



Universidad de Jaén

Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Determinación de bisfenol A en agua: optimización y validación del método analítico

Alumno: María Isabel Serrano García

Septiembre, 2017



UNIVERSIDAD DE JAÉN

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Grado en Química

Trabajo Fin de Grado

Determinación de bisfenol A en agua: optimización y validación del método analítico espectrofluorimétrico

Trabajo de Fin de Grado presentado por

María Isabel Serrano García

Jaén, Septiembre 2017

Fdo. María Isabel Serrano García

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Bisfenol A	3
1.2. Propiedades fisicoquímicas del bisfenol A	3
1.3. Aplicaciones industriales del bisfenol A.....	4
1.4. Toxicidad.....	6
1.5. Técnicas de separación y análisis del bisfenol A	7
1.5.1. Técnicas de separación y preconcentración.....	8
1.5.2. Técnicas de análisis	12
2. DETERMINACIÓN ESPECTROFLUORIMÉTRICA DEL BISFENOL A EN AGUA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO	16
2.1. Introducción.....	16
2.2. Disoluciones y disolventes empleados.....	16
2.2.1. Disoluciones	16
2.2.2. Disolventes	16
2.2.3. Material de laboratorio	17
2.2.4. Instrumentación	18
2.3. Optimización de variables experimentales	18
2.3.1. Disolvente orgánico	18
2.3.2. Cantidad de disolvente orgánico.....	20

2.3.3.	Tiempo de agitación	21
2.3.4.	Cantidad NaCl	22
2.3.5.	Resumen de la optimización de variables	24
2.4.	Validación del método	24
2.4.1.	Intervalos de trabajo	26
2.4.2.	Límite de detección y de cuantificación	30
2.4.3.	Exactitud: agua fortificada	31
2.4.4.	Precisión	32
2.4.5.	Resumen de los parámetros analíticos.....	33
2.4.6.	Aplicabilidad del método	33
3.	CONCLUSIONES	36
4.	BIBLIOGRAFÍA.....	37

RESUMEN

En este trabajo de fin de grado se ha propuesto un método para la determinación espectrofluorimétrica del bisfenol A (BPA) en agua, basado en una microextracción líquido-líquido (MLLE). Para ello se han optimizado diferentes parámetros que pueden influir en la determinación del BPA, tales como: el disolvente orgánico con el que se extraerá el bisfenol A, la cantidad de disolvente orgánico, el tiempo de agitación y la cantidad de sal para conseguir un efecto salino. Seguidamente se realizó una validación del método, que incluye la determinación de diferentes parámetros analíticos como: la linealidad del método, el límite de detección (LD), el límite de cuantificación (LC), la exactitud y la precisión.

El método analítico es lineal (obteniendo una linealidad $r^2 \geq 0.99$), exacto (con % recuperación entre 85 y 115 %) y preciso (CV < 5%), en un intervalo de concentraciones entre 0.03 ppm y 0.51 ppm. Como resultado se obtuvo el límite de cuantificación en la concentración de 0.025 ppm y el límite de detección en la concentración de 0.008 ppm.

Finalmente, el método propuesto se aplicó a diferentes muestras reales de agua de diferente procedencia.

ABSTRACT

This dissertation proposes a method for the spectrofluorometric determination of bisphenol A (BPA) in water, based on liquid liquid microextraction (MLLE). To this end, various parameters have been optimized that can influence the determination of BPA, such as: the organic solvent from which the bisphenol A is extracted, the amount of organic solvent, the stirring time and the amount of salt to obtain a saline effect. Finally, a validation of the method was carried out, including the determination of several analytical parameters such as: the method line, the limit of detection (LD), the limit of quantification (LC), accuracy and precision.

The analytical method is linear (obtaining a linearity $r^2 \geq 0.99$), exact (with a recovery between 85% and 115%) and accurate (with CV < 5%), in a concentration range between 0.03 ppm and 0.51 ppm. The limit of quantification was obtained in the concentration of 0.025 ppm and the limit of detection in the concentration of 0.008 ppm.

Finally, the proposed method is applied to different real samples of water from different sources.

1. INTRODUCCIÓN

El bisfenol A (BPA) es un compuesto con multitud de usos a nivel industrial y entre ellos se encuentra su aplicación en la producción de envases destinados a estar en contacto con productos alimenticios (Pellegrino R. B., 2015; Del Olmo M., 2000). También destacamos su toxicidad en el ser humano, ya que el BPA puede desempeñar un papel activo en los cánceres reproductivos, fertilidad y otros problemas endocrinos relacionados (Dorantes-Cuéllar A., 2016; Pellegrino R. B., 2015).

Existen diferentes métodos de extracción del BPA, que dependerán de la matriz en la que se encuentre este compuesto, para su análisis podemos destacar las técnicas cromatográficas y espectroscópicas (Del Olmo M., 2000; Zafra A., 2001; Peña A., 2015).

1.1. Bisfenol A

Los bisfenoles son compuestos aromáticos constituidos por dos anillos fenólicos que se unen a través de un grupo puente. Su fórmula general sería $Y(C_6H_5O)_2$, su estructura se muestra en la **Figura 1**, donde “Y” es el grupo puente, pudiendo variar según el compuesto considerado (Zafra A., 2001).

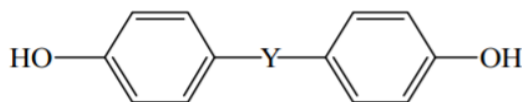


Figura 1. Estructura de los bisfenoles (Zafra A., 2001)

El 2,2-bis(4-hidroxifenil)propano, más conocido como bisfenol A (BPA), tiene como grupo puente “Y” un grupo acetona. Existen otros compuestos dentro de esta familia que son ampliamente empleados hoy en día en la industria, el más simple es el bisfenol F, donde “Y” es un grupo metileno, en el bisfenol B es un metilpropileno, en el bisfenol C es un metilbenceno y en el bisfenol G es un o-isopropilbenceno (McKetta J. J., 1977).

1.2. Propiedades fisicoquímicas del bisfenol A

El BPA es un sólido blanco disponible en forma de polvo o escamas dependiendo del proceso de fabricación, que cristaliza en forma de prismas en ácido acético. Presenta un olor fenólico suave (Corrales J., 2015), es

ligeramente hidrofóbico, por lo que presenta una buena solubilidad en grasas y mala en agua. Como hemos visto anteriormente, el BPA presenta dos grupos hidroxilos, que determina su buena reactividad (Michałowicz J., 2014). La molécula de BPA presenta fluorescencia nativa para distintos disolventes orgánicos polares, con un longitud de excitación entre 225 nm y 279 nm, y una longitud de onda de emisión entre 297 nm y 308 nm (Molina-García L., 2012). Por otro lado en disolución acuosa presenta una señal muy débil, siendo esta última una propiedad importante empleada para su determinación analítica (Batista A.D., 2013). En la **Tabla 1** se recogen todas las propiedades del BPA.

Propiedades fisicoquímicas del BPA	
Número de CAS	80-05-7
Fórmula molecular	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Masa molar	228.287 g/mol
Densidad	1.14-1.195 g/ml entre 20°C-25°C
Solubilidad	120-300 mg/L a 25°C en agua
Punto de ebullición	360.5 °C a 760 mmHg
Punto de fusión	153-157°C
Octanol/agua partición Coeficiente (Log K _{ow})	3.64 ± 0.32

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas del BPA (Corrales J., 2015)

1.3. Aplicaciones industriales del bisfenol A

A lo largo de los años se ha incrementado la producción de los compuestos relacionados con los bisfenoles, en especial con el BPA. Siendo las siguientes sus principales aplicaciones:

- Recibos de papel de las tiendas: Algunos recibos de papel pueden contener BPA como un componente de revestimiento sensible al calor que permite la impresión sin tinta. Esta tecnología de papel proporciona impresión rápida, confiable y rentable (Molina-García L., 2012).
- Resinas de polycarbonato y resinas epoxi: Estas han sido aprobadas durante décadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y

muchas otras agencias gubernamentales en todo el mundo, para uso en contacto con alimentos (European Food Safety Authority (EFSA), 2015; Molina-García L., 2012).

1. **Policarbonatos:** Se utiliza en muchos productos de consumo e industriales. El plástico de policarbonato hecho con BPA es un plástico con alta resistencia térmica, ligero, dureza, claridad óptica y excelente resistencia eléctrica (Molina-García L., 2012). Estos se usan en la fabricación de:

- Gafas protectoras
- Recipientes para conservar alimentos
- Equipamiento de seguridad deportiva
- Automóviles

2. **Resinas epoxi:** Están hechas en su mayoría de BPA. Son esenciales para la vida moderna, salud, pública, seguridad alimentaria, etcétera. Se utiliza en una amplia gama de aplicaciones de consumo e industriales debido a su tenacidad, adhesión, resistencia química y otras propiedades especializadas (European Food Safety Authority (EFSA), 2015; Molina-García L., 2012). La resina epoxi la podemos encontrar en:

- Latas de conservas
- Aviones
- Fibra óptica y placa de circuitos eléctricos

- Aplicaciones médicas: El policarbonato es el mejor material de su clase y es difícil de sustituir en aplicaciones que salvan y mejoran vidas (Molina-García L., 2012). Podemos encontrarlos en:

- ✓ *Cirugía:* En algunos dispositivos quirúrgicos, particularmente los utilizados en cirugía laparoscópica (Molina-García L., 2012).
- ✓ *Medicina:* El plástico de policarbonato es con frecuencia la opción preferida para fabricar dispositivos de administración de fármacos, desde nebulizadores y máquinas de diálisis hasta jeringas de seguridad sin aguja (Molina-García L., 2012).

- ✓ *Selladores dentales*: El BPA en selladores dentales se utiliza como revestimiento para proteger los dientes de los adultos y niños contra las caries (Hernández D., 2014).

1.4. Toxicidad

El BPA forma parte de grupo de compuestos disruptores endocrinos (EDCs). Estos se denominan “sustancias exógenas al organismo que se encuentran en el medio ambiente, alimentos envasados en recipientes de plástico (policarbonatos) y en los productos destinados a los consumidores, que interfieren con la biosíntesis de hormonas, el metabolismo y en las acciones resultantes de estas, provocando una alteración hormonal del individuo expuesto a este” (García J.A., 2015; Beverly R.S., 2011). Dado que el BPA puede emigrar del policarbonato, cuando se encuentra expuesto a elevadas temperaturas, a los alimentos y aguas, que acondicionados en estos recipientes de plástico, pueden contaminarse (Dorantes-Cuéllar A., 2016; Fischnaller M., 2016).

