



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Estudio comparativo de métodos de tratamiento de muestra para la determinación de bisfenol A en alimentos/bebidas

Alumna: Patricia Ochoa Ortega

Junio, 2016



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

GRADO EN QUÍMICA
Trabajo Fin de Grado

Estudio comparativo de métodos de tratamiento de muestra para la determinación de bisfenol A en alimentos/bebidas

Trabajo Fin de Grado presentado por
Patricia Ochoa Ortega
Jaén, Junio de 2016

Fdo. Patricia Ochoa Ortega

ÍNDICE

1. RESUMEN / ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1. Analito: Bisfenol A	2
2.2. Propiedades físicas y químicas.....	3
2.3. Legislación en alimentos	4
2.4. Niveles de concentración en alimentos.....	4
2.5. Toxicidad.....	6
2.6. Recomendaciones para limitar la exposición	7
2.7. Técnicas de extracción y clean-up en alimentos y bebidas	8
2.7.1. Extracción líquido-líquido (LLE).....	9
2.7.2. Microextracción líquido-líquido (LLME).....	11
2.7.3. Extracción con sistemas supramoleculares (SUPRASs)	12
2.7.4. Extracción sólido-líquido (SLE).....	13
2.7.5. Extracción en fase sólida (SPE)	15
2.7.6. Dispersión de matriz en fase sólida (MSPD).....	19
2.7.7. Microextracción en fase sólida (SPME)	20
2.7.8. Método QuEChERS	20

3. OBJETIVOS.....	22
4. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE TRATAMIENTO MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE BISFENOL A EN ALIMENTOS/BEBIDAS	22
4.1. Determinación de bisfenol A en miel	23
4.2. Determinación de bisfenol A en lácteos	28
4.3. Determinación de bisfenol A en pescado.....	34
5. CONCLUSIONES	41
6. BIBLIOGRAFÍA	42

1. RESUMEN / ABSTRACT

El bisfenol A (BPA) es una sustancia con multitud de usos, entre ellos se encuentra su aplicación en la producción de envases destinados a estar en contacto con productos alimenticios. En este trabajo Fin de Grado se expone y justifica la importancia de la determinación del contenido en BPA en alimentos y bebidas a fin de mantener un control sobre la exposición humana por vía oral a este disruptor endocrino (EDC). El tratamiento de muestra es una etapa crucial del proceso analítico que resulta ser problemática en muchos casos, por esta razón se realiza un estudio exhaustivo en el que se revisan y comparan los diferentes métodos de tratamiento de muestra empleados para la determinación de este contaminante en miel, productos lácteos y pescado. Con el fin de lograr una buena selectividad y sensibilidad, estos métodos son generalmente laboriosos y largos. También se revisan las diferentes técnicas de extracción utilizadas en la actualidad para este tipo de análisis, sus fundamentos, ventajas e inconvenientes. De entre ellas la técnica estrella empleada es la extracción en fase sólida (SPE). Otras como la extracción líquido-líquido (LLE), la microextracción en fase sólida (SPME) o la microextracción líquido-líquido (LLME) han sido también utilizadas, pero en menor grado.

Bisphenol A (BPA) is a substance with a multitude of uses, among them is its application in the production of packaging intended to come into contact with foodstuffs. In this paper discussed and justifies the importance of determining the content of BPA in food and beverages in order to keep a check on human oral exposure to this endocrine disruptor (EDC). The sample treatment is a crucial step in the analytical process which turns out to be problematic in many cases, for this reason a comprehensive study that we review and compare the different treatment methods sample used for analysis in honey, dairy products and fish is done. These methods generally consist in several laborious steps requiring long time in order to achieve the required selectivity and sensitivity. The different extraction techniques currently used for this type of analysis, fundamentals, advantages and disadvantages are also reviewed. Among them star technique used is the solid phase extraction (SPE). Others such as liquid-liquid extraction (LLE), solid phase microextraction (SPME) or liquid-liquid microextraction (LLME) have been used less frequently.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Analito: Bisfenol A

El bisfenol A (2,2-bis(4-hidroxifenil)propano) (BPA) no es un compuesto que se encuentre de forma natural en el medio ambiente, su estructura se muestra en la **Figura 1**. Alexander P. Dianin, químico ruso de San Petersburgo, fue el primero en sintetizarlo en 1891 (*Franck H.-G., 1988*). Su principal uso es como monómero en la producción de plásticos de policarbonato (PC) y resinas epoxi. También es utilizado en la fabricación de resinas de poliéster, polisulfona y poliacrilato; retardadores de llama y como antioxidante en los plásticos de PVC (*Kochana J., 2015*). Las resinas epoxi se usan como revestimiento de la superficie interior de latas que contienen alimentos y bebidas, su finalidad es proteger los alimentos del contacto directo con los metales. Por otro lado, los PC se utilizan en los envases para alimentos, tales como botellas de agua. Por lo tanto, este analito inevitablemente puede migrar de estos envases y latas hasta los alimentos y bebidas que contienen en su interior (*Molina-García L., 2012*). La composición del alimento contenido en el recipiente puede acelerar la migración de BPA. Se ha observado que esta migración es mayor al aumentar el contenido en glucosa del alimento y de cloruro de sodio. La acidez, la temperatura de almacenamiento y el tiempo que el alimento lleva en dicho recipiente son otros parámetros que afectan a dicha migración (*Fischnaller M., 2016*).

El BPA también es usado para fabricar pinturas epoxi, dispositivos médicos, papel térmico etc. (*EFSA Journal, 2015*).

La producción de este compuesto ha crecido constantemente durante los últimos 58 años. Debido a su alta producción y uso en la fabricación de plásticos existe una exposición humana y contaminación generalizada en el medioambiente (*Corrales J., 2015*).

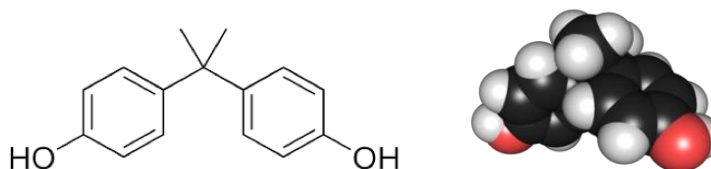


Figura 1. Estructura del Bisfenol A

2.2. Propiedades físicas y químicas

El BPA es un compuesto orgánico que pertenece al grupo de los fenoles, sintetizado por la condensación de dos moles de fenol con un mol de acetona (de ahí lo de la “A” de bisfenol A) en presencia de un catalizador ácido (**Figura 2**).

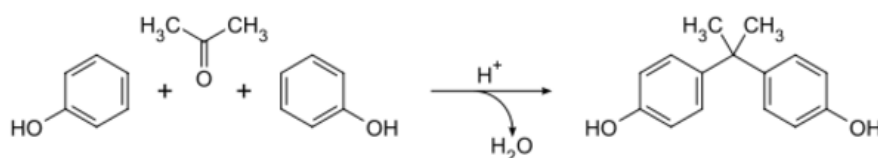


Figura 2. Reacción de síntesis del bisfenol A

Es un sólido blanco disponible en forma de cristales o escamas con un olor fenólico suave en condiciones ambientales, que presenta buena solubilidad en grasas y mala en agua, por tanto, es un compuesto moderadamente hidrófobo con una ligera polaridad debido a los dos grupos hidroxilo. La presencia de estos grupos determina su buena reactividad (*Michałowicz J., 2014*). El valor de pKa del BPA es de entre 9,59 y 11,30; así estará presente principalmente en su forma no ionizada en medios líquidos con un pH inferior a 7. Este analito presenta fluorescencia nativa en disolventes orgánicos, con una longitud de onda de excitación entre 274 y 282 nm y una longitud de onda de emisión entre 297 y 309 nm para distintos disolventes orgánicos. Esta última propiedad es empleada en su determinación analítica (*Molina-García L., 2012*). En la **Tabla 1** se muestran más propiedades sobre este fenol.

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas del BPA (*Corrales, J. 2015*)

Perfil fisicoquímico del BPA	
Número 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 a 20°C-25°C
Constante de disociación, pK _a	10.29 ± 0.69
Solubilidad	120-300 mg/L a 25°C en agua
Punto de ebullición	360.5°C a 760 mm Hg
Punto de fusión	153°C
Temperatura y presión crítica	Temperatura: 849K; Presión: 2.93x10 ⁺⁶ Pa
Calor de combustión	-7.465 J/kmol
Presión de vapor	4.0 x 10 ⁻⁸ mm Hg a 25°C

2.3. Legislación en alimentos

En enero de 2015, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) presentó su última reevaluación sobre la exposición al BPA. El análisis de los estudios presentados a EFSA para la evaluación del riesgo dio como resultado la modificación de la ingesta diaria tolerable (IDT) de BPA en los alimentos, pasando de 50 a 4 $\mu\text{g/kg pc}$. EFSA concluyó en esta evaluación que el BPA no presenta ningún riesgo para la salud de los consumidores de cualquier grupo de edad en los niveles de exposición actual (*EFSA Journal*, 2015).

A día de hoy en la Unión Europea (UE) según el Reglamento 10/2011 este compuesto está permitido en los materiales en contacto con alimentos con un límite de migración específico (cantidad máxima permitida de una sustancia dada liberada desde un material u objeto en alimentos o simulantes alimentarios) de 0,6 mg/kg de alimento (*UE*, 2011 b). En enero de 2011 la Comisión Europea adoptó la Directiva 2011/8/UE, que prohíbe su uso para la fabricación de biberones de PC para lactantes (*UE*, 2011 a). Algunos países de la UE han decidido tomar medidas un poco más estrictas, de esta forma en Francia hay actualmente en vigor una ley que suspende la fabricación, importación, exportación y comercialización de todos los materiales en contacto con los alimentos que contienen BPA (*EFSA Journal*, 2015).

En abril de 2016, EFSA realizó una revisión tras la publicación de un informe del Instituto Nacional Holandés para la Salud Pública y Medio Ambiente que plantea preocupaciones sobre los efectos del BPA en el sistema inmunológico de los fetos y niños pequeños. Actualmente, se ha informado que EFSA realizará una nueva reevaluación en 2017-2018 (*EFSA*, 2016).

2.4. Niveles de concentración en alimentos

En la **Tabla 2** se muestra la concentración media de BPA ($\mu\text{g/kg}$) en varios alimentos tanto enlatados como no enlatados comprados en los países de la UE. Un análisis de estos datos muestra que la concentración de este compuesto es mayor en alimentos enlatados que en no enlatados, lo cual está de acuerdo con lo mencionado anteriormente. Se observa que la concentración de este en productos con el mismo tipo de embalaje puede variar según el tipo de alimento, ya que el BPA presenta una mejor solubilidad en productos tales como pescados y mariscos, y una

menor en comida para lactantes y niños pequeños. Los alimentos enlatados que presentan una mayor cantidad de este fenol son aperitivos, frutos secos, semillas oleaginosas, pescado y marisco, mientras que de los no enlatados son carnes, pescados y mariscos.

Tabla 2. Concentración media de BPA en algunos alimentos enlatados y no enlatados ($\mu\text{g/kg}$) (EFSA Journal, 2015). (a): n, número de muestras. (b): %< LOD / LOQ, porcentaje de muestras por debajo del límite de detección/límite de cuantificación

Alimento	n ^(a)	Concentración media de BPA ($\mu\text{g/kg}$)	%< LOD / LOQ ^(b)
Enlatados / Envasados			
Verduras y hortalizas	123	22.9	27
Legumbres, frutos secos y semillas oleaginosas	20	32.6	30
Productos de frutas y frutas	21	13.1	14
Carne y productos cárnicos	47	27.7	45
Pescado y otros mariscos	174	34.7	27
Leche y productos lácteos	22	4.4	55
Zumos de fruta y verdura	5	2.7	0
Alimentos para lactantes y niños pequeños	10	0.3	70
Aperitivos, postres y otros	1	52.0	0
No enlatados/ No envasados			
Verduras y hortalizas	205	1.2	33
Legumbres, frutos secos y semillas oleaginosas	5	0.1	60
Productos de frutas y frutas	88	0.2	71
Carne y productos cárnicos	192	9.4	5
Pescado y otros mariscos	76	7.4	11
Leche y productos lácteos	152	0.2	52
Zumos de fruta y verdura	16	0.4	75
Alimentos para lactantes y niños pequeños	1	0.0	100
Aperitivos, postres y otros	31	0.1	68

2.5. Toxicidad

Este compuesto se incluye dentro del grupo de los disruptores endocrinos (EDCs). Los EDCs se definen como sustancias químicas naturales o sintéticas capaces de alterar el equilibrio hormonal, las cuales actúan a dosis muy bajas (*Dorantes-Cuéllar A., 2012*).

