

# UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN E BROMATOLOXÍA

**Instituto de Investigacións en Análises Químicas e Biolóxicas (IAQBUS)**



## DETERMINACIÓN DA EXPOSICIÓN A ADITIVOS DE PLÁSTICOS MEDIANTE A ANÁLISE DE AUGAS RESIDUAIS

Traballo Fin de Grao en Química

Brais Santamaría Álvarez

Santiago de Compostela, Xullo 2020

José Benito Quintana Álvarez e M<sup>a</sup> del Rosario Rodil Rodríguez, Profesores Contratados Doutor do Departamento de Química Analítica, Nutrición e Bromatoloxía e adscritos ao Instituto de Investigacións en Análises Químicas e Biolóxicas (IAQBUS) da Universidade de Santiago de Compostela, directores do Traballo de Fin de Grao de D. Brais Santamaría Álvarez, dan a súa aprobación e visto bo á presentación deste traballo.

E para que así conste, asinan a presente en Santiago de Compostela, a 9 de Xullo de 2020.

Asdo.: José Benito Quintana Álvarez

Asdo.: M<sup>a</sup> del Rosario Rodil Rodríguez

## ÍNDICE:

I.	RESUMO .....	1
II.	INTRODUCCIÓN .....	3
1.	Aditivos plásticos.....	3
2.	Plastificantes .....	4
3.	Familias importantes de plastificantes: Usos e características.....	4
4.	Bisfenois: Historia, usos, controversia .....	5
5.	Estrutura e propiedades dos bisfenois.....	7
5.1.	Estruturas e propiedades dos BP .....	7
5.2.	Estruturas e propiedades dos metabolitos .....	8
6.	toxicidade en humanos dos bisfenois .....	9
7.	Exposición humana aos bisfenois.....	10
8.	Metabolismo dos bisfenois .....	12
9.	Biomonitoraxe e análise de bisfenois en ouriños .....	13
10.	Análise de augas residuais con fins epidemiolóxicos (WBE).....	14
11.	Extracción en fase sólida (SPE).....	15
12.	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem .....	17
12.1.	Cromatografía de líquidos de alta resolución .....	17
12.2.	Interfase de acoplamento LC-MS.....	18
12.3.	Espectrometría de masas:anализador cuadrupolar.....	19
12.4.	Espectrometría de masas en tándem: triplo cuadrupolo .....	19
III.	OBJECTIVOS E PLAN DE TRABAJO.....	20
IV.	PARTE EXPERIMENTAL .....	21
1.	Material.....	21
2.	Reactivos e patróns .....	21
3.	Preparación de patróns.....	22
4.	Toma e preparación de mostra .....	22
4.1.	Toma de mostra .....	22
4.2.	Preparación de mostra .....	22
5.	Proceso SPE .....	22
6.	Instrumentación e análise mediante LC-MS .....	23

6.1.	Compoñentes do UHPLC-MS/MS .....	23
6.2.	Condições UHPLC-MS/MS .....	23
7.	Probas de estabilidade .....	26
V.	RESULTADOS E DISCUSIÓN.....	27
1.	Optimización MS/MS .....	27
2.	Optimización da separación cromatográfica .....	30
2.1.	Cromatografía de fase inversa .....	30
2.2.	Cromatografía de modo mixto.....	32
2.3.	Cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC).....	33
3.	Validación do método instrumental .....	36
3.1.	Linealidade .....	36
3.2.	Límites de detección e cuantificación instrumentais.....	37
4.	Optimización do proceso SPE.....	37
5.	Probas de estabilidade .....	38
5.1.	Estabilidade dos BP en augas residuais a temperatura ambiente: .....	38
5.2.	Estabilidade dos precursores en augas residuais a 4°C.....	39
5.3.	Estabilidade dos metabolitos en augas residuais a temperatura ambiente.....	40
5.4.	Estabilidade dos metabolitos en augas residuais a 4°C .....	41
VI.	FUTURO DESENVOLVEMENTO .....	43
VII.	CONCLUSIÓNS .....	44
VIII.	BIBLIOGRAFÍA .....	46

## I. RESUMO

Os bisfenóis son unha familia de plastificantes moi importante, empregados na produción de policarbonatos plásticos e resinas epoxídicas, principalmente. Ao tratarse dunhas substancias moi usadas na actualidade, a exposición humana a estes compostos é elevada, podendo crear numerosos trastornos e enfermidades.

Debido a isto, é necesario desenvolver metodoloxías para cuantificar a exposición humana aos bisfenóis de maneira rápida e precisa. Para iso, neste traballo en primeiro lugar, optimizouse o método analítico de detección e separación para os distintos bisfenóis (Bisfenol A, Bisfenol S e Bisfenol F, e os seus metabolitos máis importantes). Para iso, a separación e detección dos diferentes compostos levouse a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a espectrometría de masas en tándem (MS/MS) de triplo cuadrupolo (QqQ).

Así, testáronse diversas columnas cromatográficas de fase inversa (máis adecuadas para separación de bisfenóis), modo mixto e de interacción hidrofílica (máis adecuadas para metabolitos). O método instrumental validouse parcialmente en termos de linealidade e límites de detección e cuantificación. Tamén se avaliou a estabilidade destes compostos en auga residual.

Despois, comezouse a optimización da extracción en fase sólida, pero polo Estado de Alarma debido á Covid-19, non foi posible acabala.

## RESUMEN

Los bisfenoles son una familia de plastificantes muy importante, empleados en la producción de policarbonatos plásticos y resinas epoxídicas, principalmente. Al tratarse de unas sustancias muy usadas en la actualidad, la exposición humana a estos compuestos es elevada, pudiendo producir numerosos trastornos y enfermedades.

Debido a esto, es necesario desarrollar metodologías para cuantificar la exposición humana a los bisfenoles de manera rápida y precisa. Para esto, en este trabajo en primer lugar, se optimizó el método analítico de detección y separación para los distintos bisfenoles (Bisfenol A, Bisfenol S y Bisfenol F, y sus metabolitos más importantes). Para esto, la separación y detección de los diferentes compuestos se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a espectrometría de masas en tándem (MS/MS) de triple cuadrupolo (QqQ).

Así, se probaron diversas columnas cromatográficas de fase inversa (más adecuadas para separación de bisfenoles), modo mixto y de interacción hidrofílica (más adecuadas para metabolitos). El método instrumental se validó parcialmente en términos de linealidad y límites

de detección y cuantificación. También se evaluó la estabilidad de estos compuestos en agua residual.

Después, se comenzó la optimización de la extracción en fase sólida, pero por el Estado de Alarma debido a la Covid-19, no fue posible acabarla.

## **SUMMARY**

Bisphenols constitute a significant family of plasticizers, employed e.g. in polycarbonates and resin's production. Because of the wide application of this type of substances, human exposure can be remarkable, which can potentially produce numerous disorders and issues to humans.

Hence, it is necessary to develop methodologies to quantify human exposure to this type of substances in a fast and efficient way. To this end, in this work, an analytical method for the separation and detection of three different bisphenols (Bisphenol A, Bisphenol S and Bisphenol F), and their most important metabolites was developed. Separation and detection of the compounds were carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled to tandem mass spectrometry (MS/MS) with a triple quadrupole (QqQ).

In this context, different chromatographic columns of reversed phase, mixed mode and hydrophilic interaction chromatography were investigated. In the case of parent bisphenols reversed phase columns provided the best results, whereas HILIC performed the best for their metabolites. The instrumental method was partially validated in terms of linearity and detection, and quantification limits. Furthermore, the stability of these chemicals in wastewater was also investigated.

After that, the optimization of the solid phase extraction was started, but it was not possible to finish it because of the situation caused by the Covid-19 pandemic.

## II. INTRODUCCIÓN

### 1. Aditivos plásticos

Para a produción da maioría dos plásticos, a industria química tivo que recorrer ao emprego de diversos aditivos plásticos. Debido aos múltiples avances nos diversos sectores da sociedade, o emprego destas substancias fíxose imprescindible, xa que moitos polímeros, por si mesmos, non son procesables nin útiles. Por contra, grazas ao emprego destes aditivos, moitos produtos plásticos teñen utilidades moi diversas, ademais de permitir que a súa produción sexa máis barata[1].

Deberase facer unha diferenciación entre aditivos e contaminantes dos plásticos. Os primeiros son os que se engaden a un plástico ou outro material polimérico de maneira intencionada, para así poder variar as súas propiedades. Non obstante, os segundos, aparecen nos materiais de forma non intencionada, polo que deberán ser evitados dende o proceso de síntese do material de interese.

Dentro dos aditivos, existen moitas familias distintas, con distintas propiedades. Polo tanto, empregaranse con distintos fins (os plastificantes aportan resistencia, mantendo a plasticidade desexada, os piroretardantes serven para evitar a propagación do lume, etc.). Algunhas familias de aditivos son[2]:

Acelerantes: axudan á formación de polímeros na síntese de plásticos. Tamén permiten un maior entrecruzamento de monómeros. Hai moitos tipos de acelerantes. Ex: MTB (2-mercaptobenzotiazol) e ETU-22PM (etileno tiourea).

Antiescumantes: evitan a formación de espuma. Isto permite que o produto final non presente puntos débiles na superficie. Ex: SF100 (dimetil silicona).

Antidegradantes: retrasa a degradación debido ao contacto co exterior (por ozono, oxidacións ou luz). É unha gran familia na que se inclúen antioxidantes (metil-2-mercaptobenzimidazol ou octadecil 3-(3,5-di-terc-butil-4hidroxifenil)propanoato), antiozoantes (níquel dimetilditiocarbamato) e estabilizadores UV.

Axentes de soprado: introducen gases no plástico ou na resina. Isto permite que o material sexa máis lixeiro, máis suave e faino illante. Ex: carbamoilaminourea, [(4-metilfenil)sulfonilamino]urea.

Axentes de enlace: únense de forma física ou química xunto co polímero. Ex: octiltriétoxosilano, vinilmetildimetoxisilano.

Axentes de entrecruzamento: permite a unión á cadea principal doutros grupos, para así aumentar o tamaño do polímero, ademais de ramificalo. Aporta solidez, elasticidade, impermeabilidade aos gases e convérteo nun mellor illante eléctrico. Ex: ácido esteárico, zinc dietilditiocarbamato.

Pirorretardantes: iniben a ignición ou a inflamabilidade do produto de uso. Pertencen a esta categoría os éteres difenílicos bromados, ademais de sistemas multibencénicos, entre moitos outros.

Axudantes de procesado: permiten unha mellora no procesado dos polímeros. Aportan condicións óptimas para a súa formación. Ex: erucamida.

Retardantes: retrasa o do entrecruzamento, úsase para permitir un tempo de reacción maior, e así cambiar as características do produto. Ex: ácido benzoico, cianometildodeciltritiocarbonato.

Plastificantes: detallados nas seguintes seccións.

### **2. *Plastificantes***

Os plastificantes son un tipo de aditivos plásticos transparentes, incoloros, cunha aparencia de líquido viscoso, que se empregan para proporcionar unha maior plasticidade e facer máis prácticos a moitos dos produtos plásticos. Así, os plastificantes permiten aumentar a flexibilidade e a resiliencia (capacidade dun material de almacenar enerxía elasticamente, sen deformacións permanentes) do produto final[3].

Permiten diminuír a temperatura de transición vítrea do polímero que se fabrica. Isto fai que sexa un material elástico incluso en temperaturas relativamente baixas. Só en condicións extremas de frío serán ríxidos, e polo tanto, fráxiles[1].

Debido a estas vantaxes que presentan os plastificantes, convertéronse nunha familia de compostos moi recorrente para a fabricación de novos produtos. Polo tanto, están moi presentes no mercado actual.

Os plastificantes atópanse nos plásticos, resinas, etc. enlazados de maneira non covalente, é dicir, non están unidos aos materiais por enlaces químicos. Isto fai que aumente o seu perigo, xa que ao estar debilmente enlazados aos produtos, poden liberarse con facilidade ao medioambiente[1].

Ademais, case sempre se tratan de compostos de baixo peso molecular, facendo que sexan moitos deles volátiles. Polo tanto, aumenta a exposición animal (e humana) a estas substancias, xa sexa por vía inhalación, por contacto coa pel, ou, na maioría dos casos, por inxestión coa comida. Así é, que se consideren como substancias contaminantes na actualidade.

### **3. *Familias importantes de plastificantes: Usos e características***

Os plastificantes son unha familia de aditivos plásticos moi común e variada no mundo actual. Atópanse en produtos médicos, en plásticos ou latas de comida, tapicería, nos pisos dun edificio, moldes, xuntas de materiais, tubaxes, roupa impermeable, illantes eléctricos, recortadoras e revestimentos[3]. Como se trata dunha familia moi ampla, é necesario facer unha clasificación dos plastificantes máis empregados e importantes[4]:

Ftalatos: empregáronse en grandísimas cantidades durante máis de 8 décadas. É a familia de plastificantes máis coñecida, e da que máis estudos se realizaron, xa ben para a estimación da súa concentración no medioambiente ou nun corpo, ou para coñecer as súas propiedades físico-químicas. É unha familia de compostos consistente nun benceno disubstituído 1,2 con 2 ésteres. Nesta familia de plastificantes, a variación entre un composto e outro ven na cadea lateral do éster. Atópanse en deterxentes, lubricantes, praguicidas, adhesivos, roupa, en envases e latas de comida, en produtos de coidado persoal (como cremas ou maquillaxe) e en produtos médicos, entre outros [5].

Principalmente, aos nosos corpos chegan debido a comida contaminada, ao contacto con pó, ou nos bebés, co contacto con plásticos (chupete). Dentro do corpo humano, pode producir diversos efectos negativos para a saúde. Entre eles atópase a ralentización ou aceleración da puberdade, cambios na concentración das hormonas, efecto antiandroxénico, diminución da acuosidade do seme, asma, hipertensión, diabetes ou incluso un factor que provoca obesidade [5,6].

Poliésteres: son compostos que se atopan tipicamente en roupa, principalmente na deportiva (camisetas de fútbol, material de entrenamiento). Tamén forman parte das botellas de plástico, ou en globos. Consisten en cadeas longas orgánicas formadas pola repetición de unidades monoméricas unidas mediante unións ésteres, o seu grupo funcional.

Citratos: é un composto que forma parte dos envases, recipientes e revestimentos de plásticos. Consiste nun triácido, cun grupo hidroxilo terciario. Con tres cargas negativas, debe ser estabilizado por catións.

Trimetilatos: empréganse nos revestimentos de cables, polo que actúan coma soporte que lle dá resistencia ao plástico, ademais de illante.

Tereftalatos: aparecen en envases, principalmente. Debido á súa capacidade illante a gases (non permite o paso de osíxeno ou dióxido de carbono), e a súa resistencia térmica. Forman cadeas mediante unión éster.

Benzoatos: empezaron a usarse coma alternativa aos ftalatos, tras os estudos que indicaban que eran contaminantes. Consiste nun benceno unido a un ácido.

Bisfenois: ver seguinte sección.

#### **4. Bisfenois: Historia, usos, controversia**

O Bisfenol A (BPA) é un plastificante moi empregado na industria química. Ten utilidade na manufacturación de policarbonatos plásticos e na síntese de resinas epoxídicas, maiormente[7]. Producíronse 1150000 toneladas nos anos 2005 e 2006 na Unión Europea[1].

O BPA adoita entrecruzarse durante a síntese dun plástico. Cando este proceso remata, os monómeros de BPA quedan retidos no composto final. Xa que non están unidos covalentemente,

podería ser sinxelo que saian ao medioambiente monómeros de BPA en función da temperatura, pH e graxas en contacto co plástico [1].

Os bisfenóis (BP) están presentes en axentes de limpeza rápida, en produtos de limpeza, de coidado persoal (coma poden ser cremas hidratantes e similares). Tamén aparecen en pratos de microondas [8].

Tamén está presente o BPA nos papeis térmicos, como son por exemplo, os tickets de compra. Son os que causan o brillo, que nos permite ver dunha cor distinta o tinte impreso[1].