Se ha investigado en profundidad en animales, especialmente en roedores y primates, sujetos a determinadas dosis de exposición de BPA, identificando diversos efectos tóxicos. Se ha visto que después de administración oral, el BPA se absorbía rápidamente en gran proporción (85-100% de la dosis administrada) en el tracto gastrointestinal. El BPA desaparece rápidamente de la sangre, ya que se observa un efecto primario en el hígado, donde se metaboliza en gran parte. Finalmente en estudios a ratones hembras embarazadas se detectó el BPA libre en la placenta y en los tejidos del feto (Pottenger L.H., 2000).

En los seres humanos la respuesta tóxica depende de la edad de los individuos, siendo el feto y los recién nacidos lo más vulnerables ya que no pueden eliminar el BPA de su organismo tan fácilmente. Cuando el BPA alcanza por vía oral el organismo se metaboliza en el hígado con mucha rapidez convirtiéndose en un metabolito muy soluble, el BPA-glucuronido (BPA-GLU). Una pequeña cantidad de BPA libre puede unirse a los receptores estrogénicos (ER) produciendo la alteración hormonal y efectos diversos que veremos posteriormente. El BPA se elimina fácilmente por la orina

(aproximadamente un 80%) y el tiempo de eliminación es inferior a seis horas (Dorantes-Cuéllar A., 2016). Los efectos tóxicos en seres vivos debidos a la exposición del BPA incluyen:

- El BPA afecta al equilibrio endocrino contribuyendo a desarrollar obesidad (Michałowicz J., 2014).
- El BPA en dosis bajas altera el desarrollo de la glándula mamaria y aumenta la incidencia de tumores (Michałowicz J., 2014).
- Puede causar trastornos reproductivos, de desarrollo y metabólicos. (Fischnaller M., 2016).
- En células procariotas el BPA no muestra actividad mutagénica, sin embargo, en células eucariotas es capaz de dañar al ADN (Michałowicz J., 2014).
- Se relaciona con enfermedades de corazón y el desarrollo de la diabetes (Lang I. A., 2008).
- También es capaz de estimular e inhibir la actividad de las células del sistema inmune (Michałowicz J., 2014).
- Pequeñas dosis de BPA causan daño a los hepatocitos por estrés oxidativo. Además, un dosis alta de BPA aumenta significativamente el efecto bioquímico de enzimas hepáticas y la actividad de los genes antioxidantes en el tejido hepático (Michałowicz J., 2014)

1.5. Técnicas de separación y análisis del bisfenol A

Tal y como se ha dicho anteriormente, el BPA es una sustancia tóxica y peligrosa para el medio ambiente. En la actualidad existe un gran número de investigadores dedicados a la metodología analítica para determinación de BPA en distintas matrices y haciendo un uso en la mayoría de los casos de técnicas de separación. Las matrices en las que podemos encontrar el BPA son muy diversas, destacamos el agua de distinta procedencia, resinas, plásticos, alimentos, etcétera (Ballesteros-Gómez A. M., 2012).

Las técnicas que se utilicen para la determinación de BPA dependerán de la matriz en la que se encuentre, y de las propiedades del compuesto. Normalmente, previo al análisis, se realizan técnicas de separación con objeto

de minimizar o eliminar posibles interferentes e incluyo el uso de etapas de preconcentración. Destacamos la extracción líquido-líquido (LLE) y la microextracción líquido-líquido (SME) y finalmente se realizará un análisis para identificar y determinar el BPA, las técnicas más empleadas son las cromatográficas y espectroscópicas (Zimmers S. M., 2014).

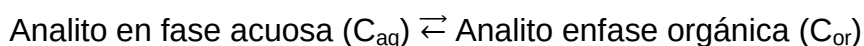
Primero se explicará las distintas técnicas de separación y preconcentración de la muestra y seguidamente las técnicas de análisis.

1.5.1. Técnicas de separación y preconcentración

1.5.1.1. Extracción líquido-líquido (LLE)

La extracción líquido-líquido (LLE) es la operación más básica para la separación de mezclas líquidas homogéneas, ya que en la separación se ha utilizado ampliamente para la extracción de analitos tanto orgánicos como inorgánicos. Esta técnica consiste en separar una o varias sustancias disueltas en un disolvente mediante su transferencia a otro disolvente inmiscible, o parcialmente inmiscible (Cela R., 2003).

El soluto se distribuye entre una fase acuosa y otra orgánica, tal que:



En el equilibrio, determinado por el coeficiente de distribución K_d , como podemos ver en la expresión **(1)**, la relación de concentraciones entre las fases acuosa y orgánica será constante e independiente de la cantidad de soluto.

$$K_d = \frac{C_{or}}{C_{ac}} \quad (1)$$

Por lo que, cuanto mayor sea el valor de K_d más desplazado estará el equilibrio hacia la fase orgánica por lo que aumentará la eficacia de la extracción. Para cada analito hay un coeficiente de distribución.

El procedimiento de la LLE, llevado a cabo en embudos de decantación, consiste en introducir una muestra acuosa con el analito que queremos determinar, seguidamente añadimos el disolvente orgánico inmiscible con el agua, agitamos vigorosamente durante un tiempo y dejaremos en reposo para separar ambas fases. Periódicamente, es necesario ventear el exceso de

presión generada en el interior del embudo. Los distintos analitos presentes se distribuyen entre la fase acuosa y la orgánica de acuerdo con sus solubilidades relativas. Finalmente se separa la fase deseada. En la **Figura 2** podemos observar un esquema del proceso LLE (Cortada-Cortés C., 2012).

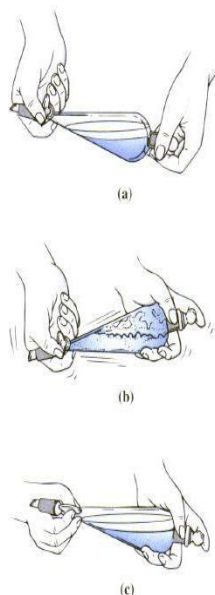


Figura 2. Proceso de LLE. **(a)** Muestra acuosa que contiene al analito y disolvente orgánico. **(b)** Agitación vigorosa durante un tiempo. **(c)** Reposo para una mejor separación (Cortada-Cortés C., 2012)

Las variables que influyen en la eficacia del método de LLE van a ser:

- **El disolvente extractante:** Se debe de elegir un disolvente adecuado para la extracción, para ello nos fijaremos en las distintas propiedades. Debemos conseguir, como hemos dicho anteriormente, un valor de K_d lo más elevada posible. Otras cualidades es poseer una adecuada polaridad, presentar una solubilidad baja por el agua (inferior del 10%) y que sea compatible con la técnica analíticas que se utilicen posteriormente. También se quiere que el disolvente no sea miscible con el agua, matriz en la que se encuentra el BPA (Cortada-Cortés C., 2012).
- **El pH de la muestra:** El analito presenta diferentes formas más o menos polares dependiendo del pH, se puede modificar para conseguir la máxima extracción (Cortada-Cortés C., 2012).

- **El efecto salino o fuerza iónica:** Esta propiedad hace que se desplace el equilibrio favoreciendo el paso del analito hacia la fase orgánica ya que disminuye la actividad del agua y favorece la solvatación de los iones de la sal, es lo que se conoce como efecto “salting out”. Se utiliza una sal (Cortada-Cortés C., 2012).

La LLE es una técnica muy útil para la extracción de compuestos orgánicos de muy diferente naturaleza. Sin embargo existe una serie de inconvenientes en el uso de la misma, como por ejemplo, el tiempo de extracción es muy largo, se usa gran cantidad de disolvente orgánico, puede producir pérdidas de compuestos debido al proceso de evaporación. Para solventar todos estos inconvenientes, o al menos parte de ellos, se utiliza la microextracción líquido-líquido (Cortada-Cortés C., 2012).

1.5.1.2. Microextracción líquido-líquido (SME)

La microextracción con disolvente (SME) se ha convertido en los últimos quince años en una de las formas más fáciles y simple de limpieza y preconcentración de microcontaminantes orgánicos a microescala. Ha tenido un rápido desarrollo debido a que es barata, fácil de realizar, no necesita equipos especiales para llevarlo a cabo, existe una mejora en el enriquecimiento y hay un amplio campo de aplicación.

En esta técnica de extracción se utiliza los principios de la extracción líquido-líquido (LLE) y se aplica a volúmenes muy pequeños tanto de muestra como de disolvente extractante. Las ventajas que presenta este tipo de técnica son: no es necesario la concentración del disolvente o pérdidas de compuestos de interés, el tiempo de extracción se reduce y los volúmenes de disolvente tóxicos son más bajos (Cortada-Cortés C., 2012).

Para poner en práctica del procedimiento de microextracción se han usado diferentes dispositivos experimentales a lo largo de la historia, seguidamente, destacamos los tres más importantes.

- ✓ En 1979 se propuso un micro método para la extracción de bajos niveles de pesticida, para ello emplea un disolvente menos denso que el agua, el hexano.

En un frasco se introduce agua y hexano, se agita manualmente durante varios minutos (1). A continuación, se inclina el frasco y se adiciona agua a través del brazo lateral, se sitúa la capa de disolvente en la porción central del tubo capilar (2). Finalmente, se recupera un volumen de hexano y el extracto puede ser analizado directamente. En la **Figura 3** se muestra la propuesta del dispositivo (Zafra A., 2001).