La exposición a este EDC es principalmente por la vía oral a través de la dieta (*Kang J. H., 2006; Vandenberg L. N., 2007; Von-Goetz N., 2010*). Tras la ingesta de alimentos y bebidas este compuesto es absorbido rápidamente metabolizándose principalmente a la forma hidrosoluble BPA-glucurónido (BPAG) en las paredes del intestino y en el hígado por la enzima uridina difosfato glucosiltransferasa (UGT). La vía de eliminación difiere en los seres vivos, en los humanos aproximadamente un 80% es excretado a través de la orina con un tiempo de eliminación inferior a 6 h. Aunque los datos de exposición al BPA indican que los lactantes entre 3 y 6 meses están por debajo de los niveles de seguridad establecidos, este grupo de población no es capaz de eliminar esta sustancia de su organismo. La respuesta tóxica a este compuesto en el organismo depende de la edad del individuo, siendo el feto y los recién nacidos el grupo de población más vulnerables (*González G. L., 2011*).

Se han desarrollado numerosas investigaciones en animales de experimentación, principalmente en roedores y primates, sujetos a determinadas dosis de exposición de BPA, identificándose diversos efectos tóxicos. Estas investigaciones son una guía para los seres humanos capaz de establecer una relación entre las concentraciones de este EDC en orina o sangre y una gran variedad de factores relacionados con el estado de salud de la población (*González G. L., 2011*). Entre los efectos tóxicos debidos a una exposición a BPA en los seres vivos se incluyen que:

- Contribuye al desarrollo de la obesidad (*Michałowicz J., 2014*).
- Puede causar trastornos reproductivos, de desarrollo y metabólicos (*Fischnaller M., 2016*).
- Se relaciona con las enfermedades de corazón y el desarrollo de la diabetes. La exposición a este compuesto es capaz de aumentar la resistencia a la insulina, diversos estudios han demostrado que la resistencia a la insulina conlleva a diabetes tipo 2, así como hipertensión y otras enfermedades cardiovasculares (*Lang I.A., 2008*).

- Produce cambios en el comportamiento tales como la hiperactividad, aumento de la agresividad, problemas de aprendizaje, aumento de la susceptibilidad a la adicción de drogas, entre otros (*González G. L., 2011*).
- En las células eucariotas, se ha observado que puede dañar al ADN (*Fischnaller M., 2016*).
- Es capaz tanto de estimular e inhibir la actividad de las células del sistema inmune (*Michałowicz J., 2014*).
- Promueve la generación de ROS y reduce la expresión génica antioxidante causando hepatotoxicidad (*Michałowicz J., 2014*).
- Puede inhibir la actividad de los estrógenos aumentando el crecimiento y regulando las conexiones entre las neuronas. Ello puede conducir a cambios en el cerebro, causando daño cerebral (*González G. L., 2011*).
- Induce principalmente el cáncer de mama y próstata (*Michałowicz J., 2014*).

2.6. Recomendaciones para limitar la exposición

La Agencia de Alimentos y Medicamentos de EEUU (FDA) ha elaborado una serie de recomendaciones para limitar la exposición de los consumidores a esta sustancia (*FDA, 2012*). Estas recomendaciones son:

- Emplear envases de plástico de uso alimenticio que estén libres de BPA. El código de reciclaje nos ayuda a saber que plásticos contienen esta sustancia (**Figura 3**). Hay siete tipos de plásticos, de ellos el número 3 y 7 son los que contienen este analito.
- Consumir preferentemente conservas envasadas en recipientes de vidrio.
- Usar otras alternativas a los envases de plástico como pueden ser el vidrio, la cerámica o el acero inoxidable.
- Evitar el consumo de alimentos calentados en envases de plástico y reutilizar lo menos posible dichos envases.

Guía de reciclaje de plásticos		
	PET – Tereftalato de polietileno Botellas de bebidas, agua, salsas y condimentos, envases de aceite, cosméticos y medicamentos.	
	PEAD – Polietileno de alta densidad Bolsas de compras, tuberías para agua, baldes, botellas de lácteos, botellas de shampoo, suavizantes y detergentes.	
	PVC – Policloruro de vinilo Tarjetas bancarias, lonas y carteles publicitarios, calzado deportivo, suelas de todo tipo de calzado, envoltura para golosinas, cables, hules y artículos para oficina.	
	PEBD – Polietileno de baja densidad Bolsas para alimentos congelados, bolsas de compras, sacos industriales, cubetas para hielo, bolsas para suero y tapas flexibles.	
	PP – Polipropileno Vajilla reusable para microondas, elementos de cocina, contenedores para yogurt, mamilas, tapas en general, vasos no desechables y hieleras.	
	PS – Poliestireno Cajas para huevos, tazas, platos, bandejas y cubiertos desechables, envases de helado, ganchos para ropa, peines, cepillos y bolígrafos.	
	OTROS – Discos compactos, gabinetes de aparatos electrónicos, lentes de sol y recetados, lámparas para automóviles, teléfonos y juguetes.	
 www.tuola.mx		

Figura 3. Codificación y usos de los diferentes plásticos (*Tu Ola. Online disponible en: <http://blog.tuola.mx/2015/01/11/7-tipos-de-plasticos-reciclables/> 2016*)

Algunos fabricantes de plásticos han ido sustituyendo esta sustancia por compuestos alternativos. Uno de los más extendidos es el bisfenol S (BPS), presente en numerosos envases que lucen la etiqueta “BPA Free”. Un nuevo estudio, publicado en la prestigiosa revista *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*, asegura que tampoco podemos fiarnos de esta alternativa (*Kinch C.D., 2015*). Además de estos también hay bisfenoles B, C, E, F, G, M, P, PH, TMC y Z, entre otros.

2.7. Técnicas de extracción y clean-up en alimentos y bebidas

La determinación de BPA en matrices de alimentos y bebidas a menudo requiere una extensa preparación de la muestra antes del análisis instrumental. Los pasos típicos dentro de la preparación de muestras de alimentos incluyen pretratamiento, extracción, limpieza, concentración y, a veces la derivatización.

La extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE) son las técnicas más ampliamente utilizadas para el aislamiento de BPA en muestras

sólidas y líquidas respectivamente, principalmente debido a su simplicidad y amplia gama de aplicabilidad (Inoue K., 2003; Zimmers S.M., 2014). Otras técnicas como por ejemplo las miniaturizadas han sido menos utilizadas (Farajzadeh M.A., 2015). La LLE a pesar de ser una técnica fiable para la extracción de BPA en alimentos líquidos, se ha utilizado en menor extensión que SPE.

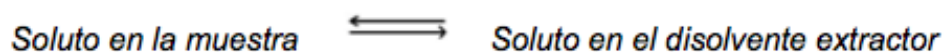
Los extractos obtenidos en ocasiones se han de someter a una etapa de purificación para eliminar de esta forma los interferentes, esta etapa de limpieza se realiza a menudo con una SPE (Otaka H., 2003; Zimmers S.M., 2014).

A continuación, se describe el fundamento de las diferentes técnicas de extracción habitualmente utilizadas para la determinación de BPA en alimentos y bebidas.

2.7.1. Extracción líquido-líquido (LLE)

Esta técnica ha sido y en algunos casos sigue siendo la más utilizada para la extracción, preconcentración y limpieza de analitos presentes en muestras líquidas de naturaleza acuosa (Cámara C., 2012).

Su fundamento se basa en la transferencia de un analito desde la muestra a otro disolvente líquido inmiscible con el primero, gracias a la diferente solubilidad que presenta el analito en cada una de las fases (Cela R., 2003). En la mayoría de los casos, una de las fases es un medio acuoso y otra un disolvente orgánico. De forma que los analitos más hidrofílicos quedarán preferentemente en la fase acuosa y los más hidrofóbicos pasarán al disolvente orgánico. La LLE permite realizar extracciones rápidas y generalmente es aplicable tanto a la separación de trazas como de macrocomponentes. Considérese un embudo de extracción y un soluto “S” distribuido entre dos fases inmiscibles en las que se establece un equilibrio:



La constante de distribución se define como la relación de la concentración del analito en el disolvente extractor y la concentración de este en la muestra. Esta constante tiene un valor característico para cada soluto y sistema de disolventes.

Factores que influyen en el equilibrio de distribución:

- Efecto del pH: las características de solubilidad de las sustancias dependen de si están ionizadas o en su forma molecular. La especie neutra es soluble en disolventes orgánicos no polares, mientras que la forma iónica lo es en

disolventes polares. Estas dos formas pueden interconvertirse si se modifica el pH del medio.

- Selección de disolventes: en principio debe elegirse un disolvente con el que se obtenga un valor de la constante de distribución elevado para los analitos de interés. Otras cualidades que tiene que poseer son: tener una polaridad adecuada para la extracción, presentar una solubilidad en agua inferior al 10% y ser compatible con las técnicas analíticas que se utilicen posteriormente.
- Efecto salino: al adicionar una concentración elevada de una sal inerte neutra a la fase acuosa, disminuye la solubilidad de los analitos no electrolitos y también la del disolvente orgánico.
- Formación de diversas asociaciones: las especies cargadas tienden a ser más solubles en disolventes polares que en los disolventes orgánicos, por ello para facilitar la extracción en ocasiones se forman pares iónicos añadiendo un contraión.

La LLE se realiza en embudos de decantación. La muestra de la que se desea separar el analito/s se introduce en dicho embudo, se añade a continuación el disolvente orgánico y se agita durante un tiempo, para establecer el equilibrio entre las fases y favorecer la transferencia de materia. Periódicamente, es necesario ventear el exceso de presión generada en el interior del embudo. A continuación, se mantiene en reposo hasta que se separen las fases completamente, y por último se recogen las fases separadamente (**Figura 4**).

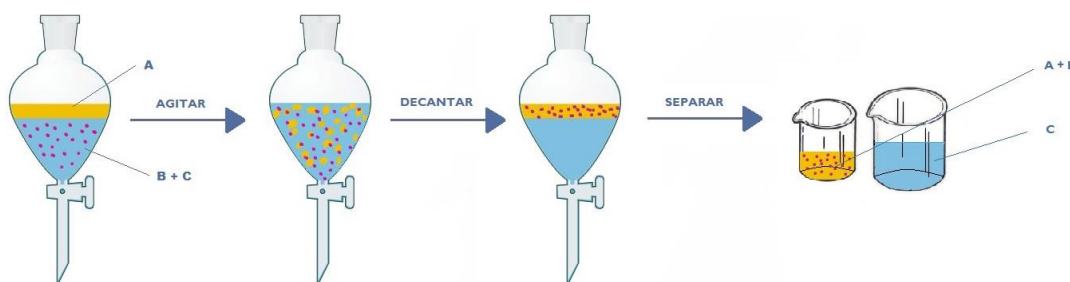


Figura 4. Esquema del proceso de extracción líquido-líquido

La LLE una técnica muy útil para la extracción de compuestos orgánicos de diferente naturaleza por la posibilidad de modificación de los parámetros anteriormente citados. Sin embargo, existen una serie de inconvenientes asociados a ella, entre los que se encuentran largos tiempos de extracción y uso de grandes cantidades de disolvente. En muchos casos, estos disolventes son caros y presentan una alta toxicidad. Otras desventajas son la formación de emulsiones durante el proceso, las cuales provocan la pérdida del analito; pérdidas de compuestos debido al proceso de evaporación y la difícil automatización (*Cortada-Cortés C., 2012*).

2.7.2. Microextracción líquido-líquido (LLME)

Para solventar algunos de los inconvenientes de la LLE y aprovechar sus ventajas se desarrolló la LLME. Desde su introducción, esta técnica ha tenido un rápido desarrollo debido a que es barata, fácil de realizar, no necesita de equipos especiales para llevarla a cabo, se puede considerar prácticamente libre de disolventes, necesita poca cantidad de muestra, hay una mejora en el enriquecimiento de los analitos, es relativamente fácil de automatizar y existe un amplio campo de aplicación (*Cortada-Cortés C., 2012*). Otras ventajas son que no necesita una concentración del disolvente al final del proceso de extracción con lo que no se introducen impurezas o pérdidas de los compuestos de interés y tiempos de extracción cortos.

Hay un gran número de variantes de esta técnica. A continuación se tratan algunas de ellas.

Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Esta técnica consiste en mezclar un disolvente extractante con un agente dispersante. El dispersante se caracteriza por tener una alta miscibilidad tanto con el disolvente extractante como con la fase acuosa en la que se encuentran los analitos. Una vez obtenida la mezcla extractor-dispersante se inyecta con una jeringa en la muestra acuosa que contiene al analito. En este momento se forma una nube en la que el disolvente extractante se encuentra en forma de una gran cantidad de gotitas pequeñas dispersas en la fase acuosa. Después se centrifuga la muestra y el disolvente extractante se recoge para someterlo al análisis. La principal desventaja es que si se usan grandes volúmenes de dispersante se puede producir una

competencia en la extracción de los analitos entre este y el disolvente extractante (Víctor-Ortega M.D., 2011).

Microextracción en fase líquida en fibra hueca (HF-LPME)

Esta modalidad de microextracción consiste en impregnar los poros de una fibra hueca con un disolvente orgánico. HF-LPME puede realizarse en la modalidad de dos o tres fases (**Figura 5**). En HF-LPME de dos fases los analitos se extraen desde la muestra acuosa a un disolvente orgánico inmiscible con el agua que está inmovilizado en los poros de la fibra hueca mientras que el interior de la fibra se llena con otra porción del mismo disolvente orgánico (disolución aceptora). La extracción se basa en la difusión pasiva y forzada por las constantes de distribución de los analitos.