Como se descubriu que se trata dun contaminante o BPA, e debido á concienciación social adquirida pola sociedade actual sobre posibles substancias que resulten nocivas á natureza, trátase de limitar o seu uso. Así, por exemplo, en moitos países, coma Canadá, ou a Unión Europea, prohibiron a súa presenza en determinados produtos, principalmente naqueles destinados aos bebés. Ademais, a Axencia Europea de Produtos Químicos (ECHA) engadiu o BPA en 2017 como unha substancia potencialmente preocupante[9].

Ademais de limitar o seu uso, e polo tanto, a súa exposición humana e no medioambiente, a industria procurou alternativas. Estas alternativas consisten nunha substitución do BPA por análogos. Estes poden ser variados, destacando o Bisfenol S (BPS) e o Bisfenol F (BPF),. As estruturas destes compostos son mostradas na Figura 1.

O BPF, ademais de empregarse como substituínte do BPA, é un compoñente natural que se atopa nas mostazas, polo que un aumento na súa concentración dentro dun corpo, pode ser polo consumo deste alimento [9].

Con todo, estudos máis recentes indican que estes dous análogos non só son similares quimicamente os distintos tipos de bisfenóis (BP), senón que tamén gardan parentesco nas súas propiedades (eco)toxicolóxicas (como se detalla no Apartado 2.6.)[10].

O BPA foi atopado en pó de habitacións cerradas, en mostras de alimentos, residuos, augas residuais de influente e efluente e en augas superficiais [7]. O BPS e o BPF foron detectados en residuos, en pó de habitacións e en mostras de auga [10].

O BPS converteuse no análogo do BPA máis importante, producíndose nos Estados Unidos de América en cantidades próximas ás 500 toneladas en 2012[8]. Este composto foi detectado nas augas superficiais do río Adyar (na India) ata en concentracións de 7,2 µg/L [10].

O BPF non se empregou tanto coma os outros dous BP, polo que a súa presenza no medioambiente é menor. Foi detectado en augas residuais de Granada e Melilla en concentracións de ata 2,5 µg/L [10].

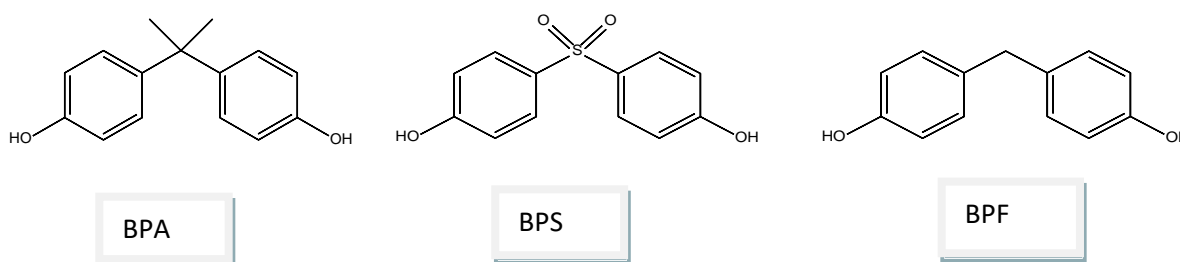
Esta situación semella á dos compostos clorofluorocarbonos (CFC). Ao primeiro, estaban nos aerosois. Despois, descubriuse que danaban á capa de ozono, polo que se prohibiron. Logo,

cambiaron polos seus derivados hidroxenados, os HCFC. Aínda que son algo menos perigosos, e conseguiuuse frear a destrución da capa de ozono, seguen gardando paralelismos e perigosidades cos seus predecesores[11].

### 5. Estrutura e propiedades dos bisfenóis

Nestetraballo lévase a cabo o estudo dos BP (BPA, BPS e BPF) e dos seus principais metabolitos (BPA-Sulfato, BPA-Glucurónido, BPA-Disulfato, BPA-Diglucurónido, BPS-Glucurónido, BPS-Sulfato, BPF-Glucurónido, BPF-Sulfato).

#### 5.1. Estruturas e propiedades dos BP



**Figura 1:** Estrutura dos BP estudados.

Como se pode observar na Figura 1, os BP son compostos orgánicos formados por dous fenóis conectados por un grupo  $\text{CH}_2$  (no caso do BPF), por un grupo  $\text{CH}_2$  con dous metilos (como ocorre no BPA) ou polo  $\text{SO}_2$  (para o BPS) en posición *para*- a ambos grupos hidroxilo.

**Táboa 1:** Propiedades fisicoquímicas dos BP estudados[12].

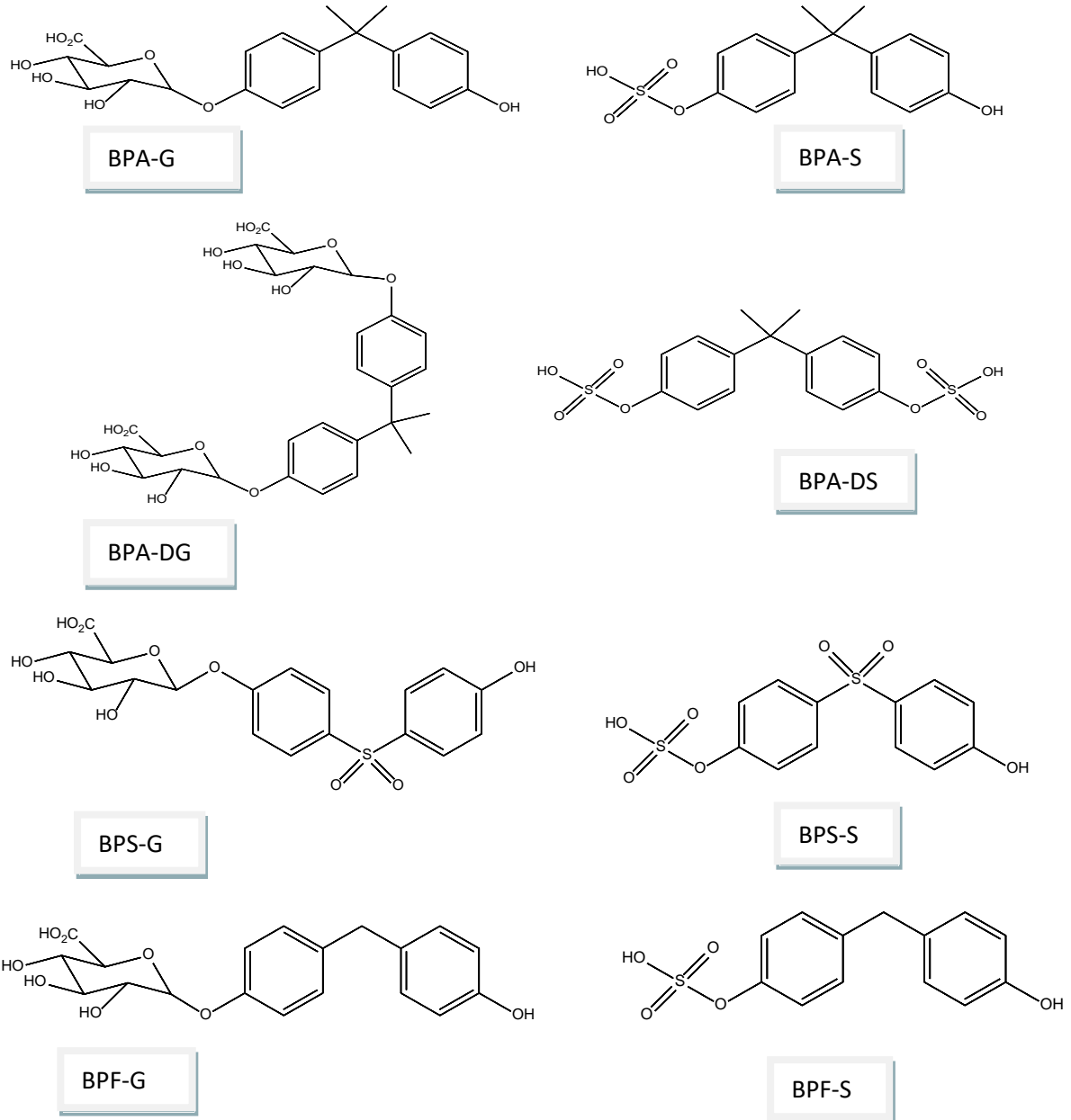
Composto	NºCAS	Masa Monoisotópica/Da	LogK <sub>ow</sub>	pK <sub>a</sub>	Chemspider ID
BPA	80-05-7	228,115	3,64	10,29	6371
BPS	80-09-1	250,030	2,14	7,00	6374
BPF	620-92-8	200,084	2,76	9,91	11614

A Táboa 1 indica as propiedades fisicoquímicas máis importantes dos BP. Os datos da Táboa 1, como os da Táboa 2, foron obtidos da base de datosSciFinder. Os tres compostos trátanse de ácidos moi débiles, como indican os seus respectivos pK<sub>a</sub>, que oscila entre os valores de 10,29 do BPA e 7,00 para o BPS, o cal demostra que a pH neutro atoparanse todos protonados (menos o BPS, que se atoparía 50% protonado e 50% en forma aniónica). O punto de ebulición está en máis de 200 °C para os tres, polo que se trata de compostos semivolátiles.

O logK<sub>ow</sub>(coeficiente de partición octanol auga) varía entre 3,43 (para o BPA) e 1,83 (para o BPS). Estes son valores medio-baixos, xa que se trata de compostos polares, sendo o BPS o máis polar grazas ao grupo  $\text{SO}_2$ , que retira moita carga aos fenilos. Ao tratarse de compostos polares, pasarán á auga con facilidade, cando se atopen en medio orgánico.

### 5.2. Estructuras e propiedades dos metabolitos

Os metabolitos son producidos dentro do corpo humano a partir dos BP. Na Figura 2 obsérvanse os metabolitos estudados neste proxecto.



**Figura 2:** Estructura dos metabolitos estudados.

Os metabolitos son derivados dos BPs, aos que se lle substituíron os hidróxenos dun ou ambos grupos fenólicos por grupos sulfatos ou glucurónidos.

**Táboa 2:** Propiedades fisicoquímicas dos metabolitos estudados[12].

Composto	NºCAS	Masa Monoisotópica/Da	LogK <sub>ow</sub>	pK <sub>a</sub>	Chemspider ID
<b>BPA-G</b>	267244-08-6	404,147	1,14	2,79	57262503
<b>BPA-S</b>	267244-09-7	308,072	2,81	-3,95	35789615
<b>BPA-DG</b>	2368232-08-8	580,179	-1,36	2,49	N/A
<b>BPA-DS</b>	10040-33-2	388,029	1,98	-4,34	29788784
<b>BPS-G</b>	2230265-52-6	426,062	-0,81	2,74	N/A
<b>BPS-S</b>	2230058-82-7	329,987	0,86	-4,85	N/A
<b>BPF-G</b>	N/A	376,116	N/A	N/A	N/A
<b>BPF-S</b>	51572-34-0	280,041	1,99	-3,98	N/A

Como se indica na Táboa 2, os metabolitos dos BP son compostos ácidos, máis fortes cós BP, xa que os seus valores de pK<sub>a</sub> están por debaixo de 3. En condicións de pH neutro, trátanse de compostos aniónicos, pola perda dun protón, correspondente ao da molécula conxugada (sulfato ou glucurónido). Por tanto, e debido ao tamén baixo logK<sub>ow</sub>, son compostos moi polares.

### 6. Toxicidade en humanos dos bisfenois

Debido ao aumento do uso do BPA, e grazas ás avaliacións nas que o sinalan coma un contaminante, fixéronse diversos estudos sobre a súa toxicidade. Así, xa se coñece que o BPA causa efectos na saúde. Afecta ao cerebro, ao sistema inmune, ao sistema reproductor, e provoca cambios no metabolismo[9].

Para coñecer a toxicidade, realizáronse diversos estudos con larvas de peixes cebra que permitiron coñecer o LC<sub>50</sub> (*Lethal Concentration 50*, a concentración dunha substancia que conduce á morte da metade desa poboación) para os BPs. Así, para o BPS obtívose un valor de 323 mg/L[13], para o BPA de 81,53 mg/L[14] e para o BPF de 10,03 mg/L[15].

Considérase que o NOAEL (*No Observed Adversed Effect Level*, concentración máis elevada á que pode estar exposto un animal ou persoa sen sufrir ningún efecto prexudicial para a saúde) do BPA está por debaixo dos 50 mg/kg peso corporal e día. Outras investigacións comentan que os efectos adversos do BPA xa se fan presentes por debaixo do RfD teórico (*Reference Dose*, cálculos de exposicións diarias que probablemente non causarán danos na saúde), considerado coma 1000 veces menor có NOAEL[16].

Segundo un estudo na poboación dos Estados Unidos de América, o BPS está asociado a un aumento no índice de masa corporal (non é evidente que sexa un factor causante de obesidade) [9]. Non obstante, nas mulleres, a presenza de BPA pode ser un factor importante para a obesidade, ademais de ser un causante de abortos espontáneos [1].

Tanto BPA, como BPS e BPF cortan parte da actividade endócrina, e poden presentar carácter androxénico, estroxénico e antiestroxénico. Ademais de afectar potencialmente ás embarazadas[9,10,17].

O BPF e BPS tamén alteran o metabolismo dos lípidos e á adipoxénese, ademais de alterar ao ADN[9,18].

Tras realizar análises bioquímicos, determinouse que o BPA non se enlaza de forma tan forte aos receptores estrógenos coma o estradiol. Porén, pode estimular a cambios nas respostas ás células doutras maneiras indirectas [16].

Como comparación dos BPS e BPF fronte o BPA, fíxose un estudo subministrándolle distintas concentracións dos primeiros a embrións de peixes cebra. Como resultado, chegouse a detectar que eran causantes do estrés oxidativo (acelerando o envellecemento das células, rompendo o equilibrio entre antioxidantes e radicais libres, e provocando unha morte celular prematura), coma o BPA, ademais de cambiar a expresións de diferentes xenes. Como engadido, aceleraban a saída das larvas, o cal inhibían o posterior crecemento das mostras[10].

### **7. Exposición humana aos bisfenóis**

Coñecida a perigosidade en humanos dos BP, é importante coñecer a súa presenza dentro dos corpos humanos. Para isto, fixéronse diversos estudos sobre a exposición humana aos BP.

Un deles avaliou a concentración de sete BP (BPA, BPS, BPF, e tamén dos análogos BisfenolAF, Bisfenol P, Bisfenol AP e BisfenolZ) en mostras de ouriños (160 persoas) e en pós das habitacións onde vivían 40 estudantes (para determinar a exposición vía inhalación a estes compostos) dunha universidade do sur de China. O BPA foi atopado no 99% das mostras de ouriños nunha concentración media de 3,97 ng/mL, e nun 80% dos dormitorios nun valor medio de 2,98 µg/g de pó. OBPS foi atopado no 88% dos ouriños nunha concentración media de 0,24 ng/mL e no 78% das habitacións interiores a 0,22 µg/g. O BPF foi atopado en maiores concentracións nos dormitorios, aínda que en valores moi inferiores en comparación co BPA e BPS[19].

Noutros dous estudos, realizáronse estimacións sobre a exposición á que estaban sometidos os nenos ao BPA na casa e na gardería. No primeiro, chegouse a detectar este composto en comida e bebida, no chan e no pó, entre outros, nunha concentración media de BPA de 42,98 ng/kg e día. No segundo estudo detectouse BPA nos lugares anteriormente citados, ademais de nas toallíñas para limpeza. Pero a maior exposición viña na dieta, con 52-74 ng/kg e día. Vía inhalación, a exposición era de 0,24-0,41 ng/kg e día[16].

Os BP non só poden ser medidos nos ouriños, ou, a nivel rexional nas augas residuais, senón que tamén se poden estimar as súas concentracións en soro (en sangue e plasma son outras variantes), no fluído amniótico (o que rodea ao embrión), no fluído folicular, no tecido da placenta e na sangue do cordón umbilical, entre outros[1,16]. Como o BPA é o BP máis

importante e coñecido, realizáronse para este algunhas probas nestes fluídos e tecidos para estimar cal era a súa concentración dentro do corpo humano [16]. A continuación preséntanse algúns dos estudos realizados nalgúns dos fluídos e tecidos citados anteriormente:

Estudos en soros: mediuse o BPA sen conxugar dende o ano 1999, con diversas técnicas, como a cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) e mediante ensaio por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA, non obstante, con esta técnica detectáronse nalgúns análises valores grandes anómalos, e non se aconsella empregala xa que non ten tanta sensibilidade e presenta problemas de efecto matriz) [20].