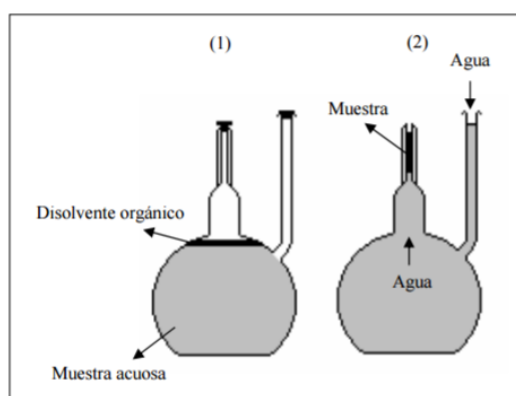


Figura 3. Método de Murray (Zafra A., 2001)

- ✓ Más tarde se propuso otro dispositivo para disolventes menos densos que el agua empleando tolueno. La muestra acuosa saturada de NaCl se introduce en un bote de cuello estrecho, se adiciona el disolvente, se cierra y se agita mecánicamente. Una vez separada las fases, el disolvente orgánico, se lleva hasta el estrechamiento del bote por adición de agua saturada de NaCl usando una pipeta Pasteur conectada a un embudo de decantación (1). Finalmente, la fase orgánica se recoge con ayuda de otra pipeta Pasteur y se transfiere directamente a un vial para el análisis (2). En la **Figura 4** vemos la imagen del dispositivo empleado (Zafra A., 2001).

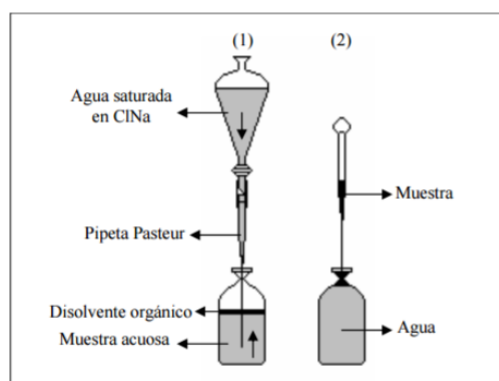


Figura 4. Método de Stan (Zafra A., 2001)

Los dos dispositivos presentaban baja reproducibilidad, por lo que se propuso un nuevo dispositivo, que se explicará más adelante. Él cual se escogió para la determinación de BPA en agua (Zafra A., 2001).

1.5.2. Técnicas de análisis

En bibliografía se han encontrado diferentes técnicas de análisis para la determinación de bisfenol A en diferentes matrices ambientales y biológicas. Para la determinación de bisfenol A en productos lácteos como la leche, fórmulas infantiles (concentradas y en polvo) o leche materna es habitual usar cromatografía líquidas de alta resolución (HPLC), cromatografía-espectrometría de masas (MS) o cromatografía de gases (GC) (Ackerman L. K., 2010; Otaka H., 2003; Yan W., 2009). En el caso de alimentos como el pescado es común utilizar cromatografía líquida (LC) o cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Fattore M.A.; 2015; Alabi A.; 2014; Chen W. L., 2012; Wang S., 2011). En la determinación de bisfenol A en agua las técnicas más empleadas son la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la espectroscopía fluorescente (Del Olmo, M., 2000; Batista A., 2013). Nos centraremos en la espectroscopía de fluorescencia, ya que, como hemos dicho anteriormente, el bisfenol A presenta fluorescencia nativa (Molina-García L., 2012).

- **Espectroscopía fluorescente.** La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por absorción de radiación electromagnética y al relajarse al estado basal liberan el exceso de energía en forma de fotones (Skoog D. A., 1994). Se obtiene

con la disposición instrumental que vemos mostrada en la **Figura 5** (Rubinson K. A., 2000).

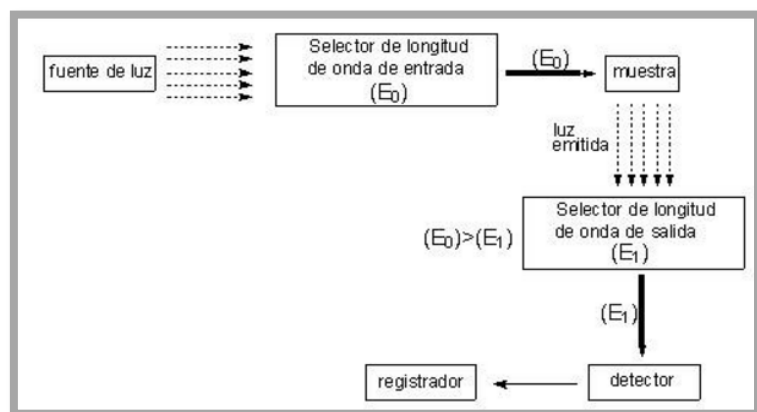


Figura 5. Equipo experimental generalizado de la espectrometría de fluorescencia (Rubinson K. A., 2000)

Se requiere una fuente de luz en la región de energía apropiada, y la luz incidente es monocromática. En la figura observamos que la luz incidente llega a la muestra después de pasar a través de un primer monocromador; la muestra absorbe la luz y a continuación la reemite en todas las direcciones y a mayores longitudes de onda. La luminiscencia que sale de la muestra se mide bajo un ángulo que no está en línea con el eje que conecta la fuente y la muestra (90°). Si la luminiscencia es proporcional al contenido de analito, se puede utilizar para cuantificar el analito (Rubinson K. A., 2000).

En la **Figura 6** se muestra un diagrama de energía para una especie molecular fotoluminiscente.

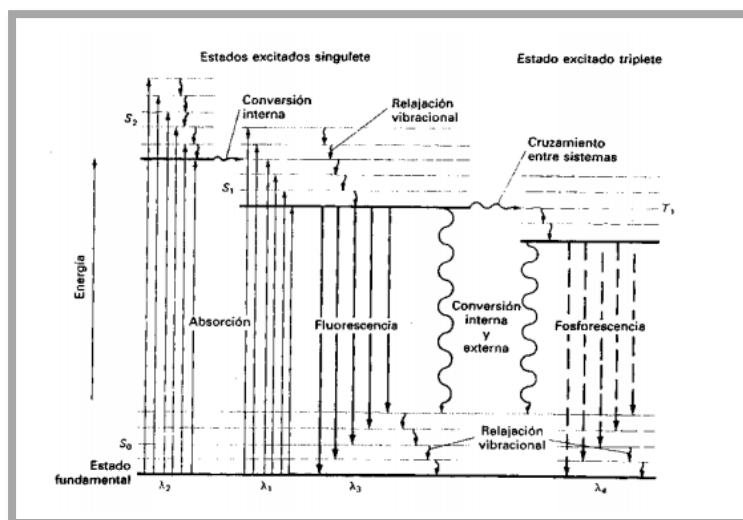


Figura 6. Diagrama de los niveles de energía (Rubinson K. A, 2000)

La línea horizontal en la parte baja del diagrama, representa la energía del estado fundamental de la molécula, siendo normalmente un estado singlete y se designa como S_0 . Las líneas fuertes de arriba corresponde a niveles de energía de los estados vibracionales fundamentales de los tres estados electrónicos excitados (S_1 y S_2). Cada uno de estos estados electrónicos muestra 5 niveles vibracionales, cuando la molécula se irradia con ondas electromagnéticas, cuya energía coincide con las diferencias de energía entre los diferentes niveles, se producen las transiciones electrónicas que se muestran en la **Figura 6**.

La relajación molecular tiene lugar durante las colisiones entre moléculas excitadas y las moléculas del disolvente. También puede ocurrir el relajamiento no radiante entre el nivel vibracional inferior de un estado excitado y el nivel vibracional superior de otro estado electrónico.

La fluorescencia es otro proceso de relajación; la radiación fluorescente se emite cuando las moléculas electrónicamente excitadas se relajan a cualquiera de los estados vibracionales del estado electrónico basal. La fluorescencia es un mecanismo mediante el cual la molécula regresa a su estado basal después de haber sido excitado por absorción de radiación. A priori, cualquier molécula capaz de absorber radiación electromagnética sería capaz de absorber radiación electromagnética y sería capaz de fluorescer, así la mayoría de los compuestos que

contiene anillos aromáticos proporcionan emisión fluorescente. En su caso, la mayoría de los hidrocarburos aromáticos no sustituidos fluorescen con una emisión fluorescente creciente con el número de anillos y con su grado de condensación. Ciertos compuestos carbonílicos alifáticos y alicíclicos y estructuras de dobles enlaces también lo hacen pero en menor proporción (Skoog D. A., 1994).

Las dos principales ventajas de los métodos de fluorescencia sobre otros métodos son:

- 1) Una sensibilidad mayor
- 2) Mayor intervalo de respuesta lineal

No obstante, los métodos de fluorescencia se aplican menos que otros métodos, ya que no todos los sistemas químicos son capaces de fluorescer y además el equipamiento necesario es mucho más costoso que el de otros métodos (Rubinson K. A., 2000).

2. DETERMINACIÓN ESPECTROFLUORIMÉTRICA DEL BISFENOL A EN AGUA MEDIANTE MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO

2.1. Introducción

Nos centramos en el uso de espectrofluorimetría como técnica para la determinación individual del BPA en matriz acuosa, puesto que el analito presenta fluorescencia nativa. En el caso del método de preconcentración y separación, nos centraremos en la microextracción líquido-líquido de separación de fases; para ello, utilizaremos un disolvente orgánico que nos permita la medida directa de la fluorescencia emitida por el analito. Por otra parte es importante destacar la cantidad de disolvente, de ahí que se haya elegido la microextracción, pues requiere poca cantidad de disolvente orgánico para recuperar una pequeña concentración de BPA y reducir el riesgo de contaminación, así como el tiempo de análisis empleado.

2.2. Disoluciones y disolventes empleados

En esta sección se recogen todas las disoluciones y reactivos utilizados en la parte experimental

2.2.1. Disoluciones

❖ Disolución patrón

Con ayuda de un pesasustancias pesamos una cantidad próxima a 10 mg de BPA (SIGMA-ALDRICH), la cantidad pesada es de 17,7 mg. Esta cantidad la añadimos a un matraz aforado de 100 ml de capacidad y lo enrasamos con etanol, ya que el BPA presenta una gran estabilidad y solubilidad en medio etanólico, además la miscibilidad del etanol en agua permite la preparación de otras disoluciones patrón de menor concentración.

La disolución fue conservada en un frasco opaco para evitar la acción de la luz e introducidas en el frigorífico.

2.2.2. Disolventes

- ❖ *Etanol Absoluto*, PANREAC 99.0 (v/v) %.
- ❖ *Éter dietílico*, SIGMA-ALDRICH.
- ❖ *n-Hexano*, PANREAC PRS.
- ❖ *MIBK*, SIGMA-ALDRICH.

❖ *Agua desionizada*

2.2.3. Material de laboratorio

Aquí desglosaremos todo el material utilizado en la parte experimental.