Con la misma configuración se puede trabajar en la modalidad de HF-LPME de tres fases. Los analitos extraídos desde la muestra acuosa pasan a través de una fina capa de disolvente orgánico inmiscible con el agua que se encuentra inmovilizado en los poros de la fibra hueca. Dentro del hueco de la fibra se introduce una segunda fase acuosa aceptora. Los analitos se extraen también por difusión pasiva basada en los coeficientes de distribución de los analitos (Cortada-Cortés C., 2012; Víctor-Ortega M.D., 2011).

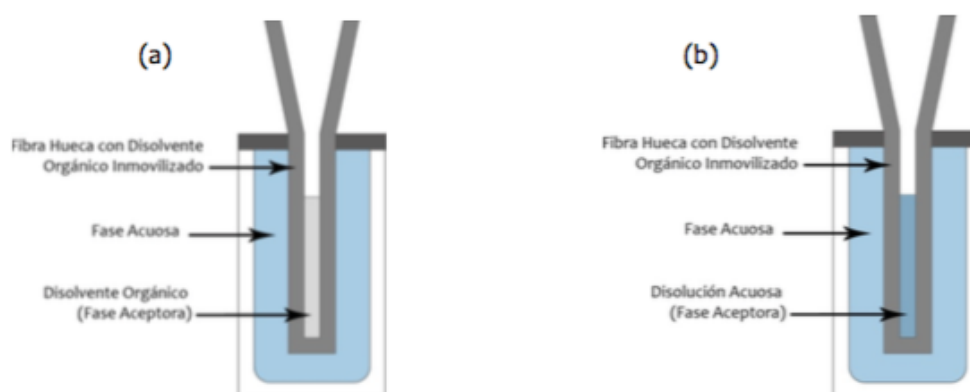


Figura 5. Diagrama esquemático de HF-LPME: (a) de dos fases y (b) de tres fases (Cortada-Cortés C., 2012)

2.7.3. Extracción con sistemas supramoleculares (SUPRASs)

Los SUPRASs se define como un líquido micro o nano-estructurado que se genera a partir de una disolución de moléculas anfifílicas mediante un proceso secuencial de

autoensamblaje. Estos disolventes contienen una elevada concentración de tensioactivo que forman nanoestructuras constituidas por microambientes de distinta polaridad, propiedades que le confieren una alta capacidad de solubilización para una amplia variedad de compuestos.

El formato hoy en día más usado en este tipo de extracción es la formación del SUPRAS y adición posterior a la muestra sólida. El conjunto se agita para favorecer el traspaso del analito al disolvente extractor y finalmente se centrifuga para recoger el SUPRAS (Ballesteros-Gómez A. M., 2012). Entre sus ventajas se encuentran la simplicidad y el uso de pocos volúmenes de disolvente.

2.7.4. Extracción sólido-líquido (SLE)

Se basa en la puesta en contacto de una cantidad determinada de muestra con un disolvente adecuado. Posteriormente, la mezcla es sometida a distintos procesos más o menos agresivos en función de la fortaleza de las interacciones analito-matriz. Aunque el realizar un proceso exhaustivo aseguraría la extracción completa del analito, simultáneamente se extraería una mayor cantidad de especies interferentes que podrían dificultar la determinación final del analito. Por tanto, el procedimiento de extracción debe ser optimizado tratando de emplear unas condiciones de compromiso de forma que se obtenga la mayor cantidad posible en la extracción de los analitos y la mínima de otros compuestos no deseados de la matriz.

Dentro de esta existen varias modalidades, en este documento se desarrollan solamente las aplicadas en el análisis de bisfenol A en los alimentos estudiados.

Extracción con agitación

Es un procedimiento de extracción que tiene lugar exclusivamente sometiendo a la muestra a la acción del disolvente a través de un proceso de agitación. Por tanto, este proceso es solo aplicable a analitos unidos débilmente a la matriz. Una vez extraído el analito, se tiene que separar el disolvente y la matriz. En general el volumen de disolvente utilizado es elevado y por tanto suele ser necesaria la evaporación del mismo antes de la determinación final con el fin de preconcentrar los analitos.

En algunos casos, aunque las interacciones analito-matriz no sean especialmente intensas, las recuperaciones obtenidas mediante procesos de agitación son bajas

debido a que la agitación realizada no es eficaz. En estos casos, el empleo de radiación de ultrasonidos aparece como una clara alternativa. Esta radiación provoca la vibración de las moléculas aumentando la eficacia de los choques entre ellas. Además, de esta forma el disolvente difunde fácilmente en la muestra favoreciendo el contacto entre ellas. Gracias a esta mejora en el proceso de agitación, las cantidades de muestra y disolvente empleados, así como el tiempo de extracción son reducidos considerablemente.

Sea de una forma u otra, los procesos de extracción por agitación, aunque de sencillo manejo, resultan ser laboriosos por la inevitable necesidad de filtración del extracto y la evaporación del disolvente, aumentando por tanto los riesgos de contaminación y/o pérdidas de analito así como la continua exposición del operador a vapores de disolventes tóxicos (*Cámara C., 2012*).

Extracción con microondas (MAE)

El modo operativo de este tipo de extracción consiste simplemente en colocar la muestra en un recipiente junto con el disolvente y someterlo a la radiación microondas. Una vez finalizada la extracción, el extracto se filtra quedando preparando para posteriores tratamientos. La energía microondas es absorbida por moléculas con momento dipolar permanente produciendo su rotación, siendo esta rotación la responsable del calentamiento de la muestra. Los sistemas de extracción con microondas utilizan la radiación electromagnética para calentar el disolvente extractor. Por tanto, la elección del disolvente va a ser clave para conseguir una extracción eficaz. Como ventajas presenta la rapidez (15 min), el bajo consumo de disolventes (15-40 mL), la automatización (extracción secuencial de hasta 24 h) y el fácil manejo. Entre los inconvenientes se tiene que resaltar que el extracto obtenido tiene que ser filtrado, que es necesario la adición de un disolvente polar y también que se requiere de una etapa de limpieza posterior. En cuanto al coste es moderado (*Cámara C., 2012*).

Extracción con líquidos presurizados (PLE).

También es conocida como extracción acelerada por disolventes (ASE). En esta el proceso de extracción se lleva a cabo a presiones elevadas para así poder trabajar

con disolventes en fase líquida a temperaturas por encima de su punto de ebullición. Las temperaturas a las que se trabaja son temperaturas ligeramente inferiores al punto crítico en las que las propiedades del disolvente se modifican, de modo que su viscosidad disminuye, penetrando con facilidad en los poros de la matriz, favoreciendo la difusión de los analitos (*Canosa-Rodríguez M.A., 2009*). El uso simultáneo de presiones y temperaturas elevadas conducen a procesos de extracción más rápidos que los procedimientos clásicos, utilizando volúmenes inferiores de disolventes (*Fernández-Álvarez M., 2009*). También destacar como ventajas el poder procesar en una hora hasta doce muestras simultáneamente, no se necesitan agentes desecantes y hay un control absoluto sobre los parámetros de extracción. Por otro lado, los inconvenientes que presenta son el elevado coste y la dependencia que presenta con el tipo de matriz.

Los equipos PLE constan de una bomba para impulsar el disolvente, un horno donde se introducen las celdas de acero presurizadas, para mantenerlas a la temperatura seleccionada, un vial colector en donde se recoge el extracto líquido, y nitrógeno para purgar la celda una vez terminado el proceso de extracción (**Figura 6**).

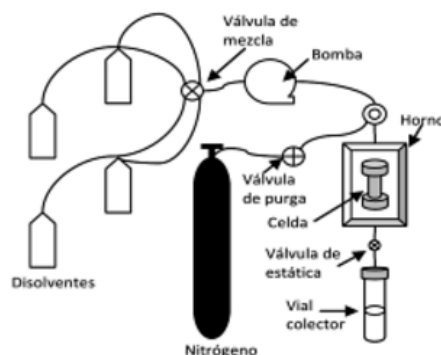


Figura 6. Equipo de extracción con disolventes presurizados (*Canosa-Rodríguez P., 2009*)

2.7.5. Extracción en fase sólida (SPE)

Se basa en la diferente afinidad que presenta el analito (o la matriz) por una fase sólida o por la propia muestra líquida (o el extracto obtenido). Esta técnica es ideal para la extracción de analitos presentes en muestras líquidas, purificación de los extractos obtenidos mediante las distintas técnicas de extracción y concentración.

La forma más habitual de trabajo se muestra esquemáticamente en la **Figura 7**, donde la fase sólida está colocada en un cartucho. En primer lugar, el sorbente es

acondicionado con un disolvente de propiedades similares a la muestra. Posteriormente, un determinado volumen de muestra se pasa a través de él quedando así retenidos los analitos. Finalmente, después de una etapa de lavado para eliminar los interferentes, los analitos son eluidos con un disolvente adecuado.

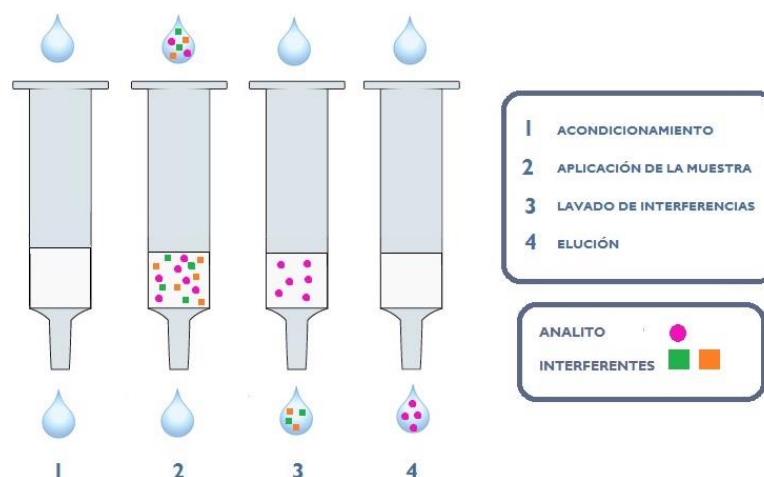


Figura 7. Etapas de la extracción en fase sólida

Lógicamente, la elección del sorbente a utilizar dependerá del analito, de su nivel de concentración y del disolvente en el que se encuentre (Cámara C., 2012). Los distintos tipos de sorbentes empleados son:

1. Sorbentes apolares: Este tipo de sorbentes es adecuado para compuestos presentes en muestras líquidas polares. Los sorbentes más utilizados son las alquil-sílicas. Cuando la muestra pasa a través de este tipo de sorbentes, los analitos interaccionan con la fase ligada (fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas) quedando retenidos en ella, posteriormente los analitos son eluidos con un disolvente adecuado. El sorbente más utilizado de este tipo son las octadecil-sílicas (C_{18}) debido a su capacidad para retener tanto a analitos apolares como moderadamente polares.

2. Sorbentes polares: El sorbente más utilizado de este tipo ha sido el gel de sílice, los sitios activos de adsorción (polares) son los grupos silanol ($Si-O-H$) superficiales. El mecanismo de separación se basa en interacciones polares entre la fase adsorbente y los grupos funcionales del analito. La retención de analitos por

interacciones polares se favorece en disolventes no polares y la elución de los analitos del adsorbente polar está favorecida por disolventes polares.

3. Intercambiadores iónicos: La interacción tienen lugar entre una molécula del analito con carga y los grupos cambiadores del adsorbente con carga opuesta a la del analito.

4. Sorbentes de exclusión molecular: Este tipo de sorbentes permite la separación de compuestos orgánicos en función de su tamaño molecular. Las partículas del sorbente tienen pequeños poros en los que solo pueden penetrar las moléculas pequeñas. De esta forma, cuando se pasa la muestra a través del sorbente, las moléculas grandes pasan directamente, mientras que las pequeñas entran y salen de los poros, lo que hace ralentizar su avance permitiendo la separación. Se han desarrollado un tipo de sorbentes conocidos con el nombre de materiales de acceso restringido (RAM). El término RAM, acuñado por Desilets en 1991 (*Desilets C.P., 1991*), designa a toda una familia de materiales de estructura porosa, pero en este caso la superficie interna del poro posee una fase ligada (iónica, polar...), mientras que la superficie externa de la partícula es hidrofílica. Aunque existen RAM con diferentes estructuras, el mecanismo de funcionamiento es idéntico para todos ellos (**Figura 8**): Cuando la muestra pasa a través del material, las moléculas grandes no solo no entran en los poros, sino que además al ser altamente hidrofóbicas pasan fácilmente al no quedar tampoco retenidas en la superficie hidrofílica de las partículas. Por otro lado, los compuestos de menor tamaño entran dentro de los poros y solo aquellos que tengan afinidad por la fase ligada interna quedarán retenidos (*García-Gómez D., 2013*).