Obtivéronse valores altos en diversos estudos de soro de cordón umbilical, soro de embarazadas e soro do fluído amniótico en fases avanzadas do embarazo. Ademais, demostrouse que o BPA cruza a barreira da placenta que separa a nai do embrión. No soro materno, entre a semana 15 e 18 de embarazo, observáronse valores de 1,4-2,4 ng/mL, e no fluído amniótico fetal, observouse unha concentración máxima de 8,3 ng/mL de BPA. Estes valores de BPA no fluído amniótico descendieron ata 1,1 ng/mL no final do embarazo, e isto pode ser debido ao menor metabolismo do feto nun principio, ou porque despois poden formarse os metabolitos a partir do BPA [21].

Mediante a técnica ELISA fíxose unha comparación entre as concentracións de BPA en homes e mulleres, dando nos primeiros valores significativamente maiores. Ademais, mulleres con síndrome ovario poliquístico presentan valores superiores. Con estes resultados chegouse á conclusión de que os valores máis altos de testosterona inflúen no resultado, debido ao carácter androxénico do BPA, que diminúe a actividade da UDP-glucuronosiltransferasas, e así reduce o metabolismo (como se comenta no Apartado 2.8.) [9,22,23].

Estudo de placenta: o valor medio de BPA nos tecidos da placenta, medido no mesmo estudo que o do fluído amniótico está en 11,2 ng/g tecido. Isto indícanos que o feto dende o primeiro momento vai estar exposto ao BPA, coas súas consecuencias para o desenvolvemento [21].

Estudos en leite materno: o BPA, trátase dun composto relativamente lipofílico, e que, polo tanto, aparece tanto nas graxas coma no leite, xa que hai partición entre ambos tecido e líquido. Nun estudo, detectáronse valores de entre 0,28-0,97 ng/mL de BPA [24]. Para o segundo, observouse que o BPA estaba presente no 60% (20 mostras) das mostras de leite materno, cun valor medio de 0,4 ng/mL, e a suma do BPA máis os seus derivados conxugados estaban presentes nun 90% das mostras cunha concentración media de 1,1 ng/mL [25].

Outro estudo analizou o calostro. Este leite materno caracterízase porque ten altos valores de anticorpos, hidratos de carbono e proteína, pero poucos lípidos. Nel observouse un valor medio de 3,41 ng/mL de BPA [26].

Estudos do seme humano: mediante ELISA detectáronse uns niveis de media en seme humano de 5,1 ng/mL de BPA. Por contra, mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a

espectrometría de masas (HPLC/MS), non se detectou presenza de BPA. Isto pode ser debido a que o ELISA non sexa adecuado debido ás interaccións non específicas de BPA cos anticorpos [27].

### **8. Metabolismo dos bisfenóis**

Existen diferentes fases no metabolismo, en función da reacción química que sofren as moléculas no interior do corpo. Así, distínguense [7]:

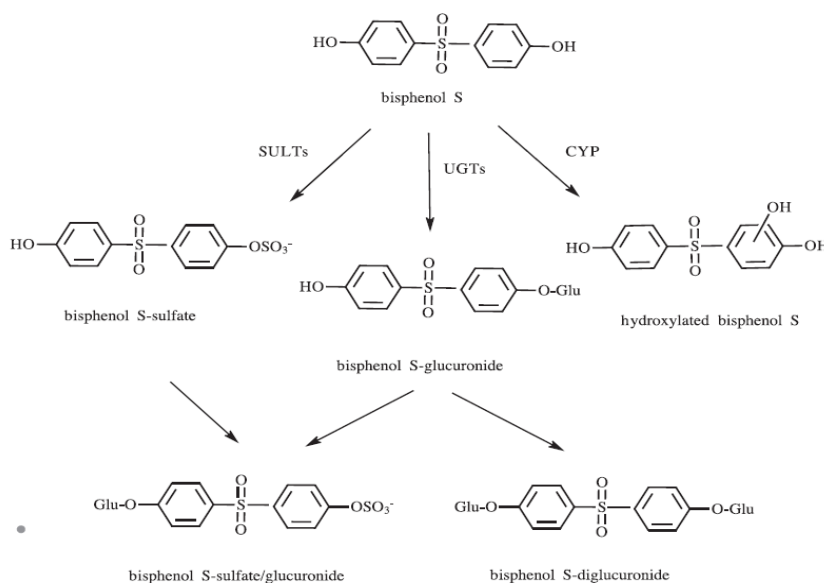
- Metabolismo primario: nel, engádense grupos pequenos ao composto de partida. As reaccións máis comúns son as de redución/oxidación, entre a que destaca a hidroxilación, e as de hidrólise. Nos BPs esta fase de metabolismo non é excesivamente relevante.
- Metabolismo secundario: consiste na conxugación da molécula de partida ou dos metabolitos formados na fase de metabolismo primario. Nela, grupos tales coma hidroxilos, únense a moléculas hidrofílicas, sendo o máis habitual nos BP dentro do corpo, onde adoitan engadírselle sulfatos e glucurónidos (Figura 1).

O metabolismo secundario é necesario para unha mellor excreción dos BP do organismo a través dos ouriños. De feito, os BP non son compostos moi polares (sen grandes dipolos permanentes, como se comentou no Apartado 2.5.1.), ademais de estables; polo que non poden ser excretados facilmente. Por tanto, tenderían a acumularse no organismo. Para poderen ser eliminados, é necesaria a conxugación con grupos glucurónidos, ou sulfatos. Así, aumentará a polaridade do composto e serán excretados con maior facilidade.

Os BP, ao igual que as demais familias de plastificantes, poden entrar no corpo a través de tres posibles vías: inhalación, por contacto dérmico e oral, sendo esta última a principal [9].

Cando chegan ao fígado, son transformados nos diferentes metabolitos grazas á acción dos enzimas que forman o complexo citocromo P450s (CYPs) e UDP-glucuronosiltransferasas (UGTs). Realizouse un estudo de screening in vitro con células de fígado humano, co obxectivo de determinar cales eran os distintos metabolitos formados a partir do BPS, e comparando os resultados obtidos en estudos anteriores para o BPA. Como resultados para esta avaliación do BPS, detectouse que a maior parte dos BP estaban conxugados con sulfatos e glucurónidos, e en menores concentracións, aparecían diconxugados. Tamén se detectaron 2 metabolitos primarios, o monohidroxi-BPS e o dihidroxi-BPS. Estes metabolitos poderían considerarse, polo tanto, coma biomarcadores para a exposición humana ao BPS [7].

Na Figura 3 móstranse as reaccións que transcorren no fígado para a transformación do BPS nos seus metabolitos máis importantes. O BPA e o BPF sofren reaccións análogas de metabolismo.



**Figura 3:** Metabolismo do BPS[10].

O Programa Nacional de Toxicoloxía (NTP) estadounidense realizou un estudo cuantitativo sobre o metabolismo e excreción do BPS. Subministráronlle diferentes doses (50, 150 e 500 mg/kg) a ratas (de ambos xéneros, máis grandes) e a ratos (de ambos xéneros, máis pequenos), e hepatocitos humanos in vitro. Comparouse a excreción do BPS e metabolitos por ouriños e feces. A porcentaxe excretada en feces aumentaba cando se aumentaba a dose (pasaba dun 16% coa dose de 50 mg/kg ao 30% coa de 500 mg/kg). Non se detectaron diferenzas de xénero, pero si entre as distintas especies. Era máis rápida a excreción nos ratos e ratas (en 24 h quedaba o 7,5% do BPS inicial, e nas 72 h, case non quedaba nada do subministrado) predominando a forma BPS-glucurónido (máis dun 50% do excretado en ambas especies), e seguido do BPS-sulfato (entre un 5% e un 20% para a dose de 150 mg/kg). Por último, tamén eran excretadas outros metabolitos, pero en menores cantidades, ademais do BPS[8].

### 9. Biomonitoraxe e análise de bisfenóis en ouriños

Debido á importancia do BPA nos últimos anos como plastificante e noutras aplicacións, fixéronse diversos estudos para estudar a exposición humana, a súa toxicidade, a súa concentración en distintos lugares...

As primeiras análises para tratar de controlar a exposición dos BP sobre as persoas, e así poder relacionala con posibles enfermidades, fixéronse para o BPA, e realizáronse sobre os ouriños, ademais doutras estimacións noutros fluídos como pode ser o sangue (como foi comentado no Apartado 2.7.).

Como exemplo dalgún estudo de biomonitoraxe en ouriños, nos Estados Unidos de América, levouse a cabo un estudo sobre un grupo de case 400 persoas, utilizando GC-MS. Os resultados

amosaron en homes un valor medio de 1,63ng/mL, e de 1,12ng/mL en mulleres. A maioría do BPA estaba en formas conxugadas [16].

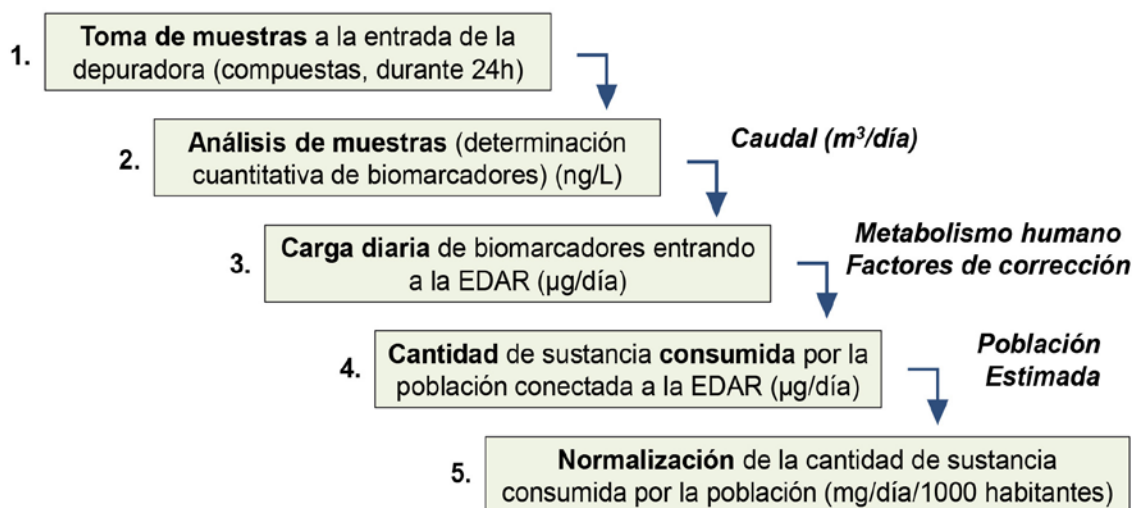
Coma contraposición, en Corea fíxose outro estudo sobre 30 persoas, utilizando HPLC cun detector de fluorescencia, onde detectaron 2,82 e 2,76ng/mL de BPA, en homes e mulleres, respectivamente [16].

O primeiro estudo sobre o BPS nos ouriños humanos realizouse en 2012, con valores entre <0,02 (por debaixo do límite de detección) e 21ng/mL. Despois, realizáronse outras probas de biomonitoraxe para este composto, e incluso comparando as concentracións do BPS co BPA [7].

### 10. Análise de augas residuais con fins epidemolóxicos (WBE)

A análise de augas residuais con fins epidemolóxicos (WBE, do termo inglés *Wastewater-BasedEpidemiology*) é unha metodoloxía que ten coma obxectivo obter datos de consumo ou exposición a substancias de maneira indirecta, rápida e económica se se compara cos estudos clásicos de biomonitoraxe[28].

A WBE consiste en recoller mostras de auga residual dunha depuradora (que adoita ser a responsable dos tratamentos da auga nunha localidade determinada), nun tempo determinado, para ser analizadas posteriormente e así tratar de detectar diferentes substancias de interese. As augas residuais conteñen os ouriños de toda unha localidade.



**Figura 4.** Etapas de traballo da WBE [29].

Na Figura 4 móstranse as etapas da WBE. No primeiro paso, recóllense mostras representativas de 24 horas de auga residual dunha determinada poboación, e analízanse para a determinación de concentración dos compostos medidos. Despois, faise a estimación da carga diaria que recibe a EDAR, multiplicando a concentración medida (ng/L) polo fluxo de auga residual que chega á EDAR (L/día). Este valor de carga é multiplicado por un factor de corrección, que ten en conta reaccións metabólicas dentro do corpo humano e relacións medias de excreción dos compostos. Por último,

este dato de carga diaria divídese entre o número de persoas servido pola EDAR, polo que se obtén a concentración do composto por día e habitante.

Isto permítenos medir biomarcadores (compostos que representan o consumo ou exposición dunha poboación a unha determinada substancia).

Xurdiron os estudos epidemiolóxicos en augas residuais para medir o consumo de drogas, e analizar posibles tendencias (diferencia de abuso destas substancias nos fins de semana ou durante festas, respecto a días laborais)[29], como alternativa aos métodos tradicionais: enquisas sobre consumo, estatísticas sobre cantidade de droga incautada pola Policía, número de solicitudes de axuda de drogodependentes ou contabilización de crimes relacionados con drogas, etc.

A WBE recolle miles de mostras conxuntas e anónimas de ouriños. Non pode medir o consumo puntual dunha persoa, pero é mellor estimador a nivel global xa que representa a un grupo de persoas maior.

Despois de poñerse en práctica este método para o control do uso de drogas (en España fíxose en Barcelona, na Comunidade Valenciana e en Santiago), e ver que os resultados foron satisfactorios, a comunidade científica comezou a empregalo con outros fins. Entre eles atópase a biomonitorización de plastificantes, coma ftalatos ou BP (que se estudará neste traballo) [5,30].

Para realizar este estudo, será necesario atopar uns biomarcadores adecuados, que non se degraden na auga residual en presenza doutros compostos e nas condicións ambientais máis comúns. Estes poden ser os propios BP ou, preferiblemente, os seus metabolitos (que derivan dos BP, debido ao metabolismo humano).

### **11. Extracción en fase sólida (SPE)**

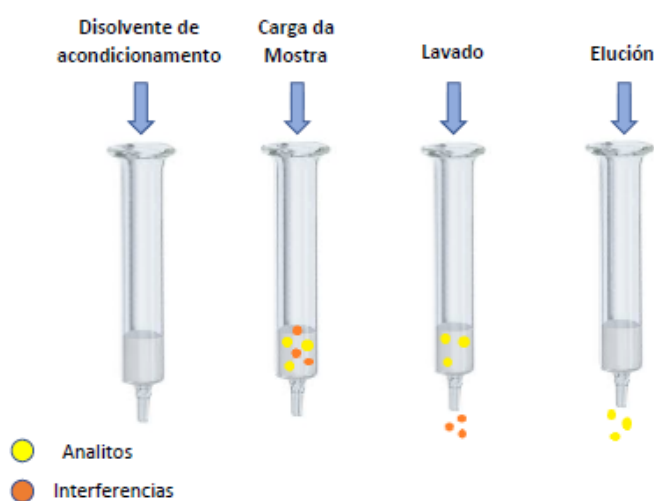
As mostras coas que se van traballar son de auga residual. Estas, ademais de conter aos distintos analitos, tamén conteñen outros numerosos compostos, dos cales moitos están en maiores concentracións. Polo tanto, é necesario facer unha preconcentración e purificación da mostra, para eliminar as interferencias e intentar aillar os analitos. Este proceso realízase mediante unha extracción en fase sólida (SPE).

A SPE é unha técnica que emprega membranas, columnas, xiringas ou cartuchos que conteñen nunha fase sólida extractora ou adsorbente. O adsorbente é o encargado de reter os analitos mediante diferentes interaccións [31].

A SPE consta, polo xeral, de 4 etapas no seu uso:

1. Acondicionamento: ocorre antes de facer pasar a mostra pola xiringa. Pásanse disolventes para activar os grupos funcionais do adsorbente, e así mellorar o rendemento da futura extracción. Ademais, serve para limpar o material.