- **Matraces aforados**, BRAND de diferentes capacidades.
- **Pipetas aforadas**, BRAND de diferentes capacidades.
- **Pipeteadores**, BRAND.
- **Vasos de precipitación**, PYREX de diferentes capacidades.
- **Micropipetas**, THERMO de diferentes capacidades.
- **Probetas**, SIMAX de diferentes capacidades.
- **Cubeta de cuarzo** HELLMA 1 115 F QS para fluorimetría de 10 mm de paso óptico y con un volumen de 400 μ l.
- **Embudos de decantación**, POBEL de 250 ml.
- **Agitador magnético**, SELECTA.
- **Equipo para la extracción líquido-líquido (Figura 7)**, en él se conecta, mediante una goma, un embudo de decantación a un segundo embudo de decantación que contiene agua saturada en NaCl. El segundo embudo se sitúa a mayor altura que el primero por lo que la fase orgánica asciende, por el efecto de vasos comunicantes, hasta situarse en la pieza de vidrio colocada en la parte superior del primer embudo de decantación. Con ayuda de una pipeta de vidrio la fase orgánica puede ser fácilmente transferida a la cubeta de medida (Zafra A., 2001).



Figura 7. Montaje realizado en el laboratorio para la microextracción líquido-líquido

2.2.4. Instrumentación

- **Espectrofluorímetro** VARIAN CARY ECLIPSE (Mulgrave, Australia) con lámpara de descarga de Xenón de 75 kW, monocromadores Czerny-Turner y tubo fotomultiplicador R-928. El equipo está controlado mediante software “Cary Eclipse” para sistemas Windows 95/98NT. El Espectrofluorímetro se caracteriza por poseer una velocidad de barrido espectral muy elevada (hasta $24000 \text{ nm min}^{-1}$), lo que permite llevar a cabo medidas de fluorescencia con gran rapidez.

2.3. Optimización de variables experimentales

En este apartado se estudiarán las distintas variables experimentales que afectan la extracción del BPA en muestras acuosas, concretamente serán el disolvente orgánico, la cantidad de disolvente orgánico, el tiempo de agitación y la cantidad de NaCl (Zafra A., 2001).

2.3.1. Disolvente orgánico

El objetivo es conocer el comportamiento fluorescente del BPA en distintos disolventes orgánicos y en agua, la elección de los disolventes orgánicos está basada en miscibilidad con el agua, eligiéndose disolventes orgánicos no miscibles con agua, puesto que así no se requiere una eliminación previa de la fase acuosa. También los disolventes orgánicos elegidos permiten una medida directa de fluorescencia emitida por el BPA. Por ello los disolventes orgánicos utilizados son: éter dietílico, hexano y MIBK (Metilisobutilcetona) (Zafra, A., 2001).

Para ello, a partir de una disolución patrón de BPA de una concentración de 177 ppm, se prepararon unas disoluciones intermedias. En cuatro matraces de 10 ml se añadió 40 μl de la disolución patrón y se enrasan con los distintos disolventes orgánicos y el agua, teniendo unas concentraciones finales de 0.7 ppm. A continuación, se registraron los correspondientes espectros de excitación y emisión en los rangos de 200 a 290 nm y 290 a 350 nm, respectivamente fijando como $\lambda_{\text{ex}}=278 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}}=306 \text{ nm}$ respectivamente. Se emplearon rendijas de excitación y emisión de 5 nm y un voltaje de 600 V.

En la **Figura 8** y **Figura 9** se muestran los espectros de excitación y de emisión de BPA en los distintos disolventes.

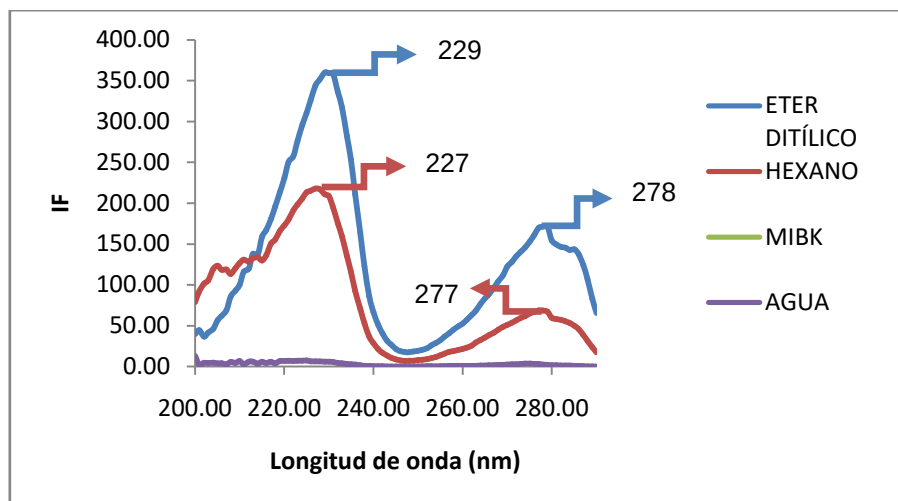


Figura 8. Espectros de excitación de BPA en los distintos disolventes

Como podemos observar en el disolvente éter dietílico, el BPA presenta dos máximos de excitación: uno a 229 nm y otro a 278 nm. En el hexano, el BPA presenta también dos máximos de excitación: uno a 227 nm y otro a 277 nm. Mientras que las señales en el MIBK y del agua son prácticamente despreciables, siendo mayor la intensidad en el éter dietílico que el del hexano.

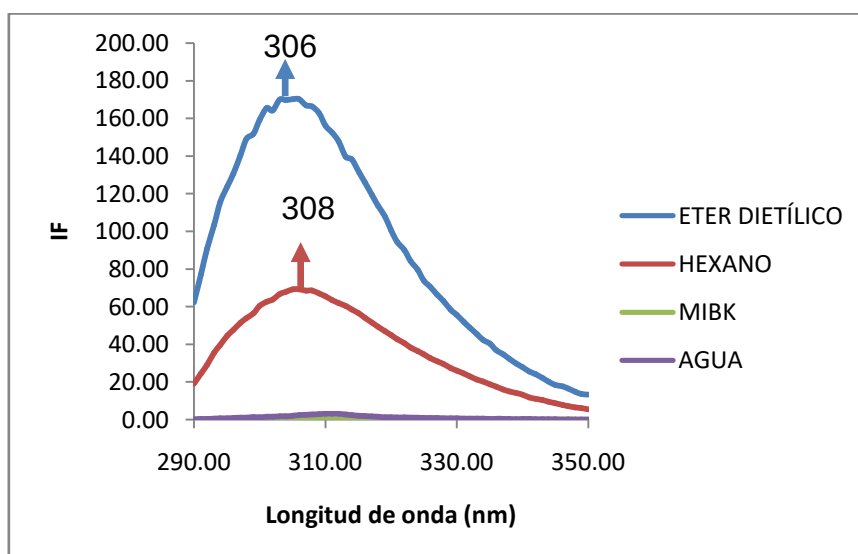


Figura 9. Espectros de emisión de BPA en los distintos disolventes

Con respecto al espectro de emisión, los disolventes que obtienen valores más altos de intensidad son el éter dietílico, con un máximo de emisión a 306 nm; y el hexano, con un máximo de emisión a 308 nm, siendo mayor la intensidad de BPA en el éter dietílico que en el hexano. En MIBK y en el agua son

prácticamente despreciables las señales, por lo que se escoge como disolvente orgánico el éter dietílico.

2.3.2. Cantidad de disolvente orgánico

En este caso, el fin es conocer la cantidad de éter dietílico necesaria de para realizar la extracción líquido-líquido del BPA en muestras acuosas. Las cantidades de disolvente orgánico que añadiremos serán 4 ml, 6 ml, 8 ml y 10 ml.

Para ello, en un embudo de decantación de 250 ml se pondrán 200 ml de agua desionizada previamente saturada con NaCl, le añadiremos 790 μ l de disolución patrón de BPA, teniendo una concentración final de 0.7ppm. Seguidamente se le añade volúmenes crecientes de éter dietílico; agitamos durante 1 minuto manteniendo una velocidad constante; extraemos la cantidad de disolvente y registramos el espectro de emisión fijando las condiciones instrumentales establecidas anteriormente. En la **Figura 10** observamos los espectros de emisión obtenidos a distintos volúmenes.

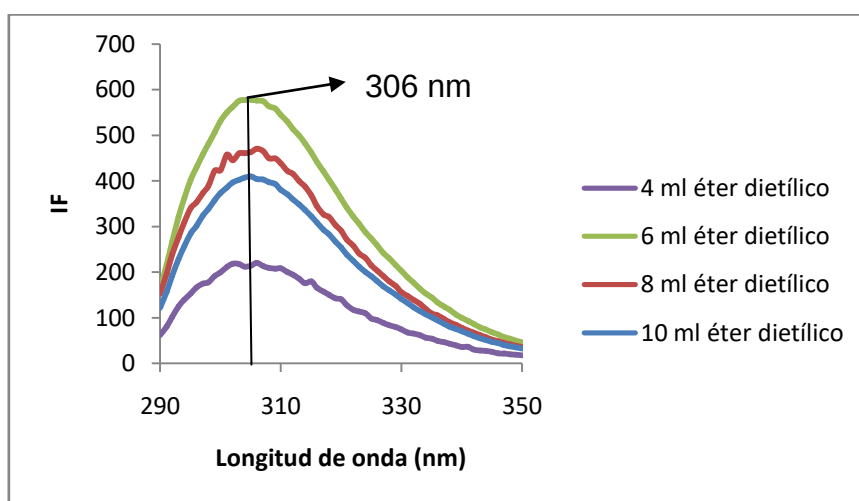


Figura 10. Espectros de emisión del BPA a distintos volúmenes de éter dietílico

Según se observa, el volumen de 6 ml presenta mayor intensidad con respecto a los demás cantidades de éter dietílico. La cantidad de 4 ml es muy pequeña dificultando con ello su extracción, las cantidades de 8 y 10 ml son cantidades grandes de volumen, facilitando su extracción, pero se disminuye la concentración de BPA. En cambio para 6 ml conseguimos la máxima

extracción sin tener que disminuir tanto la concentración y siendo fácil su extracción.