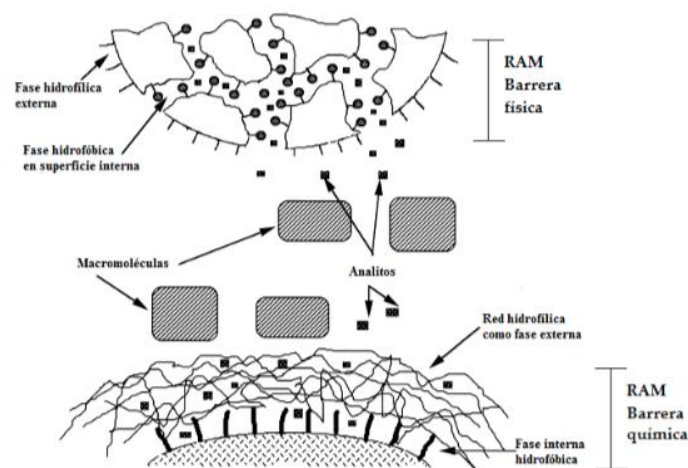


Figura 8. Representación esquemática del mecanismo de actuación de los RAM. (García-Gómez D., 2013).

5. Polímeros molecularmente impresos (MIPs): el uso de estos polímeros como sorbentes en la SPE da lugar a una nueva técnica conocida como extracción en fase sólida molecularmente impresa (MISPE). Estos polímeros macroporosos poseen puntos de unión selectivos capaces de reconocer a una determinada molécula, su principal característica es su alta selectividad. La principal desventaja del uso de MIPs es su elevado coste, ya que para cada analito o grupo de analitos se requiere de un MIP específico. La técnica empleada para la obtención de estos polímeros se llama impresión molecular, el principio de esta radica en la formación de interacciones definidas entre un determinado compuesto plantilla y monómeros funcionales durante el proceso de polimerización en presencia de un agente entrecruzante en un disolvente adecuado (Cacho-Vicente C., 2009). Una vez obtenido el polímero, es posible extraer el compuesto plantilla quedando así huecos libres capaces de reconocer al analito que es el mismo o similar al compuesto plantilla. Estos sorbentes son estables a altas temperaturas y a medios tanto ácidos como básicos. También soportan bien los medios orgánicos.

6. Inmunoabsorbentes: Este tipo de fase sólida también actúa reteniendo selectivamente a un analito o a una familia de compuestos con importantes similitudes estructurales. Estos están constituidos por un soporte sólido sobre el cual está inmovilizado un anticuerpo, los cuales son capaces de reconocer e interactuar con su correspondiente antígeno. La forma de trabajo con inmunosorbentes no difiere de la metodología general empleada en cualquier procedimiento de SPE. Hoy en día son muy pocos los inmunosorbentes disponibles

comercialmente, lo que hace difícil su incorporación en un laboratorio de rutina. En cualquier caso, su futuro parece prometedor ya que se ha demostrado el alto grado de limpieza de las muestras. Estos tipos de inmunosorbentes son inestables en condiciones agresivas como altas temperaturas, medios ácidos o básicos fuertes y entornos orgánicos (Cámara C., 2012).

2.7.6. Dispersión de matriz en fase sólida (MSPD)

La MSPD es aplicada a sólidos, semisólidos o muestras viscosas. Lógicamente la naturaleza del soporte sólido influye directamente en la eficiencia de las extracciones.

Esta técnica consiste en mezclar homogéneamente la muestra en un mortero de vidrio en presencia de un soporte sólido, luego la mezcla se empaca en una columna que contiene en el fondo lana de vidrio o un filtro de celulosa para contener la mezcla y finalmente, los analitos se eluyen de la columna con un solvente apropiado, mientras que los compuestos interferentes son retenidos selectivamente en la fase sólida. Otra opción, es eluir previamente los interferentes en una etapa de lavado y a continuación eluir los analitos retenidos en la fase sólida con un solvente diferente (**Figura 9**) (Cámara C., 2012).

La MSPD conlleva una serie de ventajas como son simplicidad, no da lugar a formación de emulsiones, poco consumo de disolvente si se compara con otras técnicas, buena eficacia de extracción puesto que toda la muestra se expone al extractante y bajo coste (Fernández-Álvarez M., 2009).

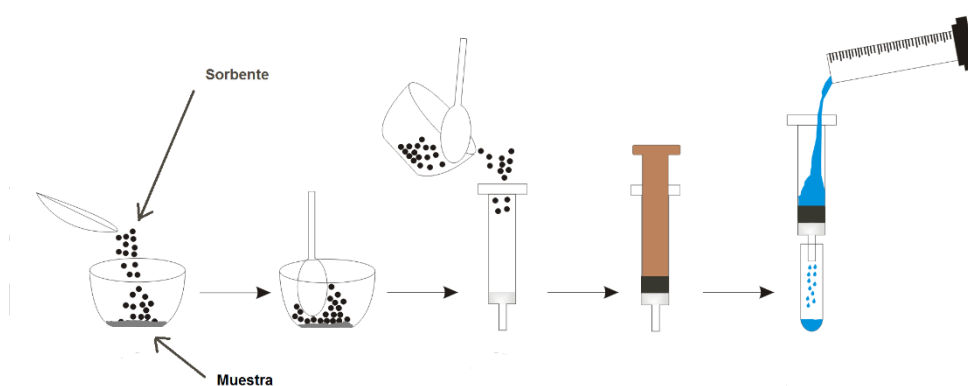


Figura 9. Etapas típicas de una extracción por dispersión de matriz en fase sólida (MSPD)

2.7.7. Microextracción en fase sólida (SPME)

La SPE con cartuchos es una técnica enormemente útil para la extracción de una gran variedad de compuestos orgánicos, pero no está exenta de ciertos inconvenientes. Así, aunque en menor medida que en la extracción líquido-líquido es necesario el empleo de disolventes orgánicos tóxicos, las interacciones entre los analitos y la matriz provocan, en algunos casos, la obtención de bajas recuperaciones, no es aplicable a muestras sólidas y además pequeñas partículas sólidas presentes en las muestras líquidas quedan retenidas en los sorbentes empleados, bloqueando los puntos activos y por tanto disminuyendo su capacidad. Con el objetivo de eliminar algunos de estos inconvenientes se ha desarrollado la SPME.

Una unidad SPME es muy simple y consiste básicamente en una fibra larga de sílice fundida recubierta con un sorbente. La fibra está unida a un pistón de acero inoxidable cubierto por una aguja protectora, adaptada de un cuerpo de jeringuilla, pero en este caso el émbolo no va a aspirar la muestra, sino que sólo se va a encargar de hacer salir la fibra al exterior o de introducirla en el interior del dispositivo.

El proceso de extracción consta de dos etapas fundamentales: extracción de los analitos desde la muestra a la fibra y desorción de los mismos de dicha fibra. Como es lógico el poder de extracción va a depender del sorbente seleccionado.

En el mercado existe una gran cantidad de sorbentes para SPME lo cual es una gran ventaja, además estos se pueden utilizar varias veces. Los tiempos de extracción en esta técnica son excesivamente cortos comparados con los que se necesitan en otras, es sencilla, de bajo coste, no es necesario el uso de disolventes y se puede acoplar con sistemas de detección. Como inconvenientes comentar la fragilidad de las fibras (Cámara C., 2012).

2.7.8. Método QuEChERS

Este método fue desarrollado por Anastasiades y col. en 2003 para la determinación de residuos de plaguicidas en material vegetal (Anastasiades M., 2003). QuEChERS es el acrónimo inglés de Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe (rápido, fácil, económico, eficaz, robusto y seguro). Es un método de preparación de muestras

sencilla y directa, y aunque fue desarrollado inicialmente para el análisis de plaguicidas en alimentos vegetales, en la actualidad, se ha aplicado a otras matrices y analitos (*Fuentes-López A., 2015*). Este método combina una primera etapa de extracción simple y una segunda etapa de dispersión en fase sólida (dSPE) donde se realiza una limpieza o clean-up (**Figura 10 y 11**).

En la primera etapa, se realiza una extracción con un disolvente orgánico, generalmente acetonitrilo, en presencia de diferentes sales. Las sales que pueden ser empleadas en esta etapa son el sulfato de magnesio (retiene agua y facilita de esta forma la extracción), el cloruro sódico (favorece la separación de las fases y disminuye la solubilidad del analito en la fase acuosa), el acetato de sodio (regula el pH) y sales de citrato (ajustan el pH a valores de 5,5, valor en el que se extraen la mayoría de los componentes ácidos y básicos de la muestra).

La segunda etapa de este procedimiento consiste en un clean-up del extracto mediante una dSPE. Las sales y sorbentes empleados en esta fase son sulfato de magnesio (elimina el agua residual), amina primaria/secundaria (PSA) (retira ácidos grasos, ácidos orgánicos, azúcares y pigmentos de antocianina), sorbente C₁₈ (limpian al extracto de grasas, esteroides y otras sustancias no polares) y el carbón grafitado (elimina pigmentos).

La selección de las sales y de la fase sólida dispersiva va a depender del tipo de alimento que es analizado.

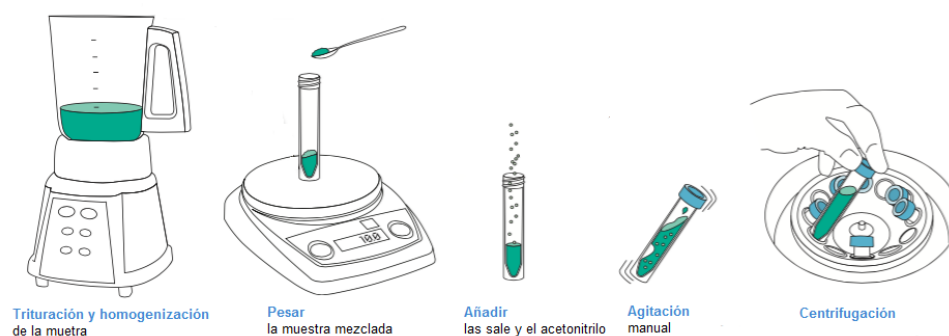


Figura 10. Primera etapa del método QuEChERS (*Phenomenex. Online: www.phenomenex.com 2012*)

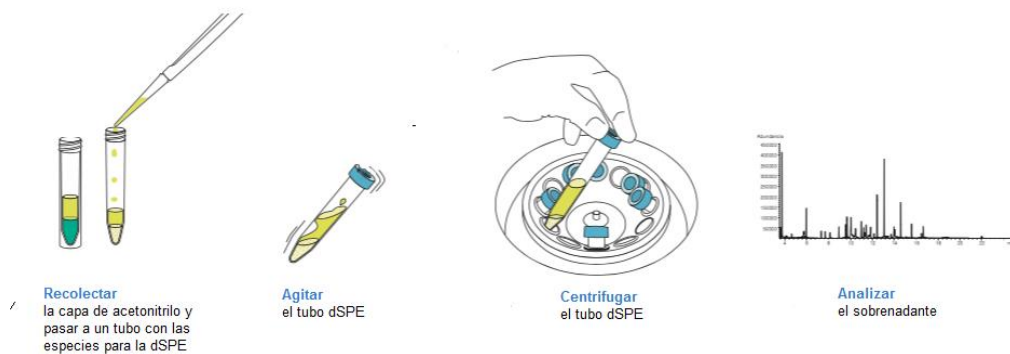


Figura 11. Segunda etapa del método QuEChERS (*Phenomenex. Online: www.phenomenex.com 2012*)

3. OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo principal la realización de un estudio comparativo de diferentes métodos de preparación de muestra para la determinación de BPA en miel, derivados lácteos y pescado. Este compuesto ha tomado una gran importancia en los últimos años debido al riesgo que supone para la salud. Se analizarán los distintos procedimientos de tratamiento de muestra para cada uno de los alimentos seleccionados y se realizará una comparación, mostrando las ventajas y los posibles inconvenientes. Para ello se evaluarán factores tales como el tiempo de tratamiento de muestra, porcentaje de recuperación, volumen de disolvente empleado etc.

4. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE TRATAMIENTO DE MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE BISFENOL A EN ALIMENTOS/BEBIDAS

El tratamiento de muestra se define como la etapa que implica someter la muestra a procesos físicos y químicos con o sin reacciones químicas para prepararla para el análisis. En ocasiones las muestras necesitan de un pretratamiento, que se realiza entre la toma y el tratamiento de la muestra. Las operaciones realizadas en el pretratamiento son de carácter físico.

La etapa de preparación de muestra tiene gran importancia porque:

- Compatibiliza la matriz de la muestra con el sistema de medida
- Purifica la muestra, mejora la identificación de los analitos y aporta selectividad.

- Concentra, mejorando de esta forma la cuantificación. También influye en la exactitud, reproducibilidad y límites de cuantificación.
- Extiende la vida de las columnas cromatográficas.

En la **Figura 11** se muestra el tiempo empleado para cada etapa del proceso analítico, como se puede observar la preparación de muestra es la más larga. Además, esta etapa tiene una alta participación humana siendo una fuente importante de errores.