2. Carga da mostra: aplicando presión positiva ou negativa para acelerar o proceso. Deséxase que todo o analito quede retido, mentres que as interferencias se eliminen.
3. Lavado: paso de disolvente co obxectivo de eliminar restos de interferencias que quedaron do paso anterior. Este punto adoita de ir acompañado do secado da xiringa, para eliminar o disolvente.
4. Elución: último proceso da SPE, con outro disolvente máis afín ao analito có adsorbente, pásase para eluir as substancias de interese do adsorbente. Aquí intentarase empregar a menor cantidade de disolvente posible.



**Figura 5:** Distintas etapas da SPE [31].

Na Figura 5 son mostradas graficamente as diferentes etapas que se adoitan levar a cabo nun proceso da SPE.

Segundo o analito que se vai extraer, pódese empregar unha fase adsorbente distinta en función das propiedades:

- Fase normal: fase adsorbente hidrofílica, retén compostos polares. Ideal nos casos nos que o analito está nun disolvente apolar, como por exemplo, hexano. A elución terá que levarse a cabo cun disolvente polar.
- Fase inversa: fase adsorbente hidrofóbica, retén compostos de baixa polaridade. Emprégase cando temos compostos nun disolvente polar, como a auga. A elución faise cun disolvente apolar.
- Fase de intercambio iónico: fase adsorbente con grupos intercambiadores aniónicos (con grupos de cargas positivas para atraer anións) ou catiónicos (con moléculas con grupos de cargas negativas para atraer catións). A atracción é electrostática.
- Fase mixta: fase adsorbente combina fase inversa e intercambio iónico.

Os cartuchos que se empregaron neste traballo foron Oasis WAX, pero existen outros cartuchos que reteñen os analitos por diferentes mecanismos de adsorción. Entre eles, atópanse:

- Oasis HLB: combina dous monómeros distintos, formando poli(N-vinilpirrolidona-divinilbenceno), que lle confire unha dobre natureza hidrofílica-lipofílica. Este polímero non contén grupos atraccións específicos, polo tanto, as interaccións cos analitos son por fase inversa. Poden interaccionar con compostos polares e con apolares.
- Oasis MAX: de fase mixta, combina a fase do Oasis HLB con aminas cuaternarias (intercambiador aniónico forte).
- Oasis WAX: de fase mixta, combina a fase do Oasis HLB con grupos piperazina (intercambiador aniónico débil). Ao conter unha base débil, poderá cambiar a súa selectividade co pH, ademais de ter menos capacidade de intercambio. Permite que a elución sexa en condicións máis fáciles.

## **12. Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem**

### *12.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución*

A cromatografía de líquidos é unha técnica moi empregada para a separación de analitos que estean presentes nunha mostra.

Esta técnica consiste nunha fase estacionaria (situada no interior dunha columna), que adoita ser unha serie de partículas, pola que pasa unha fase móbil (un líquido con propiedades químicas distintas á fase estacionaria), que flúe cos analitos. En función da afinidade destes pola fase estacionaria, quedan máis ou menos retidas na columna [32]. Así, se por exemplo, hai unha fase estacionaria de alumina, que é polar, a fase móbil apolar cos analitos correrá pola columna. Con ela, sairá antes unha molécula apolar, xa que non interaccionará tanto coa alumina, ca unha polar, moi retida á fase estacionaria. Se a fase estacionaria consiste en partículas de sílice con moléculas de octadecilsilano (18 carbonos, apolar), as moléculas apolares quedarían máis retidas na fase estacionaria, e coa fase móbil polar eluirán antes os compostos polares.

Ademais, en función do tipo de fase estacionaria, a separación pode ocorrer por diferentes mecanismos: adsorción (se se trata dun sólido), reparto (se a fase estacionaria é un líquido ou unha fase ligada), por intercambio iónico (con ións) e por exclusión molecular (con partículas que separan en función do tamaño) [32].

A cromatografía de líquidos de alta resolución (*HighPerformanceLiquidChromatography*, HPLC) xurdiu ao conseguir traballar con tamaños de partícula de aproximadamente 3-5  $\mu\text{m}$ , e cunha presión de 6.000 psi. Posteriormente, en 2004 avanzouse cara a cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (*Ultra HighPerformanceLiquidChromatography*, UHPLC), onde se traballa con partículas de diámetro inferior a 2  $\mu\text{m}$ , e poder traballar a presións de ata 15.000 psi.

Así, coa UHPLC púidose traballar con fluxos máis altos, polo que o tempo de análise era menor. Ademais, mellora a sensibilidade e a resolución cromatográfica (separacións moi eficaces).

### 12.2. Interfase de acoplamento LC-MS

O espectrómetro de masas (MS) separa os ións en estado gasoso en función da súa relación masa/carga ( $m/z$ ). Despois, os ións van ao detector, onde analiza os resultados.

Un espectrómetro de masas consta das seguintes partes [33]:

- Fonte de ións gasosos: ocorre a ionización dos compostos mediante enerxía térmica ou eléctrica.
- Analizador de masas: onde se clasifican os ións xerados na fonte en función da súa relación  $m/z$ . Tipos de analizadores:
  - Trampas de ións: cun eléctrodo anular e dous colectores. En función das voltaxes aplicadas, ións con determinada  $m/z$  xiran con radiofrecuencias estables e son colectados.
  - Tempo de voo: os ións son acelerados en función dun campo eléctrico a través dun tubo.
  - Cuadrupolo: descrito no Apartado 2.12.3..
- Detector de ións: zona de detección e cuantificación dos ións que atravesaron o analizador.
- Procesador da sinal: tradución da sinal química en eléctrica, para xerar o espectro de masas.

Porén, da columna cromatográfica os analitos saen en disolución coa fase móbil, ademais de aínda non estar ionizados nos correspondentes ións. É necesario, por tanto unha interfase, para evaporar o disolvente, e ionizar os compostos. Hai distintas interfases, sendo as máis empregadas as de ionización a presión atmosférica (API). Dentro destas, existen a ionización por electrospray (ESI), a ionización química a presión atmosférica (APCI) e a fotoionización a presión atmosférica (APPI) [32].

Dentro delas, a ESI é a máis versátil e máis empregada. Consiste nunha fonte de ionización branda, que fragmenta pouco, e produce ións case sempre monocarga (no caso de moléculas pequenas). Isto permite que no espectro de masas só se vexa o pico do ión pseudomolecular (peso da molécula neutra que gaña ou perde un protón) e nalgúns outros casos outros fragmentos. Esta técnica ioniza e vaporiza ás moléculas a temperatura ambiente e a presión atmosférica.

A disolución que contén a mostra sae por un capilar de aceiro da columna, e aplícaselle unha diferenza de potencial de 3-4 KV entre o capilar e a entrada do MS. Aquí, os analitos quedan cargados formando gotas, e mediante un capilar de desolvatación, polo que se aplica un gas de solvatación, elimínase o disolvente, quedando cada vez gotas máis pequenas ademais de cargadas, ata que se obteñen as moléculas ionizadas en fase gas [32].

A análise do ESI pode realizarse xerando ionización positiva (ESI+, o ión pseudomolecular é un catión), ou ionización negativa (ESI-, o ión pseudomolecular ten carga negativa). Neste traballo empregouse ESI- debido ao carácter ácido dos BPs e os seus metabolitos.

### 12.3. Espectrometría de masas:anализador cuadrupolar

O espectrómetro de masas adícase a separar os ións en función da relación  $m/z$ . Os cuadrupolos permiten separar masas nominais, polo que son analizadores de espectrometría de masas de baixa resolución (LRMS).

O cuadrupolo consiste en catro barras cilíndricas metálicas, conectadas 2 a 2, cada unha coa que ten na súa fronte, establecendo unha corrente continua e un potencial alterno. Así, e variando as condicións, permítese que só os ións con esa determinada  $m/z$  atravesen as barras e cheguen ao detector [32].

Existen dous modos de traballo do cuadrupolo, que son descritos:

- Modo SCAN (Barrido de todos os ións presentes): a corrente é constante, pero varía o potencial. Mentres vai variando, van pasando ións de distintas masas (xa que adoitan ter todos a mesma carga), obténdose o espectro de masas do composto.
- Modo SIM (Selected Ion Monitoring, selección dun único ión): a corrente e o potencial son constantes, polo que só permite o avance dunha determinada  $m/z$ , producindo unha maior sensibilidade.

### 12.4. Espectrometría de masas en tándem: triplo cuadrupolo

A espectrometría de masas en tándem (MS/MS) baséase no acoplamento de varios espectrómetros de masas. Permite isto obter espectros dos ións preseleccionados e posteriormente fragmentados. Dentro desta familia atópase o espectrómetro de masas de triplo cuadrupolo (QqQ) [32].

O QqQ consta de tres cuadrupolos ordeados un detrás do outro. Os ións acelerados na interfase chegan ao primeiro cuadrupolo ( $Q_1$ ), que actúa coma filtro de masas, deixando pasar só uns ións con  $m/z$  predeterminado (ións precursores ou pai, consistente no ión molecular). O segundo ( $Q_2$ ) é a cela de colisión, onde os ións seleccionados no  $Q_1$  colisionan con moléculas dun gas inerte, producindo a súa fragmentación, e formándose ións produto. No terceiro ( $Q_3$ ), os ións produto son seleccionados ou escaneados e son analizados no detector.

O modo de traballo empregado neste traballo é o *Multiple Reaction Monitoring (MRM)*, no cal os dous cuadrupolos traballan en modo SIM. O  $Q_1$  selecciona unha determinada  $m/z$ , ocorre a fragmentación na cela de colisión e no  $Q_3$  monitorízase un ou varios produtos cunha determinada  $m/z$ . Este é o modo máis sensible e selectivo de todos.

### III. OBXECTIVOS E PLAN DE TRABALLO

Os bisfenois son habitualmente empregados para a síntese de plásticos, polo que poden ser atopados en abundantes produtos de consumo diario ou habitual. Nun principio, usábase maiormente o BPA, pero debido a súa potencial toxicidade e perigosidade, foi limitado o seu uso, e, polo tanto, a súa produción. Na Unión Europea e no Canadá, por exemplo, foi prohibido o seu uso na fabricación de produtos destinados a nenos. Substituíuse este composto polos seus análogos BPS e BPF, pero hai xa algúns estudos que os sinalan como compostos con propiedades (eco)toxicolóxicas semellantes ao BPA.

Os BPs, dentro do corpo humano, sofren reaccións, nas que se forman os metabolitos, sendo os máis importantes os BPs sulfatos, glucurónidos e os diconxugados. Polo tanto, é necesario desenvolver metodoloxías para obter datos sobre a exposición humana aos diferentes bisfenois, isto é, atopar un método analítico que permita cuantificar o consumo dos diferentes BPs.

Empréganse as augas residuais, mostras de ouriños dunha determinada poboación nun momento determinado, como estimador do consumo destes compostos. Os ouriños adoitan excretar principalmente os metabolitos, aínda que poden tamén ser eliminados os propios BPs en menores concentracións.

Así, o obxectivo deste traballo será desenvolver, validar e aplicar un método analítico para poder determinar e cuantificar os BPs e os metabolitos principais (Figuras 1 e 2) en auga residual, para avaliar a exposición á que está sometida a poboación de Santiago de Compostela.

No traballo levarase a cabo a optimización dos parámetros da HPLC acoplada ao MS/MS, e da SPE, ademais dunhas probas de estabilidade, para coñecer se a concentración dos BP e metabolitos se mantén constante co tempo en mostras de auga residual.

## IV. PARTE EXPERIMENTAL

### 1. *Material*

- ✓ Micropipetas automáticas de 2-20 $\mu$ L, 20-200 $\mu$ L, 100-1000 $\mu$ L, 0,5-5mL, Eppendorf.
- ✓ Puntas de plástico para diferentes micropipetas.
- ✓ Pipetas Pasteur.
- ✓ Equipo de purificación de agua MilliPore, tipo MilliQ gradiente A10.
- ✓ Equipo de filtración ao vacío.
- ✓ Electrodo de membrana de vidro para medida do pH Metrohm, modelo 654.
- ✓ Baño de ultrasonidos P-Selecta.
- ✓ Viais de vidro transparente de 2mL, Sugelabor.
- ✓ Viais de vidro ámbar de 4, 8 e 16mL, National Scientific.
- ✓ Insertos de 100 e 400 $\mu$ L, Agilent Technologies.
- ✓ Tapóns de rosca para viais normais e pre-slip, Phenomenex.
- ✓ Encapsuladores e desencapsuladores.
- ✓ Equipo de filtración a vacío.
- ✓ Estación de extracción en fase sólida, Supelco, modelo VisiPrep.
- ✓ Sistema de secado de cartuchos de SPE baixocorrente de nitróxeno, Supelco, modelo VisiDry.
- ✓ Sistema de concentración por corrente de nitróxeno, Turbo-Vap II Zymark, modelo ZW 8005.
- ✓ Sistema de concentración por corrente de nitróxeno, Mini-VapSupelco.
- ✓ Cartuchos de extracción en fase sólida de 150mg Oasis WAX, Waters.
- ✓ Filtros de microfibras de vidro de 0,7 $\mu$ L GF/A, Merk-Millipore.
- ✓ Filtros de celulosa mixta de 0,45 $\mu$ L, Merk-Millipore.
- ✓ Xiringas de 2mL BD, Discardit II.
- ✓ Filtro de xiringa de 0,2 $\mu$ m con membrana GHP, LifeScience.
- ✓ Material de vidro de uso habitual no laboratorio.
- ✓ Soportes, pinzas e noces.
- ✓ Filtro de xiringa de 0,2 $\mu$ m con membrana GHP, LifeScience.

### 2. *Reactivos e patróns*

- ✓ Metanol (MeOH), calidade gradiente para HPLC, Merck.
- ✓ Auga ultrapura Milli-Q.
- ✓ Acetonitrilo (ACN), calidade LC-MS, Fisher Scientific.
- ✓ Ácido acético glacial (HAc) 100%, Sigma Aldrich.
- ✓ Amoníaco (NH<sub>3</sub>), 25% en auga, Merck.
- ✓ NH<sub>3</sub> en MeOH (7N), Sigma Aldrich.
- ✓ Ácido fórmico (FA) 95-97%, Sigma Aldrich.
- ✓ Patróns individuais de BPA, BPS, BPF, BPA-G, BPA-DG, BPA-S, BPA-DS, BPS-S, BPS-G, BPF-S e BPF-G, Toronto Research Chemicals.
- ✓ Patróns individuais marcados isotópicamente de <sup>13</sup>C<sub>12</sub>BPA-G, BPS-d8, BPF-d10 e BPA-DS-d6, Toronto Research Chemicals.

### **3. Preparación de patróns**

Para realizar o proceso experimental, foi necesaria a preparación de disolucións patrón de concentración coñecida, para cada patrón de maneira individual, en MeOH.

Primeiro, pesouse arredor de 1 mg de cada composto (estado sólido en pó), engadíuselle 1mL de MeOH e homoxeneizouse, obtendo disolucións de 1000 µg/mL.

Despois, estas disolucións diluíronse a 100 µg/mL, e foron gardadas en conxelador. Estas foron empregadas máis tarde, sempre que se precisase dos patróns dos BP.

Tamén se prepararon catro misturas de compostos, de 1 µg/mL cada un. Un foi preparado a partir dos BPs, e o outro, a partir dos metabolitos. Os outros dous foron feitos a partir dos respectivos patróns internos.

### **4. Toma e preparación de mostra**

#### **4.1. Toma de mostra**

Tomáronse mostras integradas de 24 h, de augas residuais de influente (auga aínda non tratada), na estación depuradora de augas residuais (EDAR) en Santiago de Compostela, durante os días 11, 12, 13, 14 e 15 de marzo de 2020. Para a toma de mostra empregouse un mostrexador automático que traballa en modo proporcional ao tempo (tomando iguais volumes de auga, 120mL, en intervalos de tempo pequenos, cada 10 minutos). A mostra composta, da cal se tomaron uns 2500 mL, era recollida nunha botella de cristal ámbar e mandada ao laboratorio para a análise.

Ademais tomáronse mostras de auga residual (influyente) de maneira puntual para realizar os ensaios de estabilidade.

#### **4.2. Preparación de mostra**

A mostra diaria era filtrada ao baleiro dúas veces, primeiro con filtros de microfibras de vidro de 0,7 µm GF/A (Merk-Millipore), e segundo con filtros de celulosa mixta de 0,45 µm (Merk-Millipore). Coas filtracións, conseguíuse eliminar o material particulado das augas. O filtrado era repartido a catro viais de 100 mL, selados e gardados no conxelador.

