20.0	432.0	310.0
<b>DER</b> (%)	5.54	5.60	6.06	6.30
<b>S<sub>analítica</sub></b> ( $ng \cdot l^{-1}$ )	48.0	5.0	932.0	974.0

Este método ha sido validado mediante la metodología de adición de patrón.

7.- Se ha iniciado un nuevo campo de investigación, dedicado al desarrollo de metodología analítica para la determinación de este tipo de compuestos en muestras biológicas. Así, se ha propuesto un método de determinación conjunta de bisfenol A, trietilenglicoldimetacrilato, bisfenol A dimetacrilato y bisfenol A diglicidildimetacrilato en saliva humana. Se han optimizado las variables experimentales que afectan a la

separación de los analitos de la muestra inicial, y se han establecido las correspondientes funciones de calibrado.

En la tabla 5 se muestran los parámetros de calidad del método propuesto.

*Tabla 5. Parámetros de calidad del método analítico.*

Parámetro	TEGDMA	Bisfenol A	Bis-DMA	Bis-GMA
<b>b</b> ( $l \cdot \mu g^{-1}$ )	12.920	1.826	0.250	0.023
<b>a</b>	0.029	0.052	0.009	0.008
<b>r<sup>2</sup></b> (%)	99.97	99.94	99.84	99.85
<b>s<sub>RC</sub></b>	0.0079	0.0168	0.0038	0.0033
<b>RDL</b> ( $mg \cdot l^{-1}$ )	0.001-0.100	0.010-1.000	0.050-1.000	0.100-10.0
<b>C<sub>L</sub></b> ( $\mu g \cdot l^{-1}$ )	0.3	3.1	12.3	15.1
<b>C<sub>Q</sub></b> ( $\mu g \cdot l^{-1}$ )	1.0	10.3	40.9	50.3
<b>DER</b> (%)	4.65	5.30	4.80	6.85
<b>S<sub>analítica</sub></b> ( $\mu g \cdot l^{-1}$ )	0.6	9.2	15.2	145.4

Este método ha sido validado así mismo empleando la metodología de adición de patrón descrita en la Memoria.

7.- Como consecuencia de la investigación realizada en esta Memoria, se han propuesto seis trabajos de investigación en revistas científicas internacionales, cuatro de los cuales han sido ya publicados y dos están en fase de revisión:

"The Use of  $\beta$ -ciclodextrin Inclusion Complexes for the Analysis of Bisphenol A Residues in Water by Spectrofluorimetry". *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **69**, 99-110, 1998.

"Trace Determination of Phenol, Bisphenol A and Bisphenol A diglycidyl ether in Mixtures by Excitation Fluorescence following Microliquid-liquid Extraction Using Partial Least Squares Regression". *The Analyst*, **124**, 385-390, 1999.

"Determination of Bisphenol A (BPA) in the Presence of Phenol by First-Derivative Fluorescence following Microliquid-liquid Extraction (MLLE)". *Talanta*, **59**, 1141-1148, 2000.

"Determination of Trace Amounts of Bisphenol F, Bisphenol A and Their Diglycidyl Ethers in Wastewater by Gas Chromatography-Mass Spectrometry". *Analytica Chimica Acta*, **431**, 31-40, 2001.

"Identification of Bisphenol A Chloroderivatives in Chlorinated Drinking Water. Estrogenic properties". *Journal Analytical Toxicology*. Enero 2001.

"Determination of TEGDMA, Bisphenol A, Bisfenol A diglicidyl dimethacrylate and Bisphenol A dimethacrylate in human saliva by Gas Chromatography-Mass Spectrometry". *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. 2001