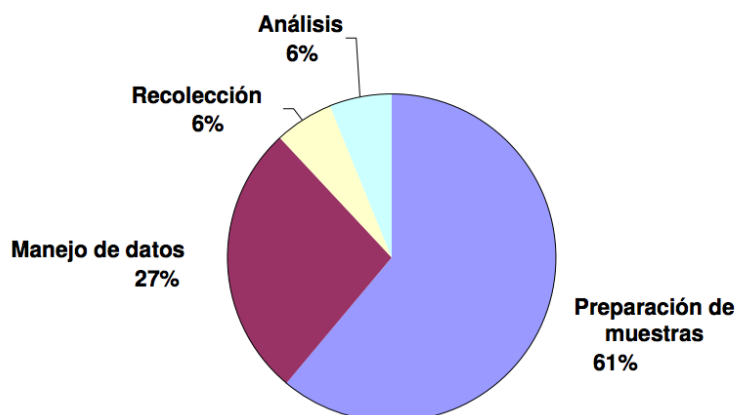


Figura 11. Distribución de tiempo en el proceso analítico (Gutiérrez P. Online: <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/countries/spain/guias-analitica/Presentaciones/1%20Preparaci%C3%B3n%20de%20muestras%20en%20el%20an%C3%A1lisis%20de%20alimentos.pdf> 2016)

En el análisis de este compuesto es muy importante evitar la contaminación de fondo, ya que muchos materiales pueden liberar BPA e incluso el agua pueden contener trazas.

El BPA se ha determinado en una amplia variedad de alimentos y bebidas, tales como pescado (Santhi V.A., 2012), huevos (Shao B., 2007), carne (Gao M., 2014), frutas (Cunha S.C., 2013), fórmulas infantiles (Kuo H. W., 2004), etc. A continuación, se muestra una revisión y comparación de los distintos métodos de preparación de muestra para tres tipos de alimentos. Los alimentos seleccionados son miel, productos lácteos y pescado. Cada uno de ellos se trata por separado.

4.1. Determinación de bisfenol A en miel

La miel es un alimento natural sano consumido en todo el mundo y según la normativa de la UE debe estar libre de productos químicos (Herrero-Hernández E., 2009). La seguridad de la miel es fundamental, ya que afecta a la salud humana, y

por ello hay un creciente interés en su seguimiento para determinar la presencia de pesticidas y otros compuestos químicos, como puede ser el BPA. Este producto es desde el punto de vista químico una mezcla compleja de azúcares.

La miel puede estar contaminada de BPA porque en ocasiones es trasladada en grandes bidones metálicos recubiertos internamente con resina epoxi antes de ser envasada (*Inoue K., 2003*). Otra fuente de la presencia de este analito es la de los propios envases plásticos en los cuales se comercializa, si dichos envases presentan BPA.

En todos los métodos revisados se realiza un pretratamiento que consiste en diluir la miel con agua ultrapura para hacerla más fluida, y en algún caso también se adiciona ácido clorhídrico (*Inoue K., 2003*).

La SPE es de las técnicas más utilizadas en la preparación de muestra, aplicándose también en el análisis de este fenol en miel. En 2003 se desarrolló un método basado únicamente en una etapa de SPE con poliestireno divinilbenceno. Tras pasar la muestra por el cartucho el analito y parte de los interferentes quedan retenidos en el sorbente siendo necesaria una etapa de limpieza, para eliminar compuestos polares. Estos autores emplean una mezcla metanol:agua y para la elución del analito metanol (*Inoue K., 2003*).

También se ha propuesto un método en el que se hace uso de la técnica MISPE (*Herrero-Hernández E., 2009*). El MIP empleado en este método se obtiene mediante polimerización por precipitación utilizando BPA como plantilla. Este como cualquier otro sorbente tiene que acondicionarse antes de su uso. Al cargar la muestra en el soporte sólido el analito queda unido al MIPs mediante enlaces intermoleculares débiles. Este soporte es selectivo, pero con frecuencia quedan también en él sustancias no deseadas como pueden ser azúcares e interferentes retenidos por interacciones no específicas. En el método propuesto por estos investigadores estas sustancias se eliminan con agua ultrapura y diclorometano, respectivamente. Por último, el analito tiene que ser arrastrado de la columna para proceder a la etapa de medida. Para ello se emplea una mezcla de acetonitrilo-ácido acético.

Debido a las características que poseen los RAM para eliminar macromoléculas como pueden ser azúcares, Rodríguez E. y col. emplean uno de ellos en su método

(Rodríguez-Gonzalo E., 2010). Su procedimiento se basa en una SPE en la que se usa como sorbente un RAM, etapa que se realiza en un sistema de inyección en flujo. Para asegurar una mayor limpieza proponen una dilución con agua ultrapura de la fracción eluida para cargarla en un cartucho Oasis HBL. La adición del agua tiene como objetivo prevenir la elución del BPA en la etapa de carga de esta segunda SPE.

Otros autores han decidido usar técnicas más modernas como las miniaturizadas, debido a las ventajas que estas presentan como el consumo de pequeños volúmenes de disolventes. La técnica miniaturizada encontrada en bibliografía para esta finalidad es la DLLME (Farajzadeh M.A., 2015). El tratamiento de muestra consiste en una extracción del analito con acetonitrilo seguida de una DLLME para enriquecer el analito diana. Como dato decir que en la DLLME se utiliza 1,1,1-tricloroetano como disolvente de extracción y acetonitrilo como dispersor.

En la **Tabla 3** se muestra un resumen de los métodos desarrollados para determinar BPA en miel, mostrándose las etapas de preparación de muestra y las técnicas de separación / detección usadas en cada caso, junto con otros datos de interés. A continuación, se realiza una comparación de los tratamientos de muestras expuestos.

El procedimiento de preparación de muestra presentado por Inoue K. y colaboradores es bastante simple, barato y cómodo. En un único paso se realiza la extracción, limpieza y preconcentración. Esto conlleva una disminución en el tiempo de tratamiento de muestra y por consiguiente un menor tiempo en el análisis. La desventaja principal es la baja selectividad, ya que muchas sustancias de la miel presentan similar hidrofobidad/hidrofilidad que el BPA.

El procedimiento que utiliza RAMs es más selectivo que el anterior, además tiene la ventaja de estar altamente automatizado y no necesitar tanta mano de obra. También es sencillo y relativamente rápido, aunque menos que el anterior ya que en este se realizan dos SPE.

El método propuesto por Herrero-Hernández E. y col. presenta una mayor selectividad que los anteriores debido al uso de los MIPs. Otra ventaja es que estos sorbentes selectivos toleran bastante bien medios orgánicos como es el de la miel. Los principales inconvenientes son: el alto coste de los MIPs (otra alternativa es

sintetizarlos, pero el proceso es complejo) y la contaminación de fondo, ya que si se emplea como plantilla el mismo analito, como es en este caso, en el MIP pueden quedar restos de plantilla lo cual puede producir un error por exceso.

El procedimiento que emplea la DLLME requiere de poco tiempo de extracción puesto que el área de la superficie entre el disolvente de extracción y la muestra es muy grande, por lo que el estado de equilibrio se alcanza rápidamente, lo que se traduce en un menor tiempo en el tratamiento de la muestra. Este método utiliza poca cantidad de disolventes, lo que supone un menor coste y contaminación. También es simple y fácil.

Por último, comentar que en general los porcentajes de recuperación son buenos en todos los métodos propuestos, no siendo inferiores en ningún caso al 90%.

Tabla 3. Métodos de tratamiento de muestra para la determinación de BPA en miel. Nota: en las etapas de preparación de muestra se incluye el pretratamiento. Abreviaturas: CZE, electroforesis capilar en zona; DAD, detector diodo array; ESI, ionización por electroespray; FID, detector de ionización en llama; FL, fluorescencia; GC, cromatografía de gases; LC, cromatografía líquida; MS, espectrometría de masas; RSD, desviación estándar relativa; UV, ultravioleta.

Cantidad de miel	Etapas de preparación de muestra	Porcentaje de recuperación (R) y RSD (%)	Técnica de separación / detección	Referencia
10,0 g	-Dilución y adición de ácido -SPE (Polímero poliestireno divinilbenceno)	R(n=6): 99,9-103,6 RSD (n=6): 5,3-6,6	LC-FL	(Inoue K., 2003)
10,0 g	-Dilución -MISPE	R (n=3): 95,0 RSD (n=3): 4,5	LC-DAD UV	(Herrero-Hernández E., 2009)
2,5 g	-Dilución -SPE (RAM) -SPE (Oasis HBL) en condiciones ácidas	R (n=3): 96,0-103,0 RSD (n=3): 7,0-14,0	CZE-ESI-MS	(Rodríguez-Gonzalo E., 2010)
2,0 g	-Dilución -Extracción con acetonitrilo -DLLME (Disolvente de extracción: 1,1,1-Tricloroetano; Disolvente dispersor: Acetonitrilo)	R (n=3): 93,0 RSD (n=3): 2,0	GC-FID	(Farajzadeh M.A., 2015)

4.2. Determinación de bisfenol A en lácteos

El BPA también se ha analizado en productos lácteos tales como leche, fórmulas infantiles (concentradas y en polvo) y leche materna.

En particular, la contaminación de leche humana con BPA es de suma importancia ya que este es el primer alimento recibido por los recién nacidos en una etapa en la que los procesos de crecimiento son críticos (*Rodríguez-Gómez R., 2015*). Otros productos como son fórmulas infantiles, leche y leche en polvo también son consumidos por niños y recién nacidos. Este grupo es considerado como uno de los más vulnerables a este compuesto por razones ya expuestas en este documento.

Su presencia en estos alimentos puede deberse a su liberación de los envases en los que se comercializa o a una contaminación en el proceso de producción (*Cirillo T., 2015*). En el caso de la leche humana este ECD llega hasta ella por medio del torrente sanguíneo, ya que en nuestro organismo se encuentran restos de BPA. Hay estudios que confirman que madres jóvenes y con gran descendencia tienen una menor posibilidad de padecer cáncer de mama, ya que este compuesto también se expulsa del organismo a través de la leche materna; sin embargo, el gran problema es que este contaminante es traspasado de la madre al bebé amamantado.

Las matrices de estas muestras son muy complejas y contienen multitud de sustancias tales como lípidos, proteínas, carbohidratos, minerales y vitaminas, por lo que requieren en la mayoría de los casos una extensa preparación de muestra. El BPA se asocia fácilmente con proteínas en este tipo de matrices, de forma que puede verse afectada la eficacia de extracción (*Otaka H., 2003*).

En algunos artículos revisados se determinan la cantidad de BPA libre y total (libre + conjugado), lo que conlleva una etapa adicional en el tratamiento de muestra en la que interviene una enzima llamada *β -glucuronidasa* que convierte el BPA conjugado en libre (*Yi B., 2010*). Sin embargo, esta etapa no se suele realizar ya que la mayor parte de este analito se encuentra libre.

Generalmente solo necesitan pretratamiento las fórmulas infantiles en polvo y concentradas. Este consiste en la mayor parte de los casos en prepararlas como indica el envase, pero con agua ultrapura. Únicamente se ha encontrado un método en el que las fórmulas infantiles en polvo no tienen que ser pretratadas (*Ferrer E.,*

2011). La leche, ya sea materna o no, no necesita de un pretratamiento, pero sí que hay un caso en el que esta es liofilizada (Rodríguez-Gómez R., 2015) y otro en el que es diluida con agua ultrapura (Sun Y., 2004).

La SPE es muy utilizada en el tratamiento de muestra en este tipo de análisis. En la mayoría de los métodos va acompañada de otras operaciones destinadas a la eliminación de interferentes, como por ejemplo eliminación de proteínas por precipitación con acetonitrilo (Ackerman L. K., 2010) o de macromoléculas por ultracentrifugación (Kuo, H. W., 2004). Otros autores realizan una dilución de la leche con metanol/agua. En esta operación no se eliminan interferentes, sino que se prepara la muestra para obtener una mejor extracción. La adición de agua la hace más fluida y mejora su paso a través del cartucho, mientras que el metanol rompe las membranas de los glóbulos grasos con el fin de realizar una extracción más efectiva (Maragou N.C., 2006). Solo se ha encontrado un método en el que se haga un uso exclusivo de la SPE (Biles J.E., 1997). Los sorbentes empleados son poliestireno divinilbenceno (Biles J.E., 1997; Ackerman L. K., 2010) y C₁₈ (Kuo, H. W., 2004; Maragou N.C., 2006), que actúan reteniendo principalmente al analito.

La modalidad de dSPE también ha sido utilizada a este tipo análisis, siendo habitual realizar una eliminación previa de proteínas con acetonitrilo (Yan W., 2009; Malone E.M., 2010). Los sorbentes más utilizados son C₁₈ (Malone E.M., 2010) y PSA (Yan W., 2009). En el método propuesto por Malone E.M. el BPA no se retiene en C₁₈, pero si lo hacen interferentes de naturaleza apolar. De la misma forma actúa el PSA, pero en este caso los interferentes retenidos son sustancias de naturaleza polar como carbohidratos o aminoácidos. En ocasiones, también se realiza una purificación y preconcentración antes del análisis mediante SPE online con C₃₀ (Yan W., 2009).

Shao B. y col. proponen un tratamiento en el que se hace uso de MSPD. La muestra de leche líquida se dispersa en un sorbente, C₁₈, de forma que los analitos quedan retenidos en este y tienen que ser eluidos con metanol. Tras esta etapa se realiza una SPE con aminopropil (Shao B., 2007).