### **5. Proceso SPE**

Todo o proceso de probas da parte da extracción en fase sólida (SPE) quedou sen rematar, xa que coincidiu o comezo das probas coa aplicación do Estado de Alarma debido ao Covid-19. A continuación, será detallado o primeiro proceso completo que se levou a cabo da SPE, paso por paso. Realizáronse 3 réplicas e 2 brancos.

Adiciónáronse 50  $\mu\text{L}$  dos patróns dos BPs, dos metabolitos e dos patróns internos de tódolos compostos (0,5 ng/mL de cada un) en 100 mL de auga MQ.

Os cartuchos Oasis WAX 150 mg foron acondicionados previamente, facendo pasar a través deles unha fracción de 6 mL de MeOH e dúas fraccións de 6 mL de auga MQ, a segunda con ácido fórmico 2%, e deixándoas pasar por gravidade. Con este paso completado, foron cargados os cartuchos coa auga MQ que contiña os analitos, e aplicando baleiro.

Antes da etapa de elución, fíxose un secado dos cartuchos baixo corrente de nitróxeno (VisiDry, de Supelco) durante 30 minutos. Para a elución, foron colocados os cartuchos en posición vertical, suxeitos por pinzas, e fixéronse pasar por eles unha fracción de 10 mL de MeOH e dúas fraccións de 10 mL de MeOH con 5%  $\text{NH}_3$ . Coa primeira fracción, buscábase eliminar as posibles interferencias e outros compostos adsorbidos no cartucho que non fosen retidos polo mecanismo de intercambio aniónico. As outras dúas fraccións empregáronse para a elución dos analitos.

O extracto foi recollido e evaporado inicialmente no Turbo-Vap II (Zymark), ata aproximadamente 0,5 mL. Finalmente, pasouse este extracto a un vial de 2 mL onde foi concentrado no sistema MiniVap (Supelco). Despois disto, os analitos foron reconstituídos en 100  $\mu\text{L}$  de disolvente (ACN:MQ 95:5), e pasados a insertos para a súa medición.

O obxectivo deste proceso era analizar se estas eran as condicións idóneas para a preconcentración dos analitos, xa que en mostras reais (augas residuais), esta familia de compostos pode atoparse en concentracións traza, e isto dificulta a súa posible cuantificación.

## **6. Instrumentación e análise mediante LC-MS**

### **6.1. Compoñentes do UHPLC-MS/MS**

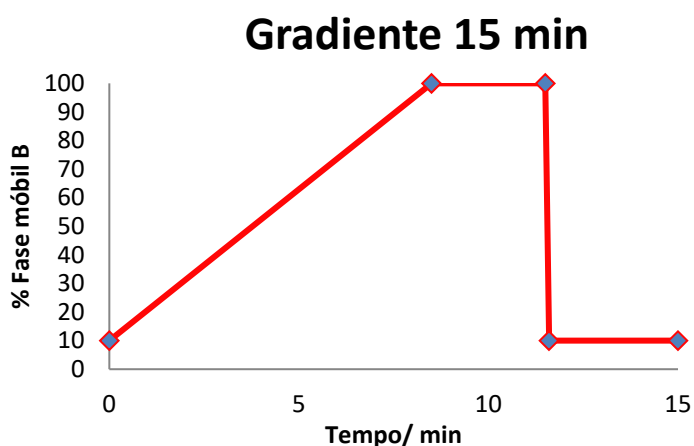
Para a separación e detección dos compostos a estudar neste proxecto empregouse un cromatógrafo de líquidos de ultra-resolución (UHPLC) WatersAcquity, acoplado a un espectrómetro de masas en tándem (MS/MS) con analizador triplo cuadrupolo (QqQ), modelo QqXevo TQD de Waters.

### **6.2. Condicións UHPLC-MS/MS**

Despois de analizar distintas condicións, cambiando fases móbiles, gradientes cromatográficos e columnas, decidiuse empregar as condicións detalladas a continuación.

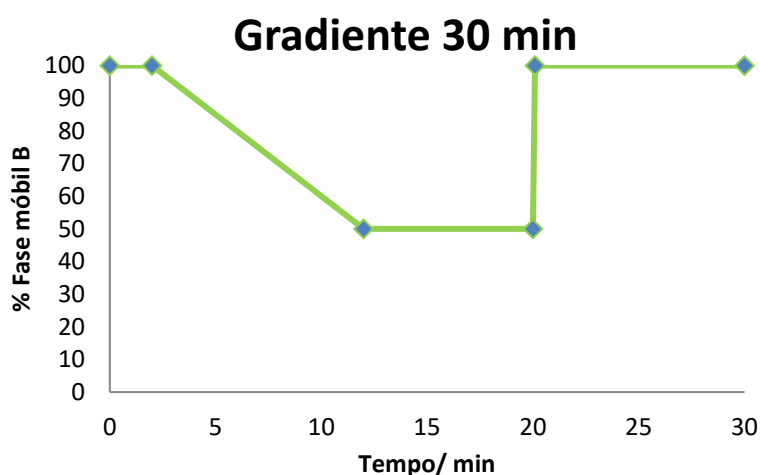
A separación cromatográfica dos BP levouse a cabo nunha columna Luna<sup>®</sup> Omega Polar C18 (50 $\times$ 2,1 mm de Diámetro Interno, D.I., tamaño de partícula 1,6  $\mu\text{m}$ ) de Phenomenex. Trátase dunha columna UHPLC de fase inversa, modificada na superficie con grupos polares. A columna mantívose a 45°C durante a separación. En condicións óptimas usouse un sistema de dobre eluínte formado por unha disolución de acetato amónico 5mM en auga MQ (fase móbil A, FMA) e

acetato amónico 5 mM en MeOH (fase móbil B, FMB). O fluxo de fase móbil foi de 0,4 mL/min e o volume de inxección, 2  $\mu$ L. O gradiente, representado na Figura 6, ten unha duración de 15 min:



**Figura 6:** Gradiente de fases móbiles para a determinación dos BPs.

A separación cromatográfica dos metabolitos dos BP levouse a cabo nunha columna Luna HILIC Diol (100 $\times$ 2 mm D.I., tamaño de partícula 3  $\mu$ m) de Phenomenex. Trátase dunha columna HPLC de modo HILIC, formada por partículas porosas con grupos diol na súa superficie (ideal debido á polaridade dos metabolitos). A columna termostatizouse tamén a 45°C. En condicións óptimas usouse, igual que para os BP, un sistema de dobre eluínte formado por unha fase móbil A auga MQ:ACN 95:5 (FMA) e unha fase móbil BACN:auga MQ 95:5 (FMB), tampoadas a pH=4 con formiato amónico. O fluxo de fase móbil foi de 0,2 mL/min, e o volume de inxección foi de 10  $\mu$ L. O gradiente, representado na Figura 7, ten unha duración total de 30 min:



**Figura 7:** Gradiente de fases móbiles para a determinación dos metabolitos dos BP.

A ionización dos analitos no MS/MS levouse a cabo en modo negativo. Os parámetros da fonte ESI aparecen recollidos na Táboa 3, empregándose N<sub>2</sub> como gas de desolvatación:

**Táboa 3:** Parámetros da ESI.

Parámetros	Valor
Voltaxe do capilar	3000 V
Fluxo do gas de desolvatación	600 L/h
Temperatura de desolvatación	450°C
Fluxo do gas de cono	10 L/h

O espectrómetro de masas de QqQ operou en modo *multiple reaction monitoring* (MRM) empregando Ar como gas de colisión. Para a optimización das condicións de determinación para os analitos do estudo fíxose unha análise de cada patrón individual de 5 µg/mL mediante inxección sen columna. Para cada composto elixiuse unha transición de cuantificación (Q1, a que aportaba unha maior sinal) e unha ou dúas transicións de cualificación (Q2 e Q3, para asegurarse de que este será o composto que se detecta, xa que poden existir interferencias en algunha transición). Tamén se seleccionou para cada BP o voltaxe de cono (CV), o voltaxe que aporta unha maior ionización no ión precursor  $[M-H]^+$  e a enerxía de colisión (CE), que sexa óptima para a fragmentación do ión precursor nos correspondentes produtos. Na Táboa 4 aparecen as condicións óptimas do ESI-MS/MS, ademais dos tempos de retención ( $t_R$ ) para cada analito ou patrón interno:

**Táboa 4:** Condicións óptimas ESI-MS/MS.

Composto	m/z	CV /V	Q1 /m/z	CE /eV	Q2 /m/z	CE /eV	Q3 /m/z	CE /eV	$t_R$ /min	IS asociado
BPA	227	43	133	29	211	24	93	23	5,09	BPA-d6
BPA-S	307	51	227	23	212	30	133	35	1,33	BPA-S-d6
BPA-DS	387	50	307	19	227	30	133	46	1,98	BPA-DS-d6
BPA-G	403	37	113	14	227	27	175	9	7,73	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -BPA-G
BPA-DG	579	44	403	18	133	29	227	38	9,76	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -BPA-G
BPS	249	50	108	28	92	34	156	20	3,15	BPS-d8
BPS-S	329	34	249	13	108	40	156	28	1,47	BPA-S-d6
BPS-G	425	33	249	23	113	16	108	45	8,20	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -BPA-G
BPF	199	42	93	21	105	20	77	23	4,29	BPF-d10
BPF-S	279	43	199	22	93	40	105	36	1,51	BPA-S-d6
BPF-G	375	38	113	14	199	33	175	10	7,93	<sup>13</sup> C <sub>12</sub> -BPA-G

<b>BPA-d6</b>	233	43	138	29	215	24	93	23	5,06
<b>BPA-S-d6</b>	313	20	233	23	215	31			1,27
<b>BPA-DS-d6</b>	393	31	313	11	233	29	138	40	1,96
<b><sup>13</sup>C<sub>12</sub>-BPA-G</b>	415	38	113	17	239	26	139	50	7,73
<b>BPS-d8</b>	257	50	112	26	96	27	160	21	3,11
<b>BPF-d10</b>	209	54	97	23	82	25	110	22	4,22

Tamén na Táboa 4 recóllense os patróns internos (*internal standard*, IS), que son empregados para reducir e corrixir erros de posibles interferencias polo efecto matriz, no tratamento de mostrou para evitar a deriva do equipo. Os patróns internos son BP/metabolitos marcados con <sup>2</sup>H ou con <sup>13</sup>C. Non hai patróns internos para cada composto, polo que a cada analito asignóuselle un que for estruturalmente similar (como aparece reflexado na columna do final).

### 7. Probas de estabilidade

Realizáronse probas de estabilidade dos diferentes BP e metabolitos, co obxectivo de confirmar que os BPs non se degradaban nos metabolitos ou noutros compostos, e que os metabolitos fosen estables co tempo nas augas residuais e que non se degradasen ou se desconxugasen na auga para volver a formar BP. Así, nestas probas, avaliarase se os resultados que se obteñan nas medicións das diferentes mostras reflexan concentracións fiables e representativas dos distintos BP, e se estes poden empregarse para biomarcadores. Isto ocorrerá se as concentracións dos analitos nas probas de estabilidade se manteñen constantes co tempo.

A primeira proba realizouse para estimar a estabilidade dos BP en augas residuais. Tomáronse 6 réplicas (en viais de vidro ámbar) de 9,5 mL de auga residual de influente, e engadíuselle a cada unha 500 ng/mL do patrón de BP. Das 6 réplicas 3 mantivéronse a temperatura ambiente e as outras 3 gardáronse na neveira (a 4°C). Decada réplica, tomouse unha alícuota de 1 mL, e era filtrada cun filtro hidrofílico (LifeScience). Desta alícuota, eran collidos 500 µL e pasados a un vial, onde se lle engadiron 500 ng/mL dos patróns internos dos BP. O contido no vial homoxeneizouse, transferiuse a un inserto de 400 µL, etiquetouse e foi gardado no conxelador. Este procedemento repetiuse a tempos 0 h, 1,5 h, 3 h, 5 h, 8 h, 24 h, 24 h e 48 h.

Despois fíxose unha proba de estabilidade dos metabolitos dos BP en augas empregando un procedemento análogo ao seguido para os BP. As diferenzas foron que se engadiron 500 ng/mL de metabolitos, e xa no vial, adicionábaselle 500 ng/mL de patróns internos, tanto dos metabolitos coma dos BP.

## V. RESULTADOS E DISCUSIÓN

### 1. Optimización MS/MS

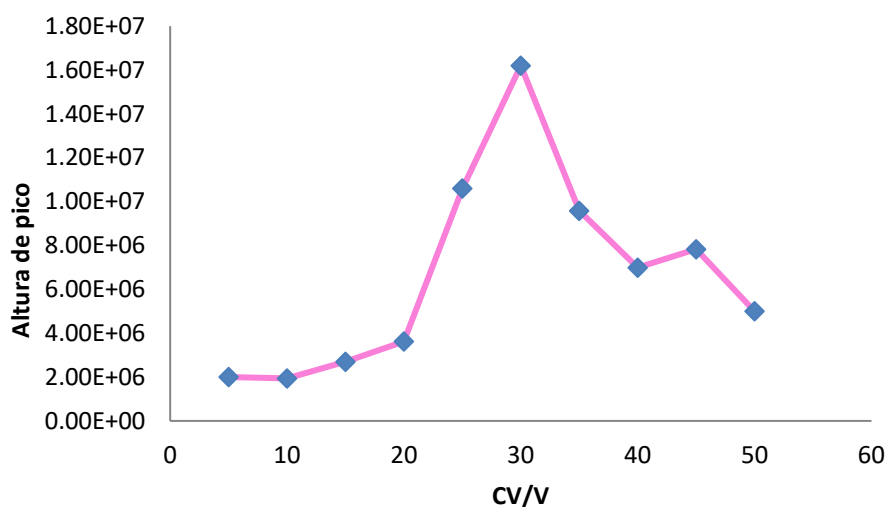
A optimización das condicións de determinación no MS/MS realizouse mediante a inxección de patróns individuais de 5 µg/mL de cada un dos compostos. Estas inxeccións foron feitas en fluxo sen columna cromatográfica, e empregando como fase móbil unha disolución de auga MQ con 5 mM NH<sub>4</sub>OAc (FMA) e MeOH con 5 mM NH<sub>4</sub>OAc (FMB).

Fíxose isto en primeiro lugar co obxectivo de determinar o espectro de masas de cada composto, para así coñecer o ión precursor [M-H]<sup>-</sup> e os ións produtos máis importantes (e así coñecer algunhas das transicións características para a súa detección). A ionización levouse a cabo aplicando unha voltaxe negativa, ESI<sup>-</sup>, no que se producían ións con carga negativa, tras perda dun H.

En primeiro lugar, seleccionouse o voltaxe de cono (CV) que producía unha resposta maior, é dicir, o voltaxe que conseguía a maior eficacia de ionización do analito, sen excesiva fragmentación na fonte. O CV é característico para cada composto, por iso foi necesaria a inxección dos analitos por separado. Esta ionización ocorre na interfase, na saída da parte cromatográfica, antes do primeiro cuadrupolo do MS/MS.

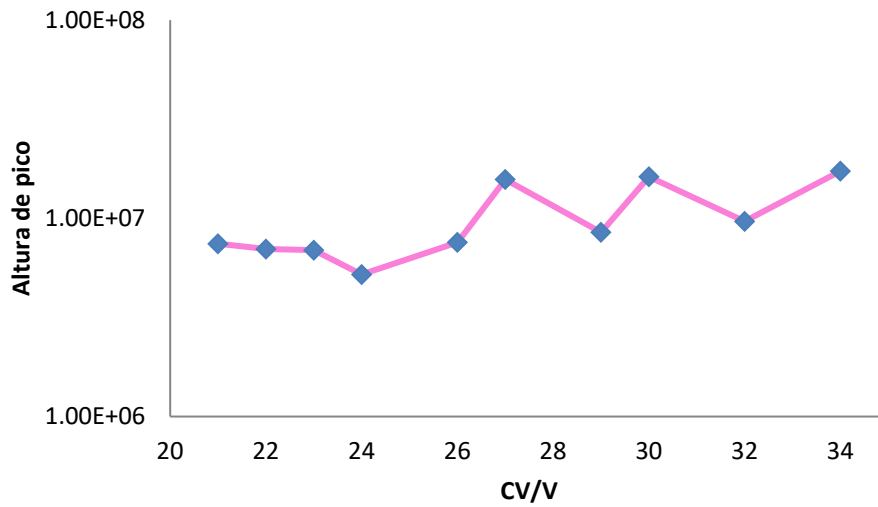
Despois de optimizar o CV, determináronse as enerxías de colisión (CE) que producían unha maior resposta dos ións fragmento formados no segundo cuadrupolo. A CE tamén é característica para cada transición, polo que os distintos ións produto poden fragmentarse mellor a enerxías distintas.