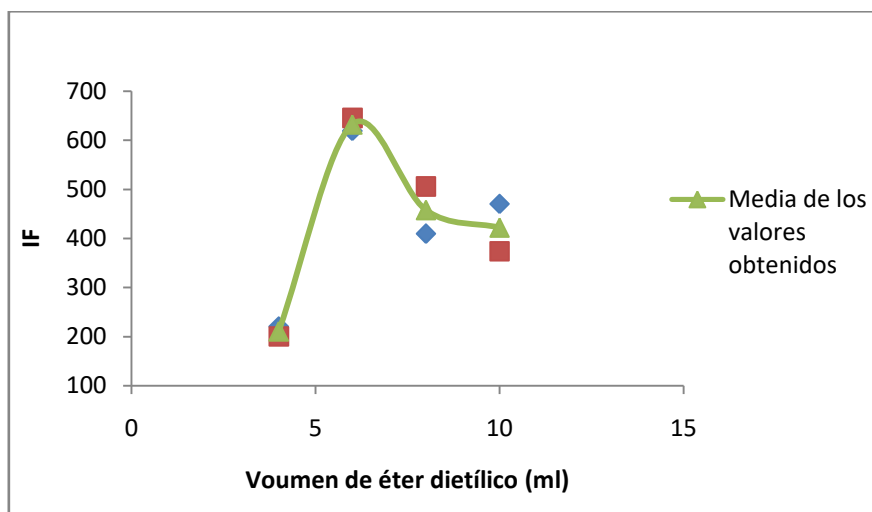


Figura 11. Influencia del volumen de éter dietílico

En la **Figura 11** se puede apreciar la influencia del volumen de disolución. Para ello se realizaron dos medidas de cada volumen de disolvente orgánico y se calculó, también se representó, la media de los valores obtenidos. Como vemos la intensidad va aumentando hasta alcanzar su valor máximo para un volumen de éter dietílico de 6 ml, a partir de este volumen, la señal disminuye. Por tanto se fijó la cantidad de 6 ml de disolvente orgánico.

2.3.3. Tiempo de agitación

Con objeto de estudiar la influencia que el tiempo de agitación ejerce en la extracción del BPA, se añadió 200 ml de agua desionizada previamente saturada con NaCl, a un embudo de decantación con una capacidad de 250 ml. Seguidamente, se añadió 790 μ l de disolución patrón BPA, teniendo una concentración final de 0.7 ppm. Posteriormente se añadió 6 ml de éter dietílico, y se agitó durante tiempos crecientes, manteniendo una velocidad de agitación constante. Finalmente se extrajo la cantidad de éter dietílico y se registraron los espectros de emisión fijando las condiciones instrumentales establecidas anteriormente. Como se observa en la **Figura 12**, en el caso de 30 s de tiempo de agitación presenta una gran intensidad con respecto a las demás.

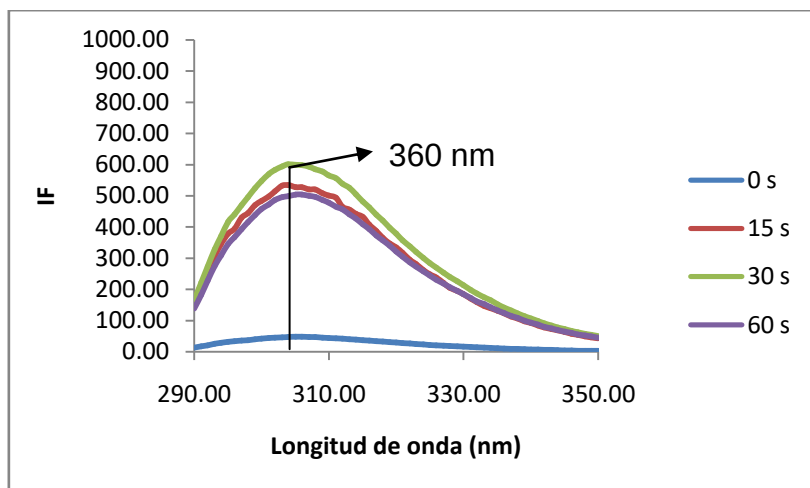


Figura 12. Espectros de emisión del BPA a distintos tiempos

La observación de los resultados, en la **Figura 13**, pone en manifiesto que la intensidad de fluorescencia crece hasta alcanzar un valor máximo para un tiempo de agitación de 30 segundos, a partir de este tiempo, la señal permanece prácticamente constante. Por lo que fijamos el tiempo de agitación de 30 segundos.

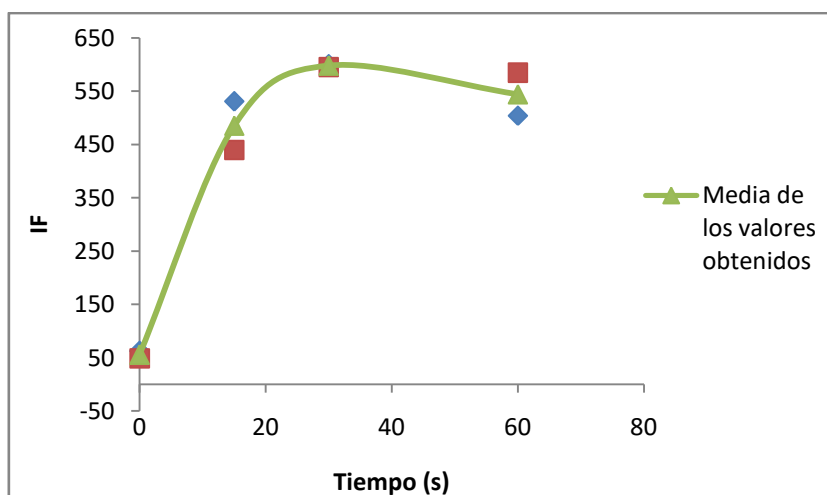


Figura 13. Influencia del tiempo de agitación

2.3.4. Cantidad NaCl

El objetivo es conocer la influencia de la fuerza iónica del medio sobre la intensidad de fluorescencia emitida. Para ello, se escoge el NaCl ya que es fácil su obtención y es la más barata en el mercado.

A continuación, medimos 200 ml de agua desionizada y la trasvasamos a un vaso de precipitado, le añadimos cantidades crecientes de NaCl y se agita con

ayuda de un agitador magnético. Trasvasamos la disolución a un embudo de decantación de 250 ml de capacidad y añadiremos 790µl de disolución patrón de BPA, teniendo una concentración de 0.7 ppm. Seguidamente se le añadió 6 ml de éter dietílico y agitamos con una velocidad constante durante 30 segundos. Como conclusión extraemos la cantidad de éter dietílico para el posterior registro de los espectros de emisión fijando las condiciones instrumentales establecidas anteriormente. En la **Figura 14** observamos los espectros de emisión obtenidos a distintas cantidad de NaCl.

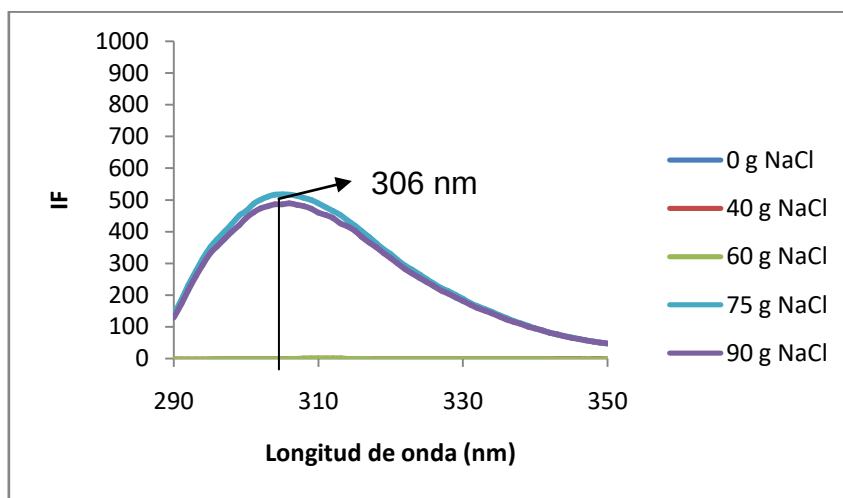


Figura 14. Espectro de emisión del BPA a distintas cantidades de NaCl

Según se observa la cantidad de 75 g de NaCl presenta una mayor intensidad de fluorescencia que la cantidad de 90 g de NaCl, mientras que, para las cantidades de 0 g, 40 g y 60 g de NaCl las intensidades son prácticamente despreciables.

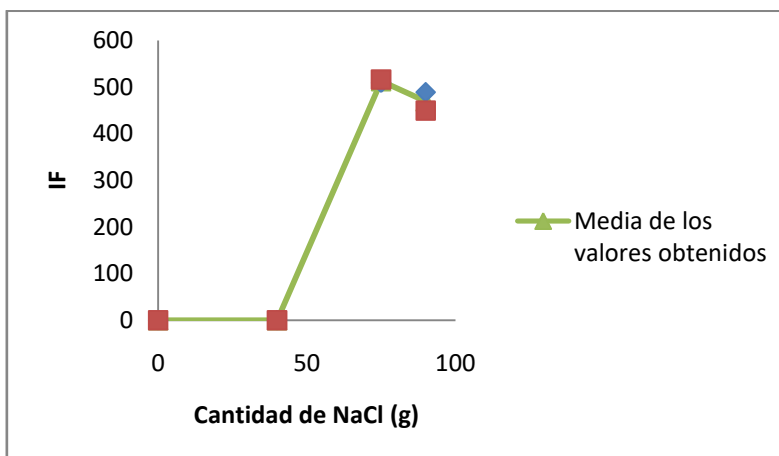


Figura 15. Influencia de la cantidad de NaCl

Como hemos observado en la **Figura 15** la intensidad es mayor para el caso de 75 g con respecto a las demás cantidades, por lo que se escoge la cantidad de 75 g de NaCl.

2.3.5. Resumen de la optimización de variables

En la **Tabla 2** se incluyen los valores óptimos establecidos para las variables experimentales en las experiencias desarrolladas a lo largo de los apartados anteriores.

Variables experimentales	Óptimo para 200 ml
Disolvente	Éter dietílico
Volumen de disolvente (ml)	6
Tiempo de agitación (s)	30
Cantidad de NaCl (g)	75

Tabla 2. Resumen de variables experimentales

2.4. Validación del método

La validación de un método consiste en el proceso establecido para la obtención de pruebas documentadas, mediante estudios sistemáticos de laboratorio y demostrativos, para que un método de análisis sea lo suficientemente fiable y reproducible para producir el resultado previsto dentro de intervalos establecidos (Cañez M. G., 2015; Velandia J. C., 2008). En la **Tabla 3** se puede observar los parámetros analíticos que se usarán en la validación del método.