En bibliografía también se han encontrado técnicas de extracción más convencionales como la LLE o SLE. En el caso de los tratamientos que hacen uso de la LLE es necesario generalmente una etapa previa de eliminación de

interferentes antes y posterior clean-up mediante SPE (*Otaka H., 2003; Zimmers S.M., 2014; Cirillo T., 2015*). De esta forma Otaka H. y col. desarrollaron un tratamiento de muestra basado en una digestión alcalina que tiene como objetivo degradar proteínas y lípidos, seguido de una LLE con dietil éter y un clean-up con un cartucho de aminopropil. Zimmers S.M. y col. optaron por una precipitación de proteínas con acetonitrilo y una LLE empleando hexano en este caso los analitos se quedan en la fase de acetonitrilo y los lípidos en la de hexano. Para el clean-up emplearon un cartucho Oasis HLB. Por último, Cirillo T. y su equipo aplicaron el mismo tratamiento de muestra que Zimmers S. M y col. con la diferencia de que para el clean-up usaron cartuchos de C₁₈. Los sorbentes de la SPE actúan todos reteniendo principalmente al analito. De los tratamientos de muestra revisados que usan la LLE solo uno emplea exclusivamente esta técnica (*Sun Y., 2004*). Consiste en dos etapas de LLE, una primera con hexano para eliminar los interferentes, los cuales se transfieren al hexano, y una segunda con cloroformo para extraer el BPA. Anteriormente se ha mencionado que la SLE se ha propuesto para la preparación de muestra. Así Rodríguez-Gómez R. y col. propusieron un método en el que la muestra de leche se liofiliza y se extrae el BPA de ella con ayuda de ultrasonidos utilizando como disolvente acetonitrilo realizando posteriormente una purificación mediante dSPE con C₁₈ en el que se retienen los interferentes (*Rodríguez-Gómez R., 2015*).

Otras técnicas más modernas como son MISPE (*O'Mahony J., 2013*) y PLE (*Ferrer E., 2011*) también se han aplicado en este tipo de análisis. El MIP empleado por O'Mahony J. y col. retiene selectivamente al analito mediante enlaces no covalentes. A continuación, se muestra una tabla con todos los métodos de tratamiento de muestra vistos para este tipo de análisis (**Tabla 4**).

Tabla 4. Métodos de tratamiento de muestra para la determinación de BPA en productos lácteos. Nota: en esta tabla se incluye la etapa de pretratamiento dentro de las etapas de preparación de muestra, excepto en el método de Cirillo T. (este consiste en preparar la fórmula infantil como pone en el envase). Abreviaturas: ESI, ionización por electrospray; FD, detector de fluorescencia; FL, fluorescencia; GC, cromatografía de gases; HPLC, cromatografía líquida de alta resolución; LC, cromatografía líquida; MS, espectrometría de masas; RSD, desviación estándar relativa.

Cantidad de muestra	Etapas de preparación de muestra	Porcentaje de recuperación (R) y RSD (%)	Técnica de separación/detección	Referencia
5,0 g de fórmulas infantiles en polvo y líquidas concentradas	-Dilución con agua -Precipitación de proteínas con acetonitrilo -SPE (Poliestireno-divinilbenceno)	R (n= -): 47,0 RSD (n= -): 1,0	HPLC-MS/MS	(Ackerman L. K., 2010)
0,5 g de fórmula infantil en polvo	-Dilución de la muestra con una solución etanólica -Ultracentrifugación -SPE (C ₁₈)	R (n=5): 79,0 RSD (n=5): 9,0	GC-MS	(Kuo H. W., 2004)
1,0 g de leche	-Dilución con metanol/agua - SPE (C ₁₈)	R (n=6): 83,0-106,0 RSD (n=6): 2,1-12,5	LC-ESI-MS	(Maragou N. C., 2006)
15,0 mL de fórmula infantil concentrada	-Dilución con agua -SPE (Poliestireno-divinilbenceno)	R (n=3): 75,0-109,0 RSD (n= -): -	HPLC-FL	(Biles J.E., 1997)
- g de leche	-Precipitación de proteínas con acetonitrilo -dSPE (PSA) -On-line SPE (C ₃₀)	R (n=5): 92,4-97,1 RSD (n=5): 13,2-15,0	HPLC-MS	(Yan W., 2009)
1,0 mL de leche	-Precipitación de proteínas con acetonitrilo -dSPE (C ₁₈)	R (n=4): 102,1 RSD (n=4): 9,3	LC-MS/MS	(Malone E.M., 2010)
1,0 g de leche	-MSPD (C ₁₈) -SPE (Aminopropil)	R (n=5): 82,3-102,5 RSD (n=5): 1,4-6,5	LC-MS/MS	(Shao B., 2007)
25,0 g de leche humana	-Digestión alcalina -LLE con dietil éter -Dos SPE (Aminopropil)	R(n=3): 82,0-113,0 RSD(n=3): 3,0-11,0	GC-MS	(Otaka H., 2003)

Tabla 4 (Continuación)

Cantidad de muestra	Etapas de preparación de muestra	Porcentaje de recuperación (R) y RSD (%)	Técnica de separación/detección	Referencia
3,0 mL de leche materna	-Precipitación de proteínas con acetonitrilo -LLE (Acetonitrilo-hexano) -SPE (Oasis HLB)	R(n=-): 40,0-49,0 RSD(n=-): 8,0-9,0	LC-MS/MS	(Zimmers S.M., 2014)
5,0 mL de fórmula infantil preparada para consumir	-Precipitación de proteínas con acetonitrilo -LLE con hexano -SPE (C ₁₈)	R(n=-): 87,0 RSD(n=-): 3,0	LC-MS/MS	(Cirillo T., 2015)
200,0 µL de leche humana	-Dilución con agua ultrapura -LLE con hexano -Acidificación -LLE con cloroformo	R(n=-): 70,0 RSD(n=-): -	HPLC-FD	(Sun Y., 2004)
- mL de leche humana	-Liofilización -Extracción con acetonitrilo asistida de ultrasonidos -dSPE (C ₁₈)	R(n=-): 99,6-102,7 RSD(n=-): 1,3-5,8	HPLC-MS	(Rodríguez-Gómez R., 2015)
5,0 g de leche	-Desprotonización con acetonitrilo -MISPE	R(n=9): 75,9 RSD(n=9): 17,2	HPLC-FD	(O'Mahony J., 2013)
10,0 g de fórmulas infantiles en polvo	-PLE empleando como disolvente acetato de etilo	R(n=5): 89,0- 92,3 RSD(n=5): 12,0-14,36	LC-MS/MS	(Ferrer E., 2011)

Los métodos de tratamiento de muestra que se basan principalmente en una SPE son prácticamente todos sencillos y requieren de poco tiempo. De ellos los más sencillos son los propuestos por Biles J.E y Maragou N.C., ya que no realizan ninguna etapa previa a la SPE para eliminar interferentes. Esto puede ser visto como una ventaja por la simplicidad o una desventaja por una limpieza insuficiente de la muestra. Estos métodos requieren de materiales e instrumentos poco costosos y que son fáciles de encontrar en cualquier laboratorio de análisis. Los volúmenes de disolvente utilizados no son muy grandes, aunque lo ideal sería utilizar menos cantidad ya muchos de ellos son tóxicos y representan un riesgo para la salud del operario. Otra desventaja es la poca selectividad de los sorbentes empleados como fase sólida. El método propuesto por Kuo H. W. tiene como principal inconveniente largos tiempos en la ultracentrifugación. En cuanto a las recuperaciones decir que en general son buenas, estas no son inferiores al 75% salvo en el tratamiento de muestra propuesto por Ackerman L. K..

Los procedimientos propuestos por Malone E. M., Yan W. y Shao B. son algo más largos. De estos tres el más largo es el propuesto por Yan W. sin embargo, este tiene una parte automatizada, una SPE online. El empleo de esta SPE tiene ventajas tales como mayor eficiencia en la extracción y un menor consumo de disolvente. En los tres casos se muestran buenos porcentajes de recuperación (82,3-102,1%).

Los tratamientos que emplean la técnica de LLE son fáciles, pero requieren de más etapas y un aumento del tiempo de análisis. Un incremento del número de etapas se puede traducir en una mayor pérdida del analito. De entre ellos el método propuesto por Otaka H. es el más laborioso. Este procedimiento es largo y la digestión alcalina consume un gran tiempo, unos 30 min. Otro inconveniente que presenta es el consumo de grandes volúmenes de dietil éter. Las ventajas y desventajas de los tratamientos de muestra que usan LLE son similares a las mencionadas anteriormente para los métodos que se basan principalmente en la SPE: materiales y aparatos fáciles de conseguir y baratos, volúmenes no muy grandes de disolvente (exceptuando el procedimiento propuesto por Otaka H.), poca especificidad etc. En cuanto a los porcentajes de recuperación decir que excepto el del método presentado por Zimmers S.M todos son buenos.

El procedimiento propuesto por Rodríguez-Gómez R. y col. presenta como principal desventaja el uso de varias etapas de evaporación del disolvente durante el proceso en las que se puede llegar a producir pérdida de BPA. Por otro lado, este procedimiento emplea ultrasonidos en la extracción, lo cual supone una mayor eficacia en la extracción. Los volúmenes empleados son pequeños reduciendo de esta forma costes y residuos. Este método presenta un buen porcentaje de recuperación (99,6 %).

La principal ventaja del método desarrollado por O'Mahony J. y col. es el uso de un MIP que como anteriormente se ha dicho es selectivo al bisfenol A. Para la síntesis de este se utiliza como plantilla hidroquinona. El uso de la hidroquinona como plantilla en vez del propio BPA evita la posible contaminación de la muestra con el BPA usado para sintetizar el MIP. Los porcentajes de recuperación no son muy altos y el precio del MIP es elevado.

De todos los métodos tratados en este apartado el más automatizado es el propuesto por Ferrer E. y col. Pero éste requiere de equipos caros.

4.3. Determinación de bisfenol A en pescado

Hay muchos informes de investigación que confirman la presencia de este ECD en el medio ambiente (*Corrales J., 2015*) debido a la actividad antropogénica. La fuente principal de este compuesto en el medio acuático es a través de los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, ya que los tratamientos utilizados no son capaces de eliminarlo por completo (*Jakimska A., 2013*). Los organismos acuáticos son capaces de acumular residuos de este fenol, siendo la principal fuente de contaminación para los depredadores superiores y los consumidores humanos. A pesar de que el BPA es más degradable y menos biocomulable que otros EDCs (*Chen W. L., 2012*) su producción masiva y descarga continua hace que esté presente en aguas ambientales.

La determinación de este analito en el pescado puede ser problemática por el alto contenido en lípidos que presentan estas muestras (*Santhi V.A., 2012*). Por ello estas exigen un profundo tratamiento antes del análisis. En casi todos los artículos revisados la muestra de pescado necesita un pretratamiento que consiste en la mayoría de los casos en una trituración y homogenización, y en algunos casos

también liofilización.

El QuEChERS se ha utilizado en este tipo de análisis (*Jakimska A., 2013; Munaretto J. S., 2013*), la aplicación de este método puede causar la co-extracción de compuestos no deseados. Por ello es fundamental realizar pruebas de optimización para seleccionar los tipos y cantidades de sales de extracción y sorbentes que den los mejores resultados. Para la primera etapa de extracción con acetonitrilo se emplea acetato de sodio y sulfato de magnesio; y para la dSPE sulfato de magnesio, PSA y C₁₈. Estos dos últimos sorbentes se encargan de eliminar los lípidos extraídos en la primera etapa. El C₁₈ elimina principalmente colesterol y el PSA ácidos grasos entre otros.

Otro método que es similar al anterior consiste en una extracción del analito también con acetonitrilo en presencia de sulfato de sodio, la función de esta sal no es más que la de eliminar cualquier resto de agua. A diferencia del método anterior en este la eliminación de lípidos del extracto se realiza por reparto entre hexano y acetonitrilo, de forma que los lípidos de naturaleza hidrofóbica quedan solubilizados en el hexano y el analito en el acetonitrilo. Además de esta purificación se realiza un clean-up adicional con un cartucho de Florisil PR. En el cartucho se retiene el analito y posiblemente también interferentes de naturaleza apolar que son eliminados de él antes de la elución con hexano (*Tsuda T., 2000*). Como puede observarse la limpieza de la muestra es muy importante, exigiendo en ocasiones varias etapas.

De los dos métodos vistos hasta el momento ambos utilizan como disolvente extractor acetonitrilo, otros autores que también lo emplean son Santhi V.A y col. (*Santhi V.A., 2012*). Su tratamiento de muestra se basa en una extracción con este disolvente seguida de una eliminación de grasas por precipitación en frío y una limpieza por una SPE con C₁₈. El sorbente empleado en la SPE tiene gran afinidad por retener compuestos de naturaleza lipídica pero no tiene esta afinidad por el BPA en las condiciones en las que se usa, por lo que al pasar el extracto a través de él no se produce la retención del analito. El extracto obtenido de la SPE se mezcla con agua y NaCl para realizar una LLE con hexano:acetato (1:1, v/v). Para asegurar una buena purificación proponen una etapa adicional de SPE con aminopropil, que actúa reteniendo principalmente al analito.