Como exemplo, resúmense algunhas das probas que se fixeron co BPS-S para a súa optimización das condicións experimentais MS/MS nas Figuras 8-10:



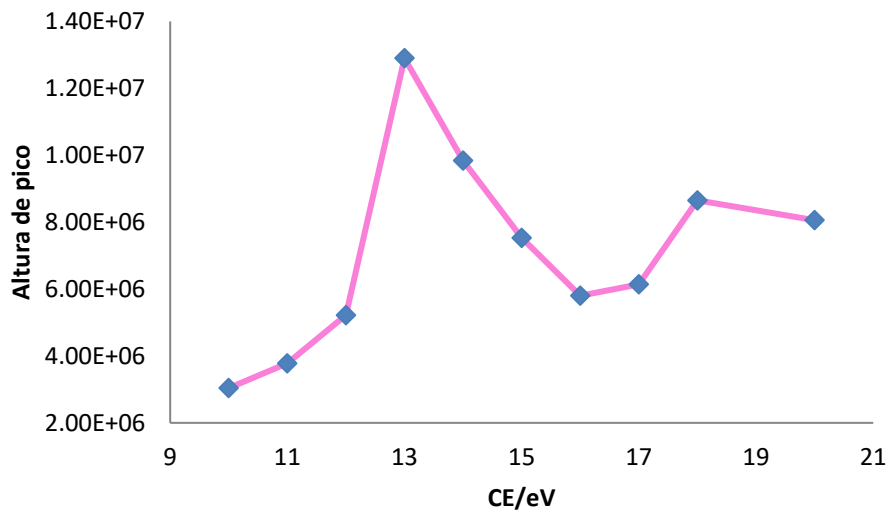
**Figura 8:** Optimización inicial do CV para BPS-S con  $m/z=329$ .

Como se ve na Figura 8, no BPS-S a maior resposta dáse cun CV de arredor de 30 V. Polo tanto, para completar a optimización do CV, foron seleccionados os voltaxes de entre 25 e 35 V, para comparar cal é realmente o valor que dá unha altura de pico máis alta (Figura 9).



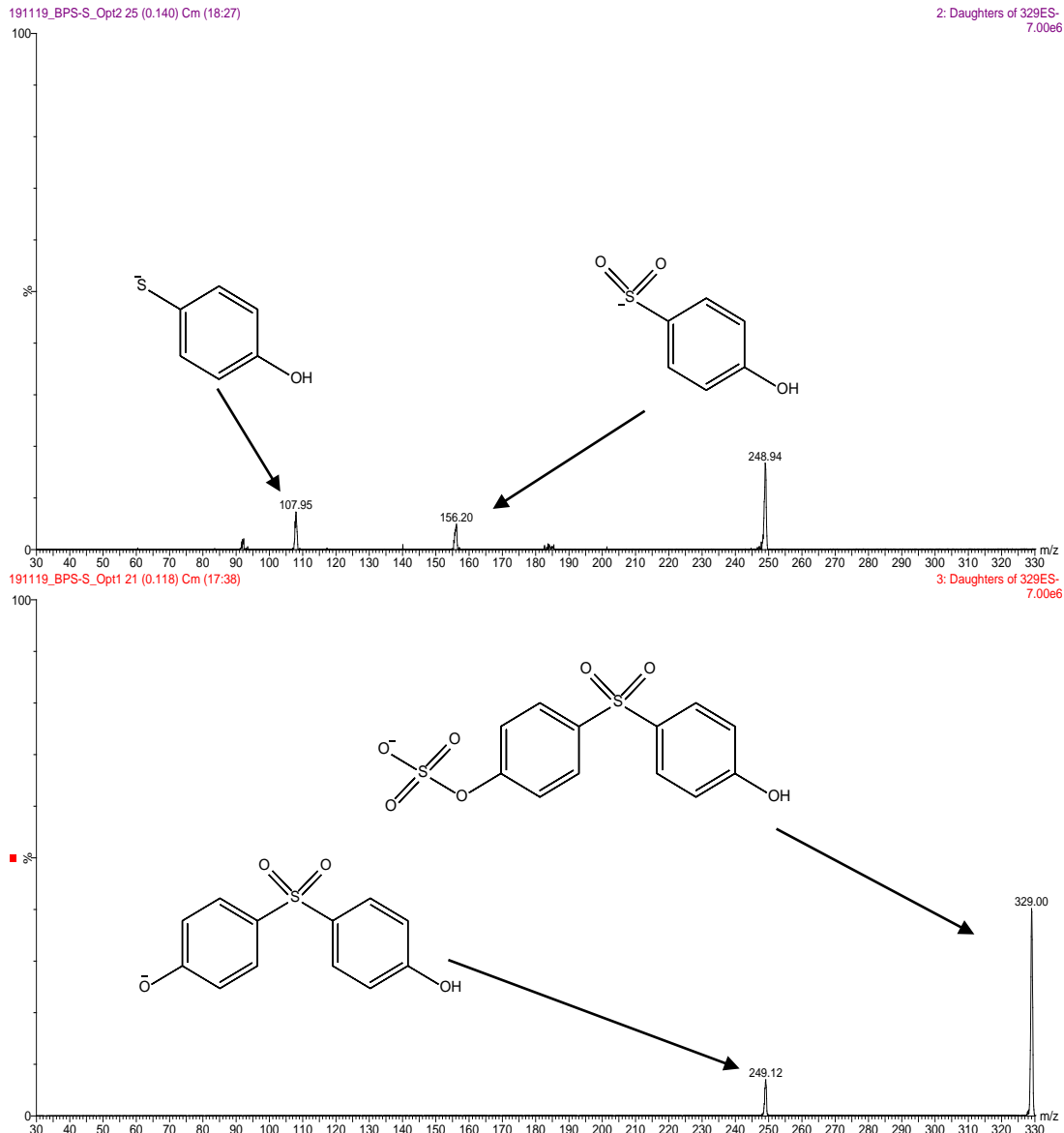
**Figura 9:** Optimización final do CV para BPS-S con  $m/z=329$ .

Como se aprecia na devandita Figura 9 a maior eficiencia de ionización do BPS-S ocorre dende 27V ata 34 V, que son os valores máis altos que aparecen representados na figura, aínda que sen diferenzas significativas.



**Figura 10:** Optimización da CE para a transición  $m/z=329 \rightarrow m/z=249$  do BPS-S.

Para rematar de optimizar o BPS-S, determináronse as CE que producisen unha maior sinal de cada un dos ións produto máis intensos. Na Figura 10, obsérvase as enerxías que se probaron para a transición do ión precursor ao ión produto cuantificador do BPS-S ( $m/z=329 \rightarrow m/z=249$ ). A fragmentación óptima deuse a 13 eV.



**Figura11:** Espectros MS/MS do BPS-S empregando como CE: 5 eV (abaixo) e 25 eV (arriba).

Na Figura 11 móstrase o espectro MS/MS a 5 eV (abaixo) e a 25 eV (arriba) do BPS-S. Cunha enerxía baixa, como mostra o espectro de debaixo, o composto fragmenta practicamente para dar só o ión fragmento cuantificador, de  $m/z=249$  e que corresponde á perda de  $\text{SO}_3$ . Tamén neste espectro se pode ver o ión precursor de  $m/z=329$ . Para conseguir a fragmentación do composto noutros fragmentos (noutros ións, entre eles os que se escolleron como ións cualificadores), como ocorreu no espectro de arriba, é necesaria unha enerxía maior. Neste caso a 25 eV obtéñense tamén os ións  $m/z=156$  e  $m/z=108$ , que corresponden aos ións fragmentos tras perda do grupo fenilo co grupo sulfato e dese mesmo grupo xunto cunha molécula de  $\text{O}_2$ , respectivamente. Na Táboa 6 aparecen os ións escollidos para a detección do BPS-S.

## 2. Optimización da separación cromatográfica

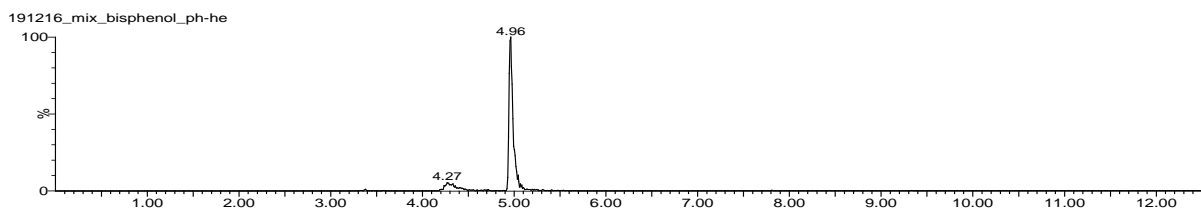
Fíxose unha optimización da separación cromatográfica coobxectivo de atopar a columna e os parámetros da cromatografía que permitisen as mellores condicións para a separación dos compostos a estudar.

Para a elección da columna cromatográfica, realizouse un estudo con diversas columnas. Inxectáronse os patróns individuais de 5 µg/mL, aplicando as condicións óptimas de MS/MS. Así, probáronse diferentes columnas e modos cromatográficos.

### 2.1. Cromatografía de fase inversa

Inicialmente empregouse a columna KinetexPhenyl-Hexyl (150 ×2,1 mm D.I., tamaño de partícula de 1,7 µm) de Phenomenex, que é unha columna UHPLC "core-shell" de fase inversa, constituída por partículas sólidas de superficie porosa, o que evita en gran medida o ensanchamento dos picos cromatográficos.

Estudáronse as condicións ideais para esta columna, cambiando o volume de inxección e o fluxo da fase móbil. Ao final, usouse o gradiente cromatográfico que aparece na Figura 6, de duración 15 min, volume de inxección 1 µL e fluxo de 0,35 mL/min. As fases móbiles foron auga MQ con 5mM NH<sub>4</sub>OAc (FMA) e MeOH con 5mM NH<sub>4</sub>OAc (FMB). Os resultados en xeral non foron satisfactorios. O BP que produciu un pico máis estreito, definido e cunha relación sinal/ruído (S/R) mellor foi o BPS, mostrado na Figura 12 (os outros BP apareceron cunha altura de pico menor).



**Figura 12:** Cromatograma do BPS para a columna KinetexPhenyl-Hexyl.

Non obstante, os metabolitos (trátanse de compostos máis polares) non produciron resultados satisfactorios. Así, o BPA-DS non produciu pico cromatográfico. Os demais sulfatos presentaban picos moi anchos, ademais de aparecer picos con "fronting" (cola frontal, debido á inmiscibilidade dos compostos nalgunha das fases móbiles). Os glucurónidos, ademais, presentaban unha relación S/R moi baixa, o que facía que case non se distinguise o composto no cromatograma.

Para mellorar a forma dos picos e evitar o "fronting", fíxose outra inxección dos compostos. Inxectáronse 1 µL dos patróns individuais, empregando o modo "autoaddition", que mestura 1 µL con 8 µL da fase móbil A para reducir problemas debido ao disolvente de inxección. Os resultados foron similares, pero diminuíu o "fronting". Na Figura 13 obsérvanse os cromatogramas do BPA-DS e BPA-G con esta columna e con "autoaddition". Melloraron algo os resultados para glucurónidos, pero seguiron sendo en xeral insatisfactorio.

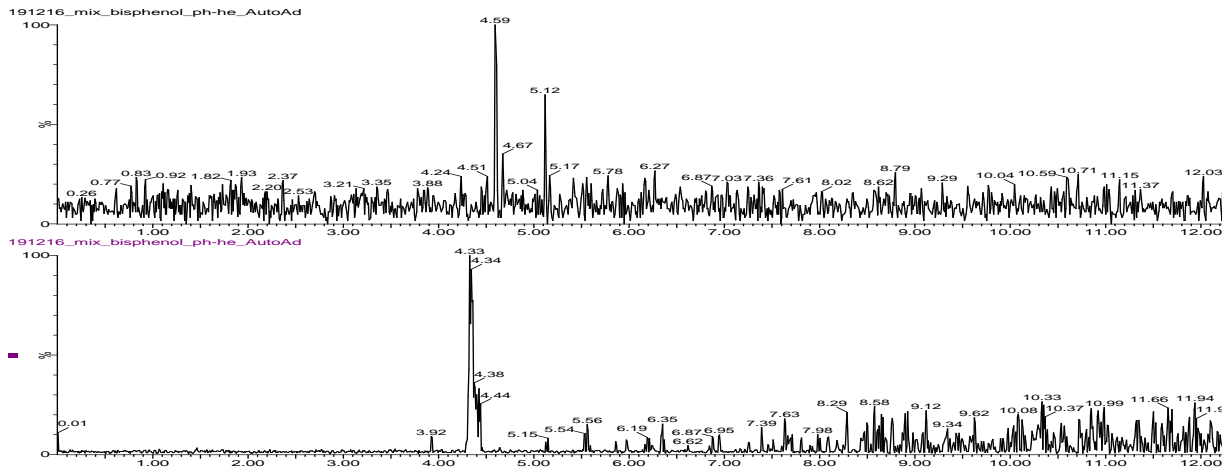


Figura 13: Cromatogramas do BPA-DS (arriba) e BPA-G (abaixo) para a columna KinetexPhenyl-Hexyl.

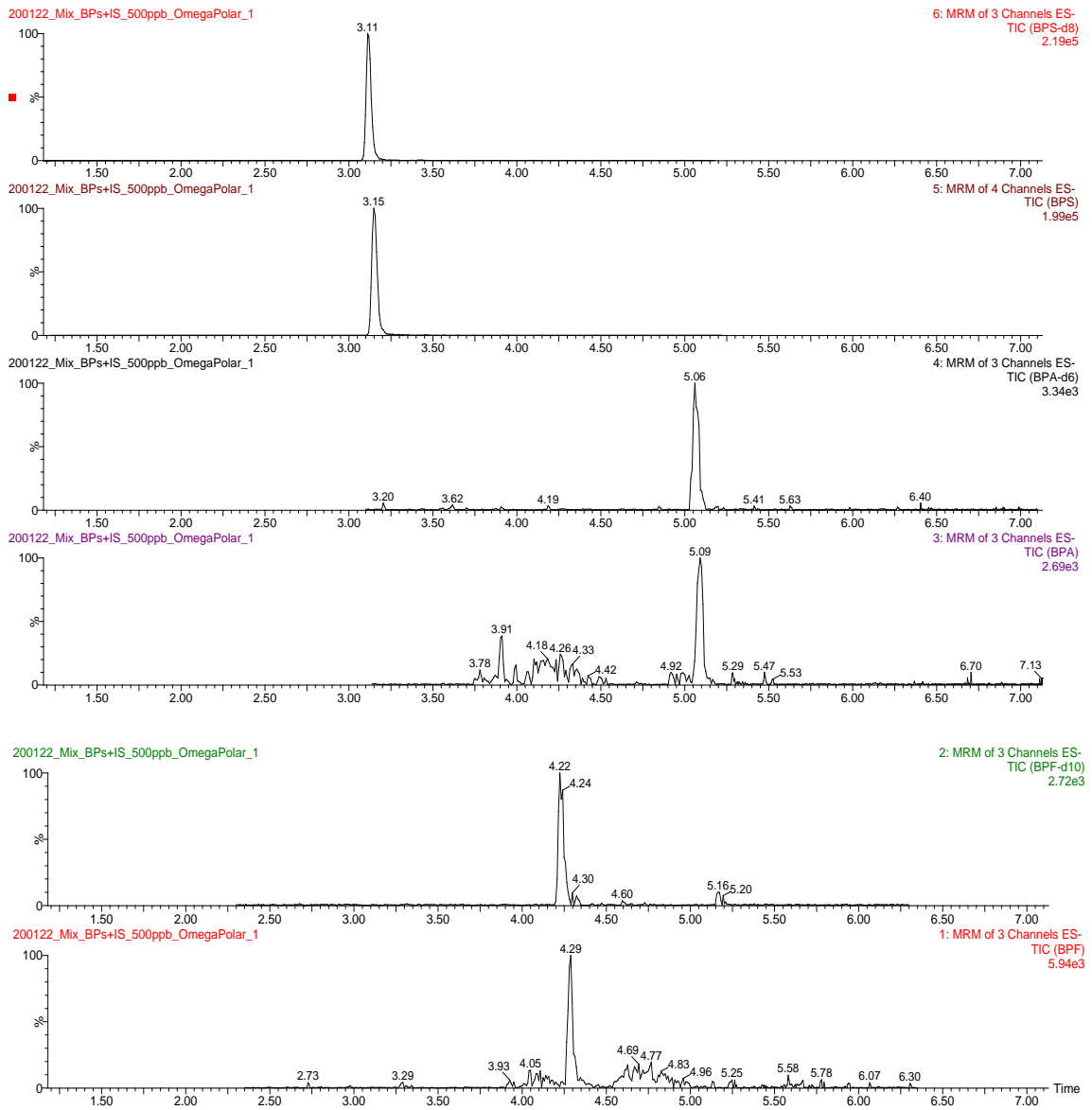


Figura 14: Cromatogramas dos BPen condicións óptimas, obtidos coa columna LunaOmega Polar.