Parámetros analíticos
Intervalo de trabajo
Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)
Exactitud
Precisión

Tabla 3. Parámetros analíticos para la validación del método.

➤ Intervalo de trabajo

El “intervalo de trabajo” es el intervalo en el cual el método proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. El extremo inferior del

intervalo de trabajo está determinado por el límite de cuantificación, LC. El extremo superior del intervalo de trabajo está definido por las concentraciones a las cuales se observan anomalías significativas en la sensibilidad analítica llamado “efecto meseta” (Velandia J. C., 2008).

Para su cálculo se evalúa la relación entre la señal producida como una función de la concentración del analito mediante el ajuste a modelos lineales por el método de mínimos cuadrados. Se acepta una tendencia lineal cuando el valor de coeficiente de determinación r^2 es igual o mayor a 0.99 (Velandia J. C., 2008; Rodríguez S. C., 2012).

➤ **Límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC)**

Podemos definir el límite de detección de un método analítico como la menor concentración o cantidad de analito detectable con razonable certeza por un procedimiento analítico dado, la concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de una muestra blanco. En la expresión (2) podemos ver como se calcularía (Cañez M. G., 2015; Velandia J. C., 2008).

$$LD = \frac{y_{bl} + 3 * s_{bl}}{b} \quad \begin{array}{l} Y_{bl} = \text{señal promedio del blanco.} \\ S_{bl} = \text{desviación estándar del blanco.} \\ b = \text{pendiente obtenida desde la regresión lineal del} \\ \text{analito.} \end{array} \quad (2)$$

Para el límite de cuantificación podemos decir que es la menor concentración de analito que puede determinarse con precisión y exactitud razonable en las condiciones establecidas, y se expresa en unidades de concentración (Cañez M. G., 2015; Velandia J. C., 2008). En la expresión (3) observamos cómo se calcularía (Quino I., 2007).

$$LC = 3 * LD \quad (3)$$

➤ **Exactitud: disoluciones fortificadas**

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad entre el valor que es aceptado convencionalmente, como el valor verdadero o un valor referencia y el valor experimental encontrado (Velandia J. C., 2008).

Para su cálculo se preparan disoluciones fortificadas; estas son disoluciones en los que el analito ha sido adicionado a valores conocidos; los valores de concentración no pueden superar el intervalo de trabajo del método. Se calcula el porcentaje de recuperación de cada

lectura, utilizando la expresión **(4)** (Cañez M. G., 2015; Velandia J. C., 2008; Thompson M., 2002).

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración encontrada}}{\text{Concentración teórica}} \times 100 \quad (4)$$

En validación, el porcentaje de recuperación aceptable está entre 85 y 115 % (Cañez M. G., 2015; Thompson M., 2002).

➤ **Precisión**

La precisión es una medida de la dispersión de los datos en torno a un valor central o el grado de concordancia entre mediciones replicadas de la misma cantidad, y puede expresarse como porcentaje del coeficiente de variación (%CV) (Velandia J. C., 2008). Para hallar la precisión existe diferentes tipos de estudio:

- Precisión inmediata
- Reproducibilidad
- Repetibilidad

Para el cálculo del porcentaje de coeficiente de variación (% CV) se hace utilizando la expresión **(5)** y el criterio de aceptación para métodos instrumentales es entre 2% y 5% (Velandia J. C., 2008; Gary D., 2009).

$$\% \text{ CV} = \frac{S}{\bar{x}} * 100 \quad \begin{array}{l} \text{Donde;} \\ \bar{x} = \text{media del grupo muestral} \\ S = \text{desviación estándar} \end{array} \quad (5)$$

2.4.1. Intervalos de trabajo

Para determinar el intervalo de trabajo, lo primero que haremos será ver si el intervalo de trabajo coincide cuando se hace directamente en el disolvente orgánico o cuando procede de la extracción de una muestra de agua. Finalmente, una vez comprobado cual coincide con el intervalo de trabajo, realizamos, a partir de este, la recta de calibrado para comprobar la linealidad del método.

2.4.1.1. Comprobación del intervalo de trabajo

En este caso prepararemos una serie de concentraciones crecientes en agua, realizamos la extracción y se tratará de calcular, utilizando una recta de

calibrado obtenida directamente en éter dietílico, las concentraciones en el intervalo de trabajo de éter dietílico. Seguidamente se calculará la recuperación. Si obtenemos un porcentaje de recuperación del cien por cien o constante a lo largo de las concentraciones que hemos ensayado se podrá utilizar el intervalo de trabajo directamente en éter dietílico, si no es así se tendrá en cuenta la extracción en una muestra de agua (**Tabla 4**).

▪ **Intervalo de trabajo directamente en disolvente orgánico**

A partir de la disolución patrón de BPA se prepara una disolución intermedia, la cual tendrá una concentración de 35,4 ppm, se cogen volúmenes crecientes de la disolución intermedia y se llevan a matraces de 10 ml de capacidad para obtener unas concentraciones finales de 0.4 ppm, 0.8 ppm, 1 ppm, 2 ppm, 4 ppm, 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm, 12 ppm y 14 ppm, respectivamente. A continuación se enrasa con éter dietílico y se registra el espectro de emisión fluorescente en el intervalo de 290 a 350 nm, fijando una $\lambda_{\text{ex}}=278$ nm, rendijas de excitación y emisión 5 nm y un voltaje de 600 V. En la **Figura 16** observamos la recta de calibrado obtenida.

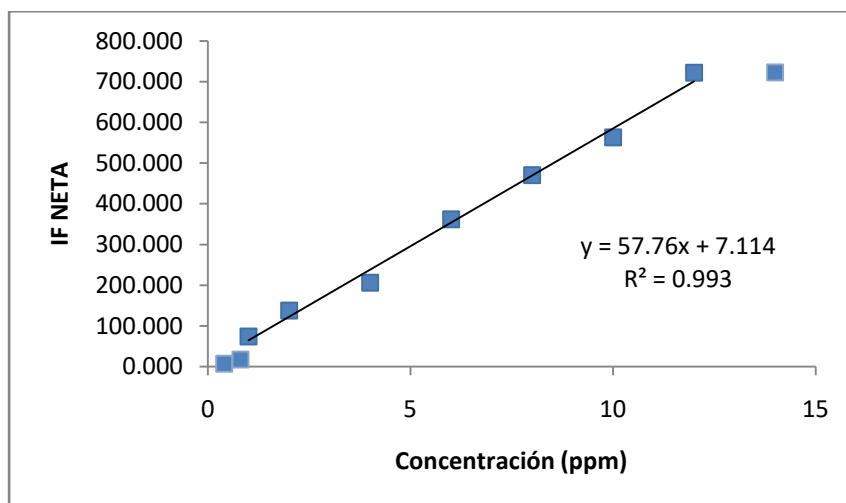


Figura 16. Recta de calibrado para el BPA directamente en disolvente orgánico

Obtenemos una ecuación de la recta, siendo el valor de la pendiente de 57.76, el valor de la ordenada en el origen de 7.114 y una regresión lineal de 0.993.

▪ **Intervalo de trabajo teniendo en cuenta la extracción**

En una serie de matraces aforados de 200 ml de capacidad se introducen volúmenes crecientes de una disolución acuosa de BPA de 177 ppm de concentración, para obtener las concentraciones finales de 0.015 ppm, 0.03 ppm, 0.05 ppm, 0.07 ppm, 0.09 ppm, 0.11 ppm y 0.12 ppm, respectivamente. A continuación, tras enrasar con agua desionizada, previamente saturada con NaCl, se transvasaron a embudos de decantación de 250 ml de capacidad, y se extrajeron con 6 ml de éter dietílico, agitando con una velocidad constante durante 30 s. Posteriormente se registró el espectro de emisión fluorescente en el intervalo de 290 a 350 nm, fijando una $\lambda_{\text{ex}}=278$ nm, rendijas de excitación y emisión 5 nm y un voltaje de 600 V. En la **Figura 17** vemos la recta de calibrado obtenida.

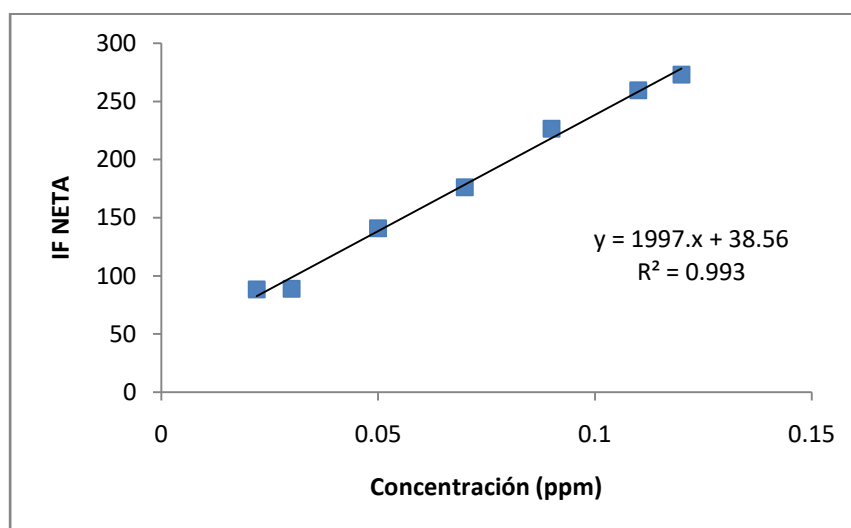


Figura 17. Recta de calibrado del BPA teniendo en cuenta la extracción de una muestra de agua

Se obtiene una ecuación de la recta con una ordenada en el origen de 38.56, una pendiente de 1997 y una regresión lineal de 0.993.