Los procedimientos vistos anteriormente realizan una SLE tradicional. Otros autores

han optado por usar esta técnica asistida con microondas empleando como disolvente de extracción diclorometano:metanol (*Pedersen S.N., 1999*). Como es de esperar en esta extracción se liberan de la muestra muchos interferentes que han de ser eliminados, estos autores realizan para ello una SPE con aminopropil.

También se ha empleado MSPD seguido de una purificación que consiste en pasar el eluyente directamente por un cartucho de alúmina ácida (*Chen W. L., 2012*). Para la MSPD se utiliza C₈ como sorbente dispersante.

Hasta ahora no se ha mencionado ningún método en el que se analice BPA en peces vivos sin necesidad de sacrificar al animal. Wang S. y col. han propuesto uno en el que se hace uso de la técnica SPME (*Wang S., 2011*). Este consiste en crear un hueco en el músculo del pez para introducir unas fibras de polimetilsiloxano, tras un periodo de tiempo estas se recogen para desorber el analito con metanol.

Las técnicas de extracción miniaturizadas están de moda, ya el método descrito anteriormente hace uso de una de ellas. La HF-LLME de tres fases se ha propuesto para determinar varios contaminantes en pescado fresco (*Chen B., 2013*), el proceso es algo largo ya que consta de varias etapas: Contacto de la muestra con agua ultrapura en presencia de energía microondas, extracción asistida de ultrasonidos con metanol/agua y el agua de la anterior etapa, precipitación de los lípidos en frío y extracción con HF-LLME. La fase aceptora para esta HF-LLME está compuesta por una disolución de NaOH 0,15 M y β -ciclodextrina 0,015 M, mientras que para la impregnación se usa un disolvente mixto de tolueno y octanol. Gyong-Ahn Y. y colaboradores propusieron un método similar, la principal diferencia está en la sustitución de la etapa de HF-LLME por dos etapas de SPE. Una de las SPE se realiza con un cartucho de HBL, en ella eliminan triacilglicerol y glicerofosfocolina; y la otra con uno de florisil (*Gyong-Ahn Y., 2007*). En las dos SPEs el sorbente actúa reteniendo al analito.

Es de esperar que el pescado enlatado contenga una mayor concentración de BPA que el fresco, ya que a este se le suma el BPA proveniente de la contaminación del medioambiente y el de la liberación de las latas. Por esta razón se ha analizado también este compuesto en pescado enlatado. El pretratamiento de este tipo de muestras consiste en una separación del contenido sólido de la parte líquida aceitosa o acuosa de la lata, trituración y homogenización. A continuación, se

exponen los métodos de preparación de muestra.

Las estructuras que presentan los SUPRASs hacen posible su utilización como disolventes extractores, estos han sido aplicados tanto en la extracción de contaminantes de muestras ambientales como en alimentos (*Ballesteros-Gómez A. M, 2012*). Debido a su capacidad extractora se han usado para extraer el BPA de muestras de pescado enlatado (*Alabi A., 2014*). Los reactivos empleados para sintetizarlo son tetradecanol, tetrahidrofurano y agua ultrapura.

La extracción asistida con microondas también se ha aplicado en este tipo de análisis (*Fattore M., 2015*). El agente extractor empleado es una mezcla de n-hexano/acetonitrilo. El acetonitrilo y el n-hexano son inmiscibles, de forma que en esta extracción los lípidos de la muestra se transfieren hacia el n-hexano y el BPA al acetonitrilo. En este procedimiento la fase de acetonitrilo se somete a la medida sin realizar ningún paso de purificación previo.

Hasta el momento no se ha mencionado ningún procedimiento en el que se empleen columnas de inmunoafinidad, en 2005 se presentó uno (*Podlipna D, 2007; Cichna-Markl M., 2012; Braunrath R., 2005*). Estas columnas son utilizadas en la etapa de purificación del extracto de la muestra (*Cichna-Markl M., 2012*).

Las **Tabla 5** muestran los distintos métodos aplicados en la determinación de BPA en pescado junto con algunos datos de interés.

Tabla 5. Métodos de tratamiento de muestra para la determinación de BPA en pescado. Nota: en la etapa de preparación de muestra no se incluye el pretratamiento. Abreviaturas: ESI, ionización por electrospray; FD, detector de fluorescencia; FL, fluorescencia; GC, cromatografía de gases; HPLC, cromatografía líquida de alta resolución; LC, cromatografía líquida; MS, espectrometría de masas; RSD, desviación estándar relativa.

Cantidad de muestra pretratada	Etapas de preparación de muestra	Porcentaje de recuperación (R) y RSD (%)	Técnica de separación/detección	Referencia
0,5 g	-QuEChERS	R(n=3): 55,6-109,9 RSD (n=3): 2,5-10,7	HPLC-MS/MS	(Jakimska A., 2013)
5,0 g	-Extracción con acetonitrilo -Eliminación de lípidos por reparto entre hexano y acetonitrilo -SPE (Florisil PR)	R(n=5): 70,7-72,8 RSD (n=5): 1,7-3,4	HPLC-FL	(Tsuda T., 2000)
1,5 g	-Extracción con acetonitrilo -Eliminación de lípidos por precipitación en frío -SPE (C ₁₈) -LLE con hexano:acetato -SPE (aminopropil)	R(n=3): 51,6-56,0 RSD (n=3): 2,2-8,0	GC-MS	(Santhi V.A., 2012)
1,0 g	-MSPD (C ₈) -SPE (Alúmina ácida)	R(n=4): 104,0-109,0 RSD (n=4): 10,0-14,2	HPLC-MS/MS	(Chen W. L., 2012)
1,0 g	-MAE utilizando como disolvente extractor diclorometano/metanol -SPE (aminopropil)	R(n=6): 78,0-79,0 RSD (n=6): 7,0	LC-MS	(Pedersen S.N., 1999)
-	-SPME con fibras de polidimetilsiloxano	-	HPLC-MS/MS	(Wang S., 2011)
0,8 g	-Contacto con agua en presencia de energía microondas -MAE con metanol/agua -Precipitación de lípidos en frío -HF-LLME	R(n=3): 92,7-115,1 RSD (n=3): -	HPLC-UV	(Chen B., 2013)

Tabla 5. (Continuación)

Cantidad de muestra pretratada	Etapas de preparación de muestra	Porcentaje de recuperación (R) y RSD(%)	Técnica de separación/detección	Referencia
10,0 g	-Extracción asistida con ultrasonidos con metanol -Precipitación de lípidos en frío -SPE(HBL) -SPE (Florisil PR)	R(n=7): 105,0-107,0 RSD(n=7): 5,0-17,0	GC-MS	(Gyong-Ahn Y., 2007)
0,2 g	-Extracción con SUPRASs	R(n=3):86,0 RSD(n=3): 2,0	LC-FL	(Alabi A., 2014)
10,0 g	-Extracción asistida con ultrasonidos empleando n-hexano/acetonitrilo	R(n=3): 77,0-100,0 RSD(n=3): 3,0- 5,0	LC-FL	(Fattore M., 2015)
1,0 g	-Extracción con acetonitrilo/n-hexano -Purificación con columnas de inmunoafinidad	R(n=3): 45,0-97,0 RSD(n=3): 5,0-12,0	LC-FL	(Cichna-Markl M., 2012; Podlipna D., 2007)

El procedimiento propuesto por Jakimska A. presenta la ventaja de ser rápido y fácil. Otra ventaja es el bajo coste que su aplicación conlleva y que los materiales que se precisan son de uso común y pueden encontrarse en cualquier laboratorio de análisis. El presentado en 2012 por Chen W. L. y colaboradores también presenta estas ventajas. La principal desventaja de ambos es la baja selectividad de los agentes extractores.

El método que hace uso de la extracción asistida con microondas (*Pedersen S.N., 1999*) tendría que tener la gran ventaja de aumentar la eficiencia de extracción, pero si se observan los porcentajes de recuperación mostrados en la **Tabla 5** hay métodos que proporcionan mejores resultados. Además, también es necesario tener un microondas de laboratorio para poder aplicarlo. Si es verdad que el procedimiento es bastante sencillo y solo consta de dos etapas.

Otro procedimiento que no presenta buenas recuperaciones es el descrito por Tsuda T., estos oscilan entre 70,7-72,9 %. Para poder aplicarlo no se requieren de aparatos costosos. El método no es muy rápido ya que la etapa de eliminación de lípidos por extracción líquido-líquido hay que realizarla varias veces para asegurar eliminar el máximo posible y además el procedimiento también incluye dos etapas de evaporación del disolvente.

Varios autores han optado por eliminar los componentes de naturaleza grasa mediante un proceso de precipitación en frío, eliminando de esta forma hasta el 90 % de ellos. De los tres métodos que utilizan esta precipitación en frío solo uno de ellos (*Santhi V.A., 2012*) obtiene malos porcentajes de recuperación, quizás por la pérdida del analito debida a la gran cantidad de etapas que éste presenta. Las otras dos formas de preparación de muestra (*Chen B., 2013; Gyong-Ahn Y., 2007*) también son largas.

En este trabajo se ha hablado también de un método en el que se analiza BPA en peces vivos (*Wang S., 2011*), a pesar de ser algo tedioso cabe mencionar que integra en un mismo paso muestreo, aislamiento y enriquecimiento. Este método está pensado para llevar un control medioambiental en especies que se encuentran en peligro de extinción, de esta forma no es necesario sacrificar al animal.

En general los procedimientos aplicados para el análisis de pescado enlatado son más sencillos y cortos que los desarrollados para pescado fresco. El que hace la

extracción con SUPRASs posee la gran ventaja de gastar poco disolvente y no requerir de una etapa de concentración del extracto. Es bastante simple y rápido, ya que no necesita de una etapa de limpieza pues el SUPRAS excluye la entrada de macromoléculas de naturaleza lipídica. También es barato y no necesita de un equipamiento especial de laboratorio. Quizás el principal inconveniente es la síntesis de este disolvente. El porcentaje de recuperación no es malo, un 86,0%.

El tratamiento que aplica la extracción con ultrasonidos en pescado enlatado también es bastante sencillo y en un paso se realiza extracción y purificación. Sin embargo, esta purificación puede ser algo insuficiente. La preparación de muestra que utiliza columnas de inmovinoafinidad muestra la ventaja de una mayor especificidad a la hora de la limpieza sin embargo estas columnas son algo costosas.

Por último, se ha de tener en cuenta que dependiendo de la especie de pescado analizado los porcentajes de recuperación pueden variar bastante aun aplicando el mismo procedimiento de muestra. Esto es debido a que algunas especies diferentes muestran una composición química distinta. Por ello el método que utiliza el QuEChERS entre otros, presenta una gran variabilidad en los porcentajes ya que en ese artículo se analizan varias especies de pescado (**Tabla 5**).

5. CONCLUSIONES

Se han revisado y comparado los métodos de tratamiento de muestra que hasta la fecha se han propuesto para la determinación de BPA en tres tipos de alimentos en los que se encuentra habitualmente, miel, productos lácteos y pescado. De este estudio se han obtenido varias conclusiones:

- En general los tratamientos de muestra que se llevan a cabo para el análisis de este analito en miel son mucho más simples y rápidos que los aplicados a su determinación en productos lácteos y pescado.
- Hay dos aspectos críticos en los procedimientos de preparación de muestra que son bastantes generales, la baja selectividad de los disolventes y la purificación exhaustiva necesaria para aislar el analito de otros componentes de la matriz. La purificación de muestras se convierte en esencial, ya que la matriz de los

componentes constituye la principal fuente de errores en la determinación de BPA en alimentos.

- Las técnicas de extracción más frecuentemente empleadas para el análisis de BPA en estos tres tipos de alimentos son la SPE y la LLE.
- En los últimos años, y de acuerdo con las tendencias de la Química Analítica hacia la miniaturización de los sistemas de análisis y a la consecución de un menor impacto ambiental de estos, se ha propuesto el uso de técnicas de extracción más modernas tales como la LLME o el QuEChERS que ofrecen una importante ventaja, el uso de volúmenes de disolventes muy pequeños.
- No existe un tratamiento de muestra perfecto, ya que cada uno de ellos presenta ventajas e inconvenientes.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Ackerman, 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 Methods 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 Bisphenols, Bisphenol Diglycidyl Ethers and their Derivatives in Canned Food prior to Liquid Chromatography and Fluorescence Detection. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1336*, 23-33.
3. Anastasiades, M.; Lehotay, S.J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F.J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and Dispersive Solid-Phase Extraction for the Determination of Pesticide Residues in Procedure. *Journal of AOAC International* **2003**, *86* (2), 421-430.
4. 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**.
5. Biles, J. E.; McNeal, T. P.; Begley, T. H. Determination of Bisphenol A Migrating from Epoxy Can Coatings to Infant Formula Liquid Concentrates. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45* (12), 4697-4700.