A continuación probouse unha columna Luna® Omega Polar (50x2,1 mm D.I., tamaño de partícula de 1,6µm) de Phenomenex. Trátase dunha columna UHPLC de fase inversa, que na superficie das partículas contén grupos polares. Esta característica permite, a priori, que a columna presente unha maior afinidade polos metabolitos que a anterior columna. Tamén, nun principio, esta columna é adecuada para os BP.

Empregouse o gradiente cromatográfico descrito na Figura 6, e as condicións descritas do Apartado 4.6.2.. Para os BP, esta columna deu resultados moi bos. Para os metabolitos, por outra banda, os resultados foron similares aos obtidos coa columna KinetexPhenylHexyl. BPF-G, BPS-S e BPF-S presentaron picos algo máis estreitos, pero en xeral, non se obtiveron resultados satisfactorios. Na Figura 14 móstranse os cromatogramas dos BP con esta columna nas condicións óptimas.

### 2.1. Cromatografía de modo mixto

A continuación, estudouse a columna Acclaim™ WAX-1 (50 ×3 mm D.I., tamaño de partícula 3 µm) de Thermo. Esta é unha columna HPLC que traballa en modo mixto, xa que combina unha fase estacionaria C18 (que confire as propiedades da fase inversa) cunha cadea alquílica con grupos amino cargados positivamente (intercambiadoraniónico débil). As especificacións da empresa subministradora non recomendaban o uso de MeOH, polo que se tivo que cambiar a ACN a fase móbil B e reconstituír os patróns en ACN. Ademais, indicaban que a columna era estable a pH dende 2,5 ata 7,5, polo que se empregou unha fase móbil C (FMC) de tampón acetato amónico 20 mM, pH=5,5. A fase móbil A era auga MQ:ACN 95:5 e a fase móbil B ACN:auga MQ 95:5.

Con esta columna fixéronse varias probas, cambiando as proporcións das distintas fases móbiles, gradiente de 22 min, cun volume de inxección de 2 µL e un fluxo de 0,3 mL/min. A primeira elución realizouse con 2% FMC, e modificando co tempo a relación FMA:FMB. Despois probouse cambiando a 4% e 6% FMC, pero os resultados foron similares.

Os BP aparecen ben definidos e con picos estreitos (excepto o BPF), mentres que os metabolitos seguen aparecendo con mala relación S/R. Nestas condicións de pH=5,5, os alcois dos BP atópanse protonados, polo que a súa separación será por fase inversa, como ocurría coas anteriores columnas, mentres que os metabolitos (sulfatos e glucurónidos, estes últimos con grupos carboxílicos), estarán total ou parcialmente en forma aniónica, actuando o mecanismo de intercambio aniónico. Na Figura 15, móstrase o resultado do BPF separado nesta columna. Foi o único BP que apareceu cunha altura de pico menor, ademais de ter bastante ruído, polo que se tivo que descartar finalmente o uso desta columna.

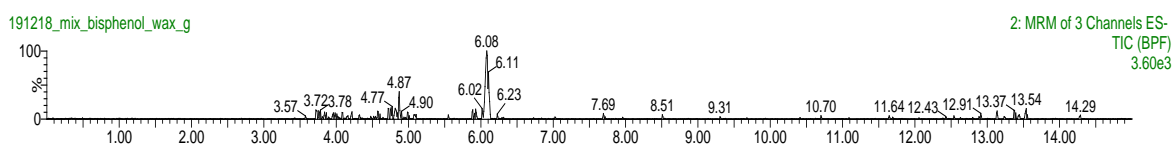


Figura 15: Cromatograma do BPF coa columna WAX-1.

### 2.2. Cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC)

A seguinte columna que se utilizou foi a HILIC EC 150/2 Nucleodur (150 ×2 mm D.I., tamaño de partícula 3 µm) de Macherey-Nagel. É unha columna HPLC para traballo en modo HILIC, polo que, a priori, resulta máis adecuada para a retención dos metabolitos.

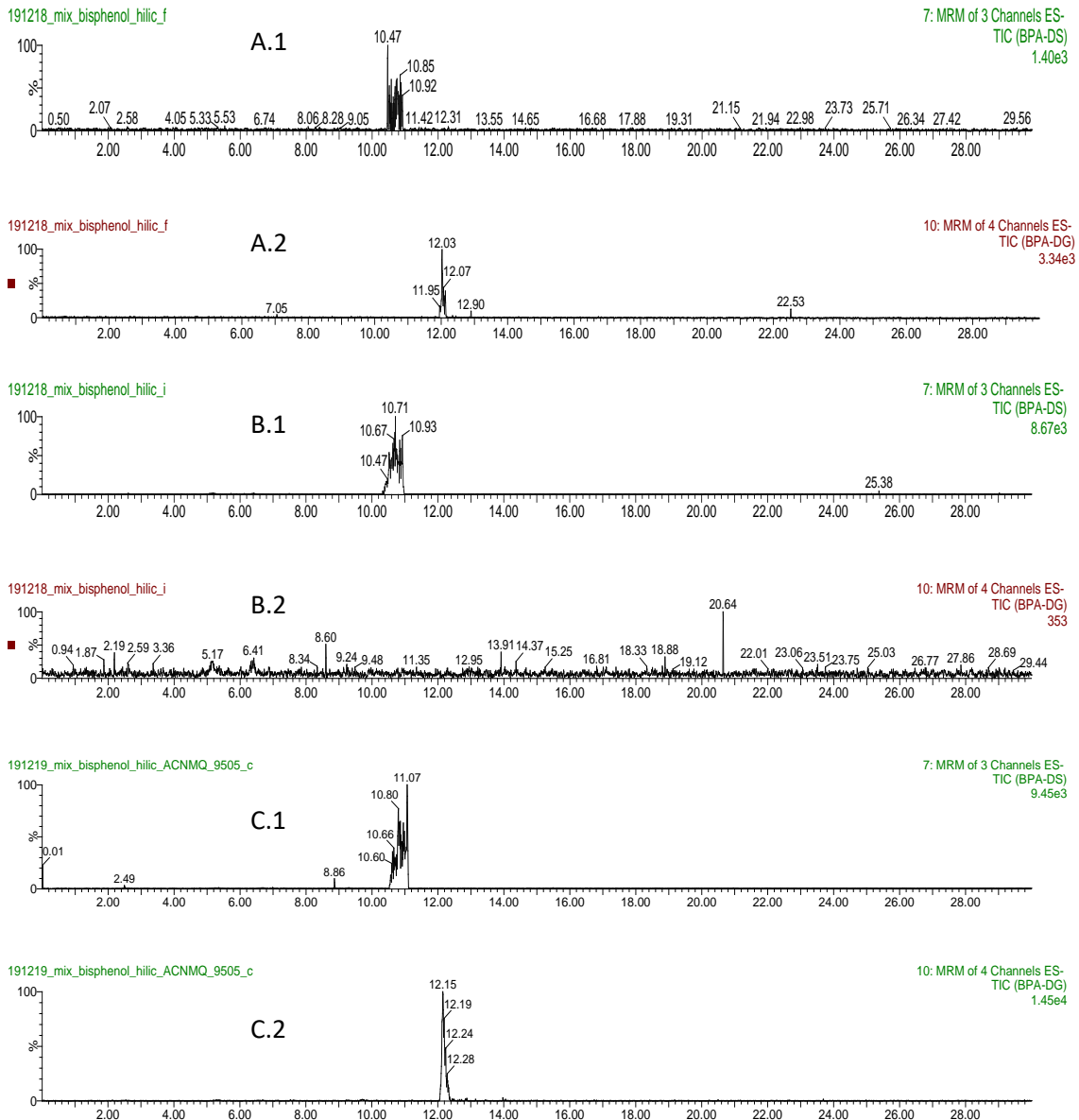
Na primeira proba con esta columna, empregouse un sistema de dobre eluente formado por unha disolución de auga MQ:ACN 95:5 (FMA) e ACN:auga MQ 95:5 (FMB), cun tampón de NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub> 5mM (pH=2,9). O volume de inxección foi 2 µL e o fluxo de 0,2 mL/min. O gradiente tivo duración de 30 min. Os resultados foron relativamente bos, pero aparecían os picos con "fronting", excepto para o BPA-DS, que aparecía cunha mala forma o pico, ademais de con pouca sensibilidade.

Para arranxar os problemas do BPA-DS, decidiuse reconstituír en ACN tódolos patróns (na primeira proba o disolvente dos patróns era o MeOH) e inxectar 10 µL, mantendo as mesmas fases móbiles. O BPA-DS saíu cun pico máis estreito, pero non apareceu o BPA-G, xa que se trata dun composto que non se dissolve ben en ACN.

Polo tanto, o BPA-DS e o BPA-G eran os compostos que presentaban comportamentos opostos, e realizáronse probas de disolvente de reconstitución. Preparáronse novos patróns con ACN:auga MQ en proporcións 50:50, 75:25 e 95:5. Os mellores resultados déronse nesta última proba. Non obstante, o BPA-DS seguiu aparecendo con "fronting".

Ao acadar o disolvente máis adecuado, realizáronse probas con distintos tampóns das fases móbiles. As primeiras foron con formiato amónico, a pH 3 e 4. Bos resultados para BPS e metabolitos (a excepción do BPS-DS). As seguintes foron con acetato amónico a pH 4, 6 e 7, pero os compostos apareceron con moito ruído. Polo tanto, os mellores resultados déronse co tampón de formiato amónico a pH=4. Ademais, estes resultados foron moi semellantes aos obtidos na primeira proba con esta columna, a que levaban as fases móbiles o tampón de NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub> 5mM (pH=2,9).

Na Figura 16 móstrase unha comparativa das diferentes probas realizadas con esta columna. O cromatograma A.1 corresponde ao BPA-DS, obtido nas condicións iniciais. Obtívose un pico pouco definido e con moito ruído, mentres que o BPA-DG (A.2) apareceu cun pico estreito. Non obstante, despois de reconstituír os patróns destes compostos en ACN, o BPA-DS (B.1) apareceu cun mellor pico, pero o diglucurónido (B.2) non foi detectado. Os cromatogramas C.1 e C.2 corresponden ao BPA-DS e ao BPA-DG, respectivamente, reconstituídos en ACN:auga MQ 95:5. Con este disolvent acadáronse os mellores resultados para os dous analitos conxuntamente. A pesar disto, o BPA-DS apareceu cun pico con moito ruído, como se observa no cromatograma, polo que se decidiu probar a inxectar os patróns noutra columna.



**Figura 16:** Cromatogramas do BPA-DS e BPA-DG para distintas condicións coa columna HILIC EC 150/2 Nucleodur. Os cromatogramas A foron os obtidos con MeOH coma disolvente, os B foron con ACN e os C foron con ACN:auga MQ 95:5.

A última columna que se probou foi unha Luna HILIC Diol (100×2 mm D.I., tamaño de partícula 3 μm) de Phenomenex. Trátase dunha columna HPLC para traballar en modo HILIC, cuxas partículas presentan grupos diol. As fases móbiles que se empregaron para esta columna foron as mesmas que para a columna anterior. Fixéronse distintas probas, modificando o tampón a pHs 3, 4 e 7. Os patróns preparáronse en ACN:auga MQ 95:5. Os mellores resultados apareceron a co tampón a pH=4. Elixéronse as condicións e o gradiente descritas no Apartado 4.6.2. e Figura 7, respectivamente. Con estas condicións obtéñense bos resultados en xeral, dándose por rematada a optimización dos metabolitos.

Para os BP comparáronse os resultados obtidos coas columnas Luna® Omega Polar e Acclaim™ WAX-1. Decidiuse empregar a primeira, debido aos problemas da segunda para o BPF (Figura 14).

## V. RESULTADOS E DISCUSIÓN

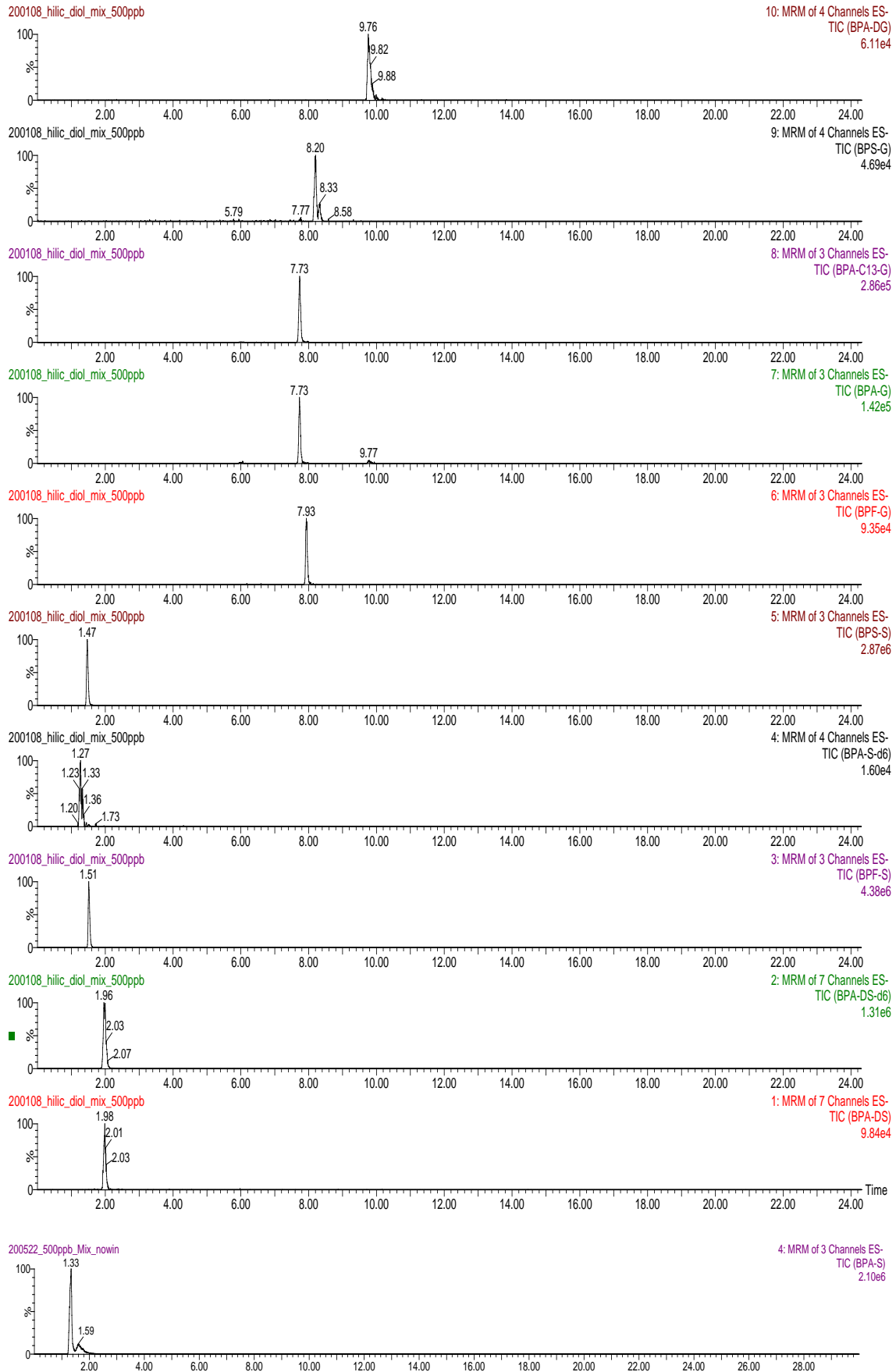


Figura 17: Cromatogramas dos metabolitos en condicións óptimas, obtidos coa columna Luna HILIC Diol.