Concentración en agua (ppm)	IF NETA	Concentración en éter dietílico (ppm)	Concentración Teórica (ppm) (Rendimiento 100 %)	Recuperación (%)
0.022	88.362	1.047	2.2	63.9
0.03	88.766	1.414	3	47.1
0.05	140.688	2.313	5	46.3
0.07	176.113	2.926	7	41.8
0.09	226.428	3.797	9	42.2
0.11	259.392	4.368	11	39.7
0.12	272.841	4.601	12	38.3

Tabla 4. Valores para la determinación del calibrado

Como podemos ver en la **Tabla 4**, el porcentaje de recuperación no es constante, además se observa que a medida que aumenta la concentración la recuperación va disminuyendo, por lo que hay que calibrar teniendo en cuenta la extracción a una muestra de agua.

2.4.1.2. Determinación del intervalo de trabajo

Una vez que hemos decidido hacer el intervalo de trabajo teniendo en cuenta la extracción, realizaremos el intervalo de trabajo para comprobar la linealidad del método.

Las señas obtenidas en la recta de calibrado del BPA en 200 ml extraídos con éter dietílico son bajas, por lo que construiremos una recta de calibrado con mayores concentraciones para así obtener mayores señales. Haremos el mismo procedimiento anteriormente explicado, pero en este caso las concentraciones finales serán de 0.03 ppm, 0.09 ppm, 0.18 ppm, 0.28 ppm, 0.35 ppm, 0.43ppm, 0.51 ppm y 0.68 ppm, respectivamente. En la **Figura 18** podemos ver la recta de calibrado obtenida.

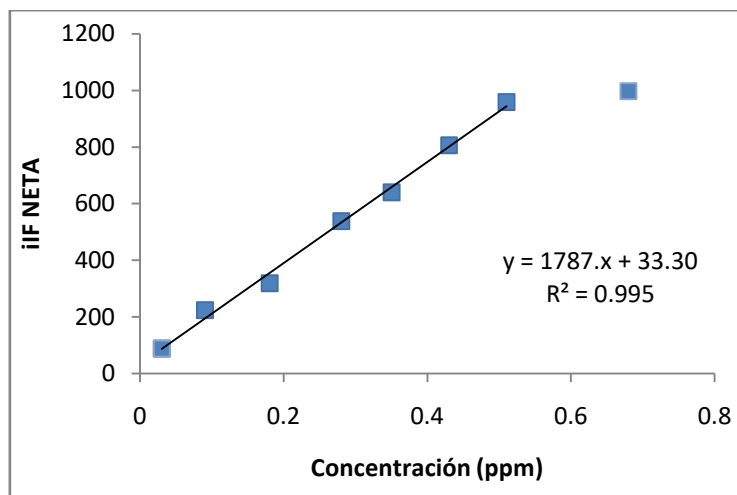


Figura 18. Recta de calibrado del BPA

Como podemos ver nuestro intervalo de trabajo estaría entre 0.03 ppm hasta 0.51 ppm, obteniendo una ecuación de la recta con una ordenada en el origen de 33.30, una pendiente de 1787 ppm y una regresión lineal de 0.9954.

Según la regresión lineal obtenida es mayor que el 0.99, por lo que se cumple la linealidad del método.

2.4.2. Límite de detección y de cuantificación

Para calcular los límites de detección y de cuantificación se aplicó el procedimiento analítico desarrollado para 200 ml de agua a 10 blancos en cada caso. Tras medir las correspondientes señales fluorescentes de los espectros de emisión, observamos la **Tabla 5** donde se recoge los resultados obtenidos.

Blanco	IF
1	13.43
2	12.94
3	12.59
4	13.75
5	12.98
6	13.00
7	12.79
8	13.89
9	11.52
10	12.25

Tabla 5. Señales obtenidas para las diez disoluciones blanco

El valor medio de la señal correspondiente al blanco es de 12.94 con una desviación estándar de 0.68; la pendiente de la recta de calibrado obtenida fue de 1787 ppm, por tanto el límite de detección del método analítico, calculado según la ecuación (1), será de 0.008 ppm. El límite de cuantificación calculado según la ecuación (2) será de 0.025 ppm.

LC 0.025 ppm

LD 0.008 ppm

2.4.3. Exactitud: agua fortificada

Para ello cogemos tres niveles distintos de concentración que estén dentro del intervalo de trabajo en 200 ml de agua extraídos con éter dietílico, las cuales, son 0.14 ppm, 0.28 ppm y 0.38 ppm. Se aplicó el procedimiento analítico desarrollado para un volumen de 200 ml de agua, pero en este caso utilizaremos 200 ml de agua del grifo. Haremos tres extracciones para cada concentración (**Tabla 6**)

Concentración (ppm)	Media de la IF obtenidas	Media de concentraciones obtenidas (ppm)	Recuperación (%)
0.14	272.732	0.136	96.96
0.28	501.206	0.264	95.14
0.38	687.999	0.368	96.99

Tabla 6. Valores obtenidos en el agua fortificada

Destacamos que la recuperación es próxima a cien por cien, la media de las recuperaciones sería 96.36 %, por lo que nuestro método es exacto.

Según el resultado obtenido de recuperación, el procedimiento se puede aplicar para una matriz algo más compleja como es el agua del grifo que utilizaremos para hacer la precisión.

2.4.4. Precisión

Se aplicó el procedimiento analítico propuesto a dos series de disolución que contenía cada una 4 muestras con unas concentraciones de bisfenol A de 0.21 ppm para una serie y 0.41 ppm para la otra. Se registraron los correspondientes espectros de emisión fijando las condiciones instrumentales habituales, este proceso se hizo durante tres días. En la **Tabla 7** recoge los valores obtenidos.

Concentración (ppm)	Días	Media de IF obtenidas	Media de concentración obtenidas (ppm)	Recuperación (%)	% CV
0.21	1	379.882	0.194	95.88	2.76
	2	399.207	0.205		
	3	397.945	0.204		
0.41	1	732.751	0.392	97.87	2.03
	2	756.381	0.405		
	3	761.115	0.407		

Tabla 7. Valores obtenidos en la precisión del método analítico

El valor medio del coeficiente relativo del método es de 2.39 %, no supera el 5%, por lo que nuestro método es preciso.

2.4.5. Resumen de los parámetros analíticos

Los parámetros analíticos calculados son resumidos en la **Tabla 8**.

Parámetros analíticos				
Linealidad	Límite de detección (ppm)	Límite de cuantificación (ppm)	Exactitud (%)	CV (%)
0.9954	0.008	0.025	96.36	2.39

Tabla 8. Resumen de los parámetros analíticos

Los valores obtenidos en la validación nos indican que el método analítico propuesto para la determinación de bisfenol A en agua por espectrofluorimetría mediante microextracción líquido-líquido con éter dietílico, es válido.

2.4.6. Aplicabilidad del método

Para confirmar la validación del método analítico utilizado, se procedió a evaluar la aplicabilidad del método para cuantificar la concentración de bisfenol A en muestras de aguas (**Figura 19**).



Figura 19. Muestras de agua en sus distintos recipientes

Las muestras que se analizaron se pueden ver en la **Tabla 9**. Estas son de distinta procedencia, almacenadas en diferentes embases y conservadas al sol y al frío durante un mes.

Muestras	Procedencia	Envase	Conservación
M1	Agua pozo	Botella de plástico	Sol (durante un mes)
M2	Agua grifo	Botella de plástico	Sol (durante un mes)
M3	Agua grifo	Botella de plástico	4°C (durante un mes)
M4	Agua grifo	Bote de vidrio	Sol (durante un mes)
M5	Agua embotellada	Botella de plástico	Sol (durante un mes)

Tabla 9. Muestras analizadas en el laboratorio

Las muestras de agua siguieron el procedimiento establecido y registramos los espectros de emisión fijando las condiciones instrumentales establecidas anteriormente. En la **Figura 20** se recogen todos los espectros de emisión para cada muestra.

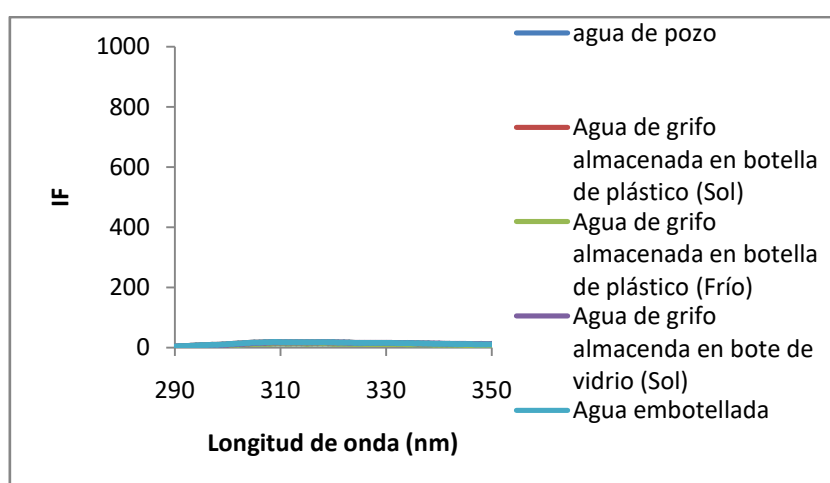


Figura 20. Espectros de emisión de BPA en las distintas muestras

En la **Tabla 10** vemos las intensidades obtenidas y sus concentraciones.

Muestras	IF	Concentración Obtenida (ppm)
M1	14.97	Por debajo del LC
M2	13.11	Por debajo del LC
M3	17.08	Por debajo del LC
M4	16.64	Por debajo del LC
M5	15.86	Por debajo del LC

Tabla 10. Intensidades y concentraciones de BPA obtenidas en las muestras acuosas

Los resultados obtenidos de intensidades son prácticamente despreciables y los valores de concentración por debajo del límite de cuantificación, por lo que no hay presencia de bisfenol A en las muestras de agua. Esto nos indica que no se produce transferencia de bisfenol A desde los distintos envases (plástico y vidrio) al agua, no siendo detectado por el método propuesto.

En la bibliografía encontrada acerca de la determinación de BPA en agua (Del Olmo M., 2000) se obtuvo un intervalo de trabajo entre $0.5-10 \mu\text{g l}^{-1}$, mientras que en el método propuesto en este trabajo de Fin de Grado se obtiene un intervalo de concentraciones mucho mayor ($30-510 \mu\text{g l}^{-1}$). Así mismo, el método encontrado en bibliografía obtuvo un valor de límite de cuantificación de 70 ng l^{-1} , por contra el límite de cuantificación obtenido en nuestro método es de $25\,000 \text{ ng l}^{-1}$, siendo este valor superior al nivel real de tolerancia de la Unión Europea para contaminantes en agua (100 ng l^{-1}). Por lo que nuestro método no detecta niveles reales de concentración de BPA. Para solucionar este problema habría que trabajar en niveles de concentración muchos más bajos.