6. Braunrath, R.; Podlipna, D.; Padlesak, S.; Cichna-Markl, M. Determination of Bisphenol A in Canned Foods by Immunoaffinity Chromatography, HPLC, and Fluorescence Detection. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8911-8917.
7. Cacho-Vicente, C. Polímeros de Impresión Molecular para la Determinación de Insecticidas. Tesis Doctoral, Universidad Computense de Madrid, **2009**.
8. Cámara, C.; Fernández, P.; Martín-Esteban, A.; Pérez-Conde, C.; Vidal, M. Toma y Tratamiento de Muestras. *Ed. Síntesis*, Madrid, **2012**.
9. Canosa-Rodríguez, M. A. Desarrollo de Metodología Analítica para la Determinación de Triclosán y Parabenos. Aplicación al Estudio de su Distribución y Transformación en Muestras Ambientales. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, **2009**.
10. Cela, R.; Lorenzo, R.A.; Casis, M.C. Técnicas de Separación en Química Analítica. *Ed. Síntesis*, Universidad de Santiago de Compostela, **2003**.
11. Chen, B.; Huang, Y.; He, M.; Hu, B. Hollowed Fiber Liquid-Liquid Microextraction Combined with High Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet Detection for the Determination of Various Environmental Estrogens in Environmental and Biological Samples. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1305*, 17-26.
12. 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.
13. Cichna-Markl, M. Sample Clean-up by Sol-Gel Immunoaffinity Chromatography for the Determination of Bisphenol A in Food and Urine. *Methods* **2012**, *56* (2), 186-191.
14. Cirillo, T.; Latini, G.; Castaldi, M. A.; Dipaola, L.; Fasano, E.; Esposito, F.; Scognamiglio, G.; Di Francesco, F.; Cobellis, L. Exposure to Di-2-Ethylhexyl Phthalate, Di-N-Butyl Phthalate and Bisphenol A through Infant Formulas. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (12), 3303-3310.
15. 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.

16. 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**.
17. Cunha, S.C. Assessment of Bisphenol A and Bisphenol B in Canned Vegetables and Fruits by Gas Chromatography-Mass after QuEChERS and Dispersive Liquid-Liquid Microextraction. *Food Control* **2013**, 33, 549-555.
18. Desilets, C.P.; Rounds, M.A.; Regnier, J.E. Semipermeable-Surface Reserved-Phase Media for High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.* **1991**, 554, 25.
19. Dorantes-Cuéllar, A.; Martínez-Sibaja, C.; Guzmán Blanno, A. Endocrinología Clínica. Ed. El Manuel Moderno S.A. de C.V., **2012**.
20. EFSA, European Food Safety Authority. Online disponible en: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/bisphenol> **2016**.
21. 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**, 13 (1), 1-396.
22. Farajzadeh, M. A.; Abbaspour, M.; Mogaddam, M. R. A.; Ghorbanpour, H. Determination of Some Synthetic Phenolic Antioxidants and Bisphenol A in Honey Using Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Followed by Gas Chromatography-Flame Ionization Detection. *Food Anal. Methods* **2015**, 8 (8), 2035-2043.
23. 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.
24. FDA, Food and Drug Administration. Online disponible en: <http://www.fda.gov/forconsumers/consumerupdates/ucm297954.htm> **2012**.
25. Fernández-Álvarez, M. Estudio del Comportamiento Fotoquímico y Determinación de Compuestos Fitosanitarios en Matrices Medioambientales y Agroalimentarias mediante Técnicas Avanzadas de Extracción y Microextracción. Tesis Doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, **2009**.
26. Ferrer, E.; Santoni, E.; Vittori, S.; Font, G.; Mañes, J.; Sagratini, G. Simultaneous Determination of Bisphenol A, Octylphenol, and Nonylphenol by Pressurised Liquid Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in Powdered Milk and Infant Formulas. *Food Chem.* **2011**, 126 (1), 360-367.

27. Fischnaller, M.; Bakry, R.; Bonn, G. K. A Simple Method for the Enrichment of Bisphenols Using Boron Nitride. *Food Chem.* **2016**, *194*, 149-155.
28. Franck, H.-G.; Stadelhofer, J. W. Industrial Aromatic Chemistry: Raw Materials, Processes and Products. *Ed. Springer-Verlag*, Berlin Heidelberg, **1988**.
29. Fuentes-López, A.; García-Martínez, E.; Fernández-Segovia, I. Procedimiento de Extracción en Fase Sólida Dispersiva QuEChERS para el Análisis de Plaguicidas. Universidad Politécnica de Valencia, **2015**.
30. Gao, M.; Zhou, Y.; Sheng, Y.; Zhao, S.; Deng, X.; Guo, D.; Ding, Z.; Wang, G.; Peng, T. Determination of 12 Bisphenol Substances in Functional Foods by QuEChERS and High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Chinese J. of Chromatogr.* **2014**, *32* (11), 1201-1208.
31. García-Gómez, D. Espectrometría de Masas en Tándem Acoplada a Cromatografía Líquida con Penetramiento. Determinación de Xenobióticos en Alimentos y Biomarcadores en Muestras Biológicas. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca, **2013**.
32. González, G. L.; Tejera-Pérez, R. L.; Hernández-Sánchez, C.; Rubio-Armendáriz, C.; Revert-Gironés, C.; Gutiérrez-Fernández, A. J.; Burgos-Ojeda, A.; Hardisson-Torre, A. Toxicidad del Bisfenol A (BPA): Migración desde los Envases a los Alimentos. *Salud Pública*, **2011**.
33. Gyong-Ahn, Y.; Hwa-Shin, J.; Kim, H-Y.; Khim, J.; Lee, M-K.; Hong, J. Application of Sholid-Phase Extraction Coupled with Freezing-Lipid Filtration Clean-Up for the Determination of Endocrine-Disrupting Phenols in Fish. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *603*, 67-75.
34. Herrero-Hernández, E.; Carabias-Martínez, R.; Rodríguez-Gonzalo, E. Use of a Bisphenol-A Imprinted Polymer as a Selective Sorbent for the Determination of Phenols and Phenoxyacids in Honey by Liquid Chromatography with Diode Array and Tandem Mass Spectrometric Detection. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *650* (2), 195-201.
35. Inoue, K.; Murayama, S.; Takeba, K.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H. Contamination of Xenoestrogens Bisphenol A and F in Honey: Safety Assessment and Analytical Method of These Compounds in Honey. *J. Food Compos. Anal.* **2003**, *16* (4), 497-506.

36. Jakimska, A.; Huerta, B.; Barganska, Z.; Kot-Wasik, A.; Rodríguez-Mozaz, S.; Barceló, D. Development of a Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Procedure for Determination of Endocrine Disrupting Compounds in Fish from Mediterranean Rivers. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1306*, 44-58.
37. Kang, J. H.; Kondo, F.; Katayama, Y. Human Exposure to Bisphenol A. *Toxicol* **2006**, *22*, 78-89.
38. Kinch, C. D.; Ibhazehiebo, K.; Jeong, J-H.; Habibi, H.R.; Kurrasch, D.M. Low-Dose Exposure to Bisphenol A and Replacement Bisphenol S Induces Precocious Hypothalamic Neurogenesis in Embryonic Zebrafish. *PNAS* **2015**, *112* (5), 1475-1480.
39. Kochana, J.; Wapiennik, K.; Kozak, J.; Knihnicki, P.; Pollap, A.; Woźniakiewicz, M.; Nowak, J.; Kościelniak, P. Tyrosinase-Based Biosensor for Determination of Bisphenol A in a Flow-Batch System. *Talanta* **2015**, *144*, 163-170.
40. Kuo, H. W.; Ding, W. H. Trace Determination of Bisphenol A and Phytoestrogens in Infant Formula Powders by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1027* (1-2), 67-74.
41. 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.
42. Malone, E. M.; Elliott, C. T.; Kennedy, D. G.; Regan, L. Rapid Confirmatory Method for the Determination of Sixteen Synthetic Growth Promoters and Bisphenol A in Bovine Milk Using Dispersive Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2010**, *878* (15-16), 1077-1084.
43. Maragou, N. C.; Lampi, E. N.; Thomaidis, N. S.; Koupparis, M. A. Determination of Bisphenol A in Milk by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1129* (2), 165-173.
44. Michałowicz, J. Bisphenol A - Sources, Toxicity and Biotransformation. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2014**, *37* (2), 738-758.
45. Molina-García, L.; Fernández-de Córdova, M. L.; Ruiz-Medina, A. Analysis of Bisphenol A in Milk by Using a Multicommuted Fluorimetric Sensor. *Talanta* **2012**, *96*, 195-201.

46. Munaretto, J. S.; Ferronato, G.; Ribeiro, L. C.; Martins, M. L.; Adaime, M. B.; Zanella, R. Development of a Multiresidue Method for the Determination of Endocrine Disruptors in Fish Fillet Using Gas Chromatography-Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. *Talanta* **2013**, *116*, 827-834.
47. O'Mahony, J.; Moloney, M.; McCormack, M.; Nicholls, I. A.; Mizaikoff, B.; Danaher, M. Design and Implementation of an Imprinted Material for the Extraction of the Endocrine Disruptor Bisphenol A from Milk. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2013**, *931*, 164-169.
48. Otaka, H.; Yasuhara, A.; Morita, M. Determination of Bisphenol A and 4-Nonylphenol in Human Milk Using Alkaline Digestion and Cleanup by Solid-Phase Extraction. *Anal. Sci.* **2003**, *19* (12), 1663-1666.
49. Pedersen, S. N.; Lindholst, C. Quantification of the Xenoestrogens 4-Tert-Octylphenol and Bisphenol A in Water and in Fish Tissue Based on Microwave Assisted Extraction, Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1999**, *864* (1), 17-24.
50. Podlipna, D.; Cichna-Markl, M. Determination of Bisphenol A in Canned Fish by Sol-Gel Immunoaffinity Chromatography, HPLC and Fluorescence Detection. *Eur. Food Res. Technol.* **2007**, *224* (5), 629-634.
51. Rodríguez-Gómez, R.; Dorival-García, N.; Zafra-Gómez, A.; Camino-Sánchez, F. J.; Ballesteros, O.; Navalón, A. New Method for the Determination of Parabens and Bisphenol A in Human Milk Samples Using Ultrasound-Assisted Extraction and Clean-up with Dispersive Sorbents prior to UHPLC-MS/MS Analysis. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2015**, *992*, 47-55.
52. Rodríguez-Gonzalo, E.; Domínguez-Álvarez, J.; García-Gómez, D.; García-Jiménez, M. G.; Carabias-Martínez, R. Determination of Endocrine Disruptors in Honey by CZE-MS Using Restricted Access Materials for Matrix Cleanup. *Electrophoresis* **2010**, *31* (13), 2279-2288.
53. Santhi, V. A.; Hairin, T.; Mustafa, A. M. Simultaneous Determination of Organochlorine Pesticides and Bisphenol A in Edible Marine Biota by GC-MS. *Chemosphere* **2012**, *86* (10), 1066-1071.
54. Shao, B.; Han, H.; Tu, X.; Huang, L. Analysis of Alkylphenol and Bisphenol A in Eggs and Milk by Matrix Solid Phase Dispersion Extraction and Liquid

- Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2007**, *850*, 412-416.
55. Sun, Y.; Irie, M.; Kishikawa, N.; Wada, M.; Kuroda, N.; Nakashima, K. Determination of Bisphenol A in Human Breast Milk by HPLC with Column-Switching and Fluorescence Detection. *Biomed. Chromatogr.* **2004**, *18* (8), 501-507.
56. Tsuda, T.; Suga, K.; Kaneda, E.; Ohsuga, M. Determination of 4-Nonylphenol, Nonylphenol Monoethoxylate, Nonylphenol Diethoxylate and Other Alkylphenols in Fish and Shellfish by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **2000**, *746* (2), 305-309.
57. UE, Unión Europea (a). Directiva 2011/8/UE que Refiere a la Restricción del Uso de Bisfenol A en Biberones de Plástico para Lactantes. *Diario Oficial de la UE* **2011**, L 26, 26-29.
58. UE, Unión Europea (b). Reglamento (UE) N° 10/2011 sobre Materiales y Objetos Plásticos Destinados a Entrar en Contacto con Alimentos. *Diario Oficial de la UE* **2011**, L 22, 1-89.
59. Vandenberg, L. N.; Hauser, R.; Marcus, M.; Olea, N.; Welshans, W. V. Human Exposure to Bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol.* **2007**, *24* (2), 139-177.
60. Victor-Ortega, M.D. Evaluación de la Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva para la Determinación de Patulina en Zumos de Manzana mediante Electroforesis Capilar. Trabajo Fin de Máster, Universidad de Granada, **2011**.
61. Von-Goetz, N.; Wormuth, M.; Scheringer, M.; Konrad, H. Bisphenol A: How the Most Relevant Exposure Sources Contribute to Total Consumer Exposure. *Risk. Anal.* **2010**, *30* (3), 473-487.
62. 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.
63. 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.

64. Yi, B.; Kim, C.; Yang, M. Biological Monitoring of Bisphenol A with HPLC/FLD and LC/MS/MS. Assays. *J. Chromatogr. B* **2010**, *878*, 2606-2610.
65. 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.