Nas Figuras 14 (BPs) e 17 (metabolitos) obsérvanse os cromatogramas nas condicións finais para tódolos analitos.

### 3. Validación do método instrumental

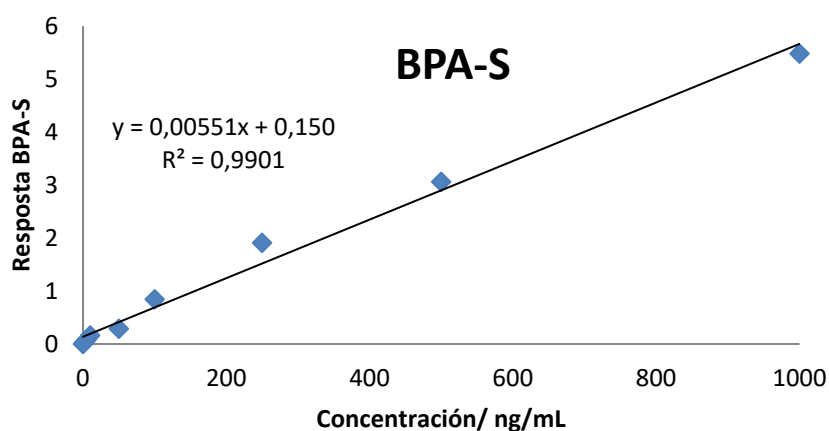
#### 3.1. Linealidade

A linealidade avalíouse mediante inxeccións sucesivas de patróns de concentracións ascendentes para os metabolitos (de 1 ng/mL a 1000 ng/mL), con 200 ng/mL dos patróns internos. Para os BPs non foi posible a avaliación da linealidade xa que se decretou o Estado de Alarma e non deu tempo a realizar este estudo.

Os resultados do calibrado amósanse na Táboa 5. A linealidade en varios compostos é boa, pero noutros, non chega a  $R^2=0,99$ , polo que non é a ideal. Polo tanto, sería necesario seguir avaliando a linealidade para o BPS-S, BPS-G e BPA-DG (que só foi detectado a partir do patrón de 500 ng/mL, e non foi posible establecer un calibrado, polo que non aparece na Táboa 5). Na Figura 18, móstrase o exemplo da recta de calibrado para o BPA-S.

**Táboa 5:** Parámetros do calibrado dos metabolitos.

Composto	Pendente	Ordenada	$R^2$
BPS-S	0,00541	0,150	0,9851
BPF-S	0,0159	0,103	0,9972
BPA-G	0,000891	0,0197	0,9916
BPA-S	0,00551	0,150	0,9901
BPF-G	0,00135	0,00962	0,9945
BPA-DS	0,000699	-0,00809	0,9977
BPS-G	0,00127	-0,0145	0,9842



**Figura 18:** Recta de calibrado para BPA-S.

### 3.2. Límites de detección e cuantificación instrumentais

Os límites de detección (IDL) e cuantificación (IQL) instrumentais, recollidos na Táboa 6, foron obtidos a partir da relación S/R da concentración máis baixa do calibrado.

Para o seu cálculo, divídese a concentración na que son atopados entre a relación S/R, e multiplicado por 3 (IDL) ou 10 (IQL). Como pode apreciarse, o IDL está comprendido entre  $2,3 \times 10^{-3}$  (do BPS-S) e 33 (do BPA) ng/mL e o IQL está comprendido entre os  $7,7 \times 10^{-3}$  (do BPS-S) e  $1,1 \times 10^2$  (do BPA) ng/mL.

**Táboa 6:** IDL e IQL dos compostos estudados:

ng/mL	BPA	BPA-S	BPA-G	BPA-DS	BPS	BPS-S	BPS-G	BPF	BPF-S	BPF-G
<b>IDL</b>	33	0,91	0,38	0,15	0,13	$2,3 \times 10^{-3}$	9,3	$2,9 \times 10^{-2}$	$1,9 \times 10^{-2}$	1,1
<b>IQL</b>	$1,1 \times 10^2$	3,1	1,3	0,50	0,43	$7,7 \times 10^{-3}$	31	$9,9 \times 10^{-2}$	$6,5 \times 10^{-2}$	3,5

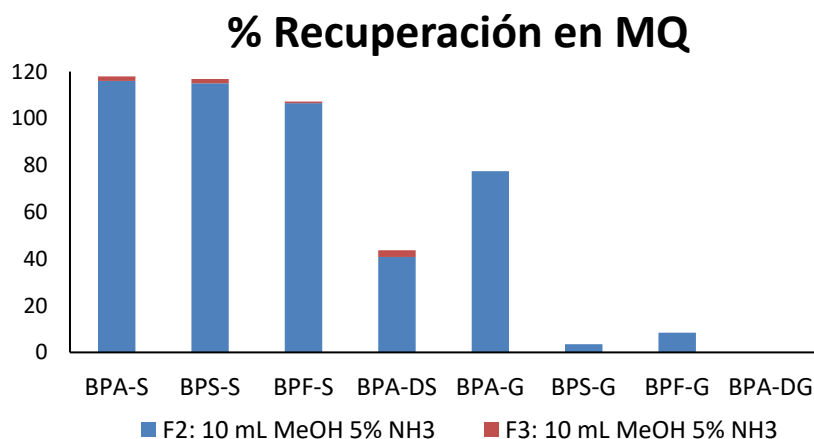
### 4. Optimización do proceso SPE

Realizáronse probas para estudar as condicións adecuadas para a extracción en fase sólida (SPE). O procedemento que se seguiu foi detallado no Apartado 4.5.. Nestas probas, adicionáronse 500 ng/mL dos metabolitos sobre mostras 100 mL de auga MQ. Empregáronse cartuchos Oasis WAX 150 mg (Waters), que traballan en modo mixto, combinando fase inversa e intercambiador aniónico débil.

Nesta primeira proba fixéronse tres elucións (fracción 1: 10 mL MeOH, fracción 2: 10 mL MeOH 5% NH<sub>3</sub>, fracción 3: 10 mL MeOH 5% NH<sub>3</sub>).

Ao analizar as tres fraccións, viuse que na fracción 1 non apareceu ningún composto. Isto era o desexado, xa que esta primeira fracción tiña a función de ser un lavado, na que os analitos quedasen retidos no adsorbente, mentres o MeOH pode eluir interferentes que se reteñen por fase inversa e non por intercambio aniónico.

Os analitos apareceron na fracción 2 e na 3, como se observa na Figura 19, que nos indica a fracción de composto recuperada tras o proceso de extracción completo.



**Figura 19:** Recuperación dos metabolitos na SPE.

Os BP monosulfatos foron recuperados na segunda fracción principalmente, e a recuperación na terceira foi menor do 4%. O BPA-DS foi recuperado nunha porcentaxe maior na terceira fracción (10%). Por último, os glucurónidos non se recuperaron en cantidades elevadas.

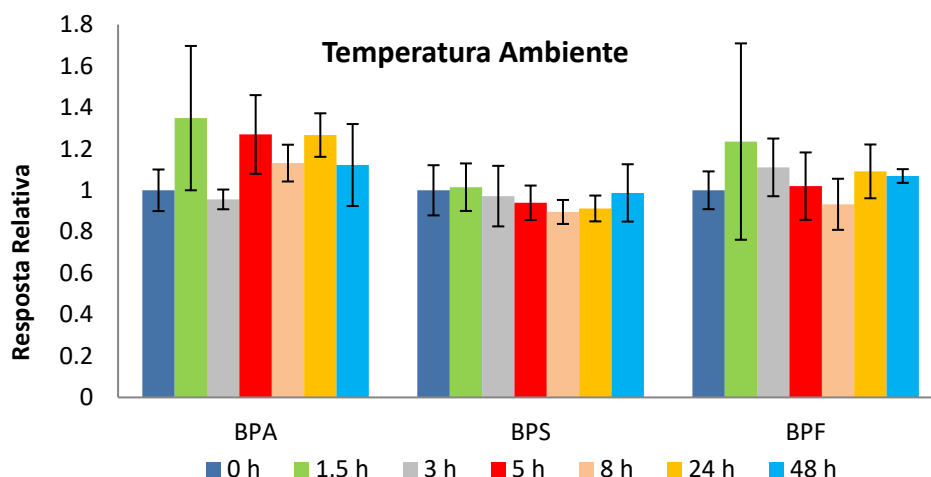
Como os resultados non foron bos, pensouse en aumentar o volume das fraccións da elución ou comprobar a posible rotura dos glucurónidos. Debido ao Estado de Alarma pola Covid-19, non se puido proseguir con esta optimización.

## 5. Probas de estabilidade

Realizáronse probas de estabilidade, para os BP sco fin de poder demostrar se sufrían distintos procesos de degradación podendo producir os metabolitos na auga residual, e para os metabolitos para comprobar se eran estables en augas residuais. Así, sendo estes compostos estables en auga residual, poderán ser utilizados como biomarcadores. O procedemento seguido para a preparación das mostras coas que se levaron a cabo as probas de estabilidade ven detallado no Apartado 4.7..

### 5.1. Estabilidade dos BP en augas residuais a temperatura ambiente:

As alícuotas de augas residuais dopadas cos BP foron pinchadas coas condicións cromatográficas optimizadas para estes compostos. Os resultados das concentracións relativas dos BP respecto ao tempo son mostradas na Figura 20.



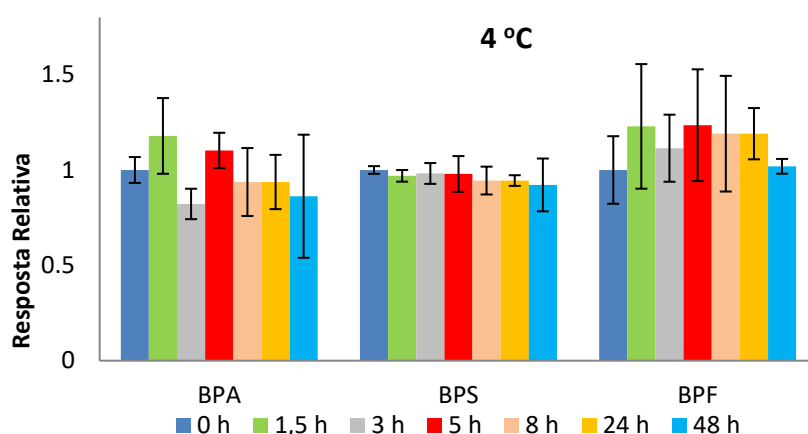
**Figura 20:** Estabilidade dos precursores a temperatura ambiente.

Como se mostrana Figura 20, ningún dos tres BP se degrada co tempo de forma significativa en mostras de auga residual mantidas a temperatura ambiente.

Aínda así, coobxectivo de verificar a posible formación de trazas dos metabolitos, pincháronse de novo as mostras pero desta vez coas condicións cromatográficas optimizadas para os metabolitos. Só se apreciou a formación de BPS-S e BPF-S a 48 h, pero ambos nunha porcentaxe respecto á cantidade inicial de precursor baixa (<0,7%).

### 5.2. Estabilidade dos precursores en augas residuais a 4°C

Determinouse a posible degradación dos BP en augas residuais gardadas en neveira (4°C). As mostras foron pinchadas co método cromatográfico optimizado para os BP, e como mostra a Figura 21, estes compostos non sofren degradación.



**Figura 21:** Estabilidade dos precursores a 4°C.

Despois, as mesmas mostras foron pinchadas co método cromatográfico optimizado para os metabolitos. Só se formaron o BPS-S e o BPF-S a partir das 48 h, pero nunhas porcentaxes mínimas (<0,4%).

Con estes resultados, a presenza de BP en auga residual non debería dar lugar á formación significativa de metabolitos, sobre todo se se refrixeran e extraen pronto as mostras.

5.3. Estabilidade dos metabolitos en augas residuais a temperatura ambiente

O seguinte paso foi realizar as probas de estabilidade dos metabolitos a temperatura ambiente. As mostras foron pinchadas co método cromatográfico optimizado para metabolitos. Os resultados móstransena Figura 22.

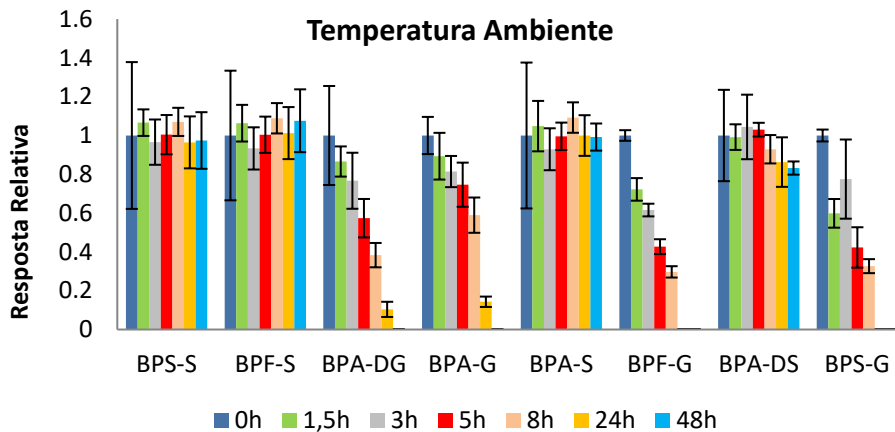


Figura 22: Estabilidade dos metabolitos a temperatura ambiente.

Os sulfatos (incluído o BPA-DS) son estables en augas residuais a temperatura ambiente, xa que manteñen a concentración co tempo. Porén, os glucurónidos degrádanse, especialmente o BPF-G e BPS-G, que non están presentes xa ás 24 h.

Pincháronse de novo as mostras, desta vez co método cromatográfico optimizado para os BP, co obxectivo de avaliar, se se forman en augas residuais co tempo, a partir dos metabolitos.

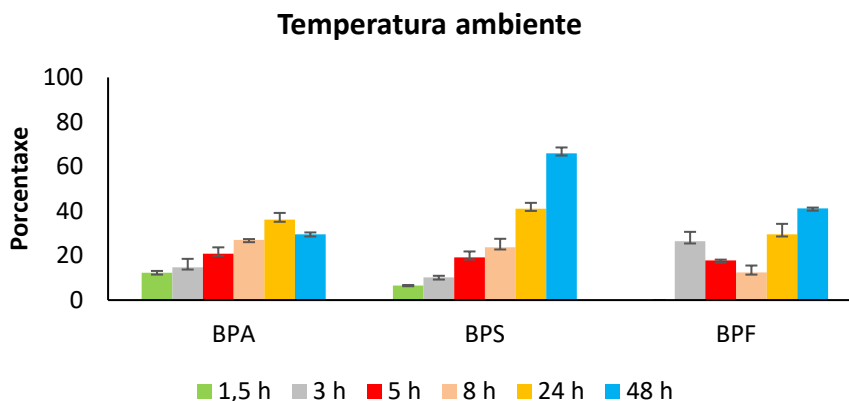


Figura 23: Formación relativa dos precursores a temperatura ambiente.

Como se observa na Figura 23, o BPAformouse en menores cantidades relativas que o BPS e BPF, que en 48 hse formaronnun 60% e 40% respecto á concentración inicial dos metabolitos.

5.4. Estabilidade dos metabolitos en augas residuais a 4°C

Realizouse o mesmo procedemento para as mostras que contiñan unha adición de metabolitos e estaban gardadas na neveira que as que se conservaron a temperatura ambiente.