3. CONCLUSIONES

Se ha propuesto un método espectrofluorimétrico para la determinación de bisfenol A basado en una microextracción líquido-líquido, en la que se han obtenido varias conclusiones:

- El bisfenol A presenta fluorescencia en diferentes disolventes orgánicos, observándose una disminución de su rendimiento cuando se encuentra en disolución acuosa.
- La cantidad de disolvente es importante para conseguir la máxima extracción sin tener que disminuir tanto la concentración y que nos facilite su extracción.
- Se requiere un efecto salino para favorecer el paso del analito a la fase orgánica.
- Se comprobó la linealidad del método en el intervalo de concentraciones que se estudiaron por su elevado valor del coeficiente de correlación alcanzado que es muy cercano a 1.
- La exactitud del método analítico cumple con los parámetros y/o criterios de aceptación, concluyendo que los resultados obtenidos mediante el procedimiento establecido posee una proximidad al valor verdadero.
- Los resultados en la precisión mostraron que los coeficientes de variación son aprobados, el valor aceptable debe ser menor o igual que 5%, los coeficientes de variación resultaron ser menores que el 5%, lo cual demuestra la buena repetibilidad del método cuantificado.

Los resultados permitieron concluir que el método analítico para cuantificación de bisfenol A no permite detectar valores reales de BPA en agua ya que obtenemos un valor de límite de cuantificación superior al límite definido por la Unión Europea para contaminantes en agua.

4. BIBLIOGRAFÍA

1. Ackeman, L.K.; Noonan, G.O.; Heiserman, W. M.; Roach, J. A.; William, L.; Begley, T.H. *Determination of Bisphenol A in U.S. infant Formulas: Updated Method and Concentrations*. J. Agric. Food Chem. **2010**, 58(4), 2307-2313.
2. Alabi, A.; Caballero-Casero, N.; Rubio, S. *Quick and Simple Sample Treatment for Multiresidue Analysis of Bisphenol Diglycidyl Ethers and their Derivatives in Canned Food prior to Liquid Chromatography and Fluorescence Detection*. J. Chromatogr. A. **2014**, 1336, 23-33.
3. Ballesteros-Gómez, A.M. *Diseño de disolventes y adsorbentes supramoleculares para la extracción de contaminantes en alimentos y muestras ambientales*. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba, **2012**.
4. Batista, A.; Rocha, F. *A green Flow-injection procedure for fluorimetric determination of bisphenol A in tap waters based on the inclusion complex with β -cyclodextrin*. Intern. J. Environ. Anal. Chem. **2013**, 93, 1402-1412.
5. Beverly S. R. *Bisphenol A: An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects*. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **2011**, 127, 27-34.
6. Cañez, M.G.; Monserrat, A. *Validación de un método analítico para la determinación de fósforo por espectrofotometría ultravioleta-visible*. Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad de Sonora **2015**, 18 (1), 32-39.
7. Cela, R.; Lorenzo, R.A.; Casis, M.C. *Técnicas de separación en Química Analítica*. Ed. Síntesis, Universidad de Santiago de Compostela, **2003**.
8. Chen, W.L.; Wang, G. S.; Gwo, J. C.; Chen, C. Y. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography/tandem Mass Spectrometry Determination of Feminizing Chemicals in River Water, Sediment and Tissue Pretreated Using Disk-Type Solid-Phase Extraction and MATRIX Solid-Phase Dispersion*. Talanta **2012**, 89, 237-245.
9. Corrales, J.; Kristofco, L. A.; Baylor Steele, W.; Yates, B.S.; Breed, C.S.; Spencer Williams, E.; Brooks, B.W. *Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of its Occurrence and Bioaccumulation*. Dose-Response **2015**, 13 (3), 1-29.

10. Cortada-Cortés, C. *Nuevas metodologías y aplicaciones de las técnicas de microextracción líquido-líquido para la determinación de contaminantes orgánicos*. Tesis Doctoral, Universidad de Alicante, **2012**.
11. Del Olmo, M.; Zafra, A.; Jurado, A. B.; Vílchez J. L. *Determination of bisphenol A (BPA) in the presence of phenol by first-derivative fluorescence following micro liquid-liquid extraction (MLLE)*. *Talanta* **2000**, 50, 1141-1148.
12. Dorantes-Cuellar, A.; Martínez-Sibaja, C.; Guzmán Blanno A. *Endocrinología clínica*. Ed. El Manuel Moderno S.A. de C.V., **2016**.
13. EFSA, European Food Safety Authority. Scientific Opinion on the Risks to Public Health Related to the Presence of bisphenol A (BPA) in Foodstuffs: Part I-Exposure Assessment. *EFSA Journal* **2015**, 8 (8), 2035-2043.
14. Fattore, M.; Russo, G.; Barbato, F.; Grumetto, L.; Albrizio, S. *Monitoring of Bisphenols in Canned Tuna From Italian Markets*. *Food Chem. Toxicol.* **2015**, 83, 68-75.
15. Fischnaller, M.; Bakry, R.; Bonn, G. K. *Simple Method for the Enrichment of Bisphenols Using Boron Nitride*. *Food Chem* **2016**, 194, 149-155.
16. Garay, D.C. *Química Analítica*. Ed Mc Graw Hill, **2009**.
17. García, J.A.; Font, G. *Toxicidad del bisfenol A*. *Rev. Toxicol* **2015**, 32, 144-160.
18. Hernández, D.; Méndez, J.; Díaz, A. *Efectos genotóxicos de las resinas en odontología*. *Avances en odontología* **2014**, 30 (1).
19. Lang, I.A.; Galloway, T.S.; Scarlett, A.; Henley, W.E.; Depledge, M.; Wallace R.B.; Melzar, D. *Association of Urinary Bisphenol A Concentration with Medical Disorders and Laboratory Abnormalities in Adults*. *JAMA* **2008**, 300 (11), 1303-1310.
20. McKetta, J.J. *Encyclopedia of Chemical Processing and Design: Volume 4*. Ed. Taylor y Francis Inc, **1977**.
21. Michalowicz, J. *Bisphenol A – Sources, Toxicity and Biotransformation*. *Environ. Toxicol. Pharmacol* **2014**, 37 (2), 738-758.
22. Molina-García, L.; Fernández-de Córdova, M.L.; Ruiz-Medina; A. *Analysis of Bisphenol A in Milk by Using a Multicommutated Fluorimetric Sensor*. *Talanta* **2012**, 96, 195-201.

23. Ochoa P. *Estudio comparativo de métodos de tratamiento de muestras para la determinación de bisfenol A en alimentos/bebidas*. Trabajo de Fin de Grado. Universidad de Jaén, **2016**.
24. Otaka, H.; Yasuhara, A.; Morita, M. *Determination of Bisphenol A and 4-Nonyphenol in Human Milk Using Alkaline Digestion and Cleanup by Solid-Phase Extraction*. Anal. Sci. **2003**, 19 (12), 1663-1666.
25. Pellegrino, R. B.; Ibañez, G. A.; Escandar, G. M. *Chemometrics –assisted cyclodextrin-enhanced excitation-emission fluorescence spectroscopy for the simultaneous green determination of bisphenol A and nonyphenol in plastics*. Talanta **2015**, 143, 162-168.
26. Peña-Álvarez, A.; Castillo-Alanís, A. *Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-EM)*. TIP **2015**, 18 (1), 29-42.
27. Pottenger, L.H.; Domoradzki, J.Y.; Markham, D.A.; Hansen S.C.; Cagen, S.Z.; Waechter J.M. *The relative bioavailability and metabolism of bisfenol A in rats is dependent upon the route of administration*. Toxicol Sci. **2000**, 54 (1), 3-18.
28. Quino, I.; Ramos, O.; Guisbert, E. *Determinación del límite de detección instrumental (LDI) y límite de cuantificación instrumental (LCI) en elementos traza de agua subterránea*. Revista Boliviana de química **2007**, 24 (1).
29. Rodríguez, S. C. I.; Pellerano, R.G.; Romero, C.H.; Acevedo, H.A.; Vázquez, F.A. *Validación de un método para la determinación de boro en muestras foliares de Citrus reticulata*. Revista TUMBAGA **2012**, 7, 55-71.
30. Robinson, K.A.; Robinson J.F. *Análisis Instrumental*. Ed. Pearson educación S.A., **2000**.
31. Skoog, D.A.; Leary, J.J. *Análisis instrumental*. Ed McGraw-Hill, **1994**.
32. Thompson, M.; Ellison S. L.; Wood, R. *Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)*. Pure Appl. Chem. **2002**, 74 (5), 835-855.
33. Velandia-Castellanos, J.C. *Validación del método analítico para la cuantificación de bacitracina en el laboratorio de control de calidad de una industria farmacéutica veterinaria*. Trabajo de Grado, Universidad de Bogotá, **2008**.

34. Wang, S.; Oakes, K. D.; Bragg, L. M.; Pawliszyn, J.; Dixon, G.; Servos, M. R. *Validation and Use of in Vivo Solid Phase Micro-Extraction (SPME) for the Detection of Emerging Contaminants in Fish*. Chemosphere **2011**, 85 (9), 1472-1480.
35. Yan, W.; Li, Y.; Zhao, L.; Lin, J. M. *Determination of Estrogens and Bisphenol A in Bovine Milk by Automated on-line C30 Solid Phase Extraction Coupled with High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. J. Chromatogr. A. **2009**, 1216 (44), 7539-7545.
36. Zafra, A. *Caracterización y determinación de bisfenol A y compuestos relacionados en muestras ambientales y fluidos biológicos por espectrofluorimetría y cromatografía de gases-espectrometría de masas*. Tesis Doctoral, Universidad de Granada, **2001**.
37. Zimmers, S.M.; Browne, E.P.; O'Keefe, P.w.; Anderton, D.L.; Kramer, L.; Reckhow, D.A.; Arcaro, K.F. *Determination of Free Bisphenol A (BPA) Concentrations in Breast Milk of U.S. Women Using a Sensitive LC / MS / MS. Method*. Chemosphere **2014**, 104, 237-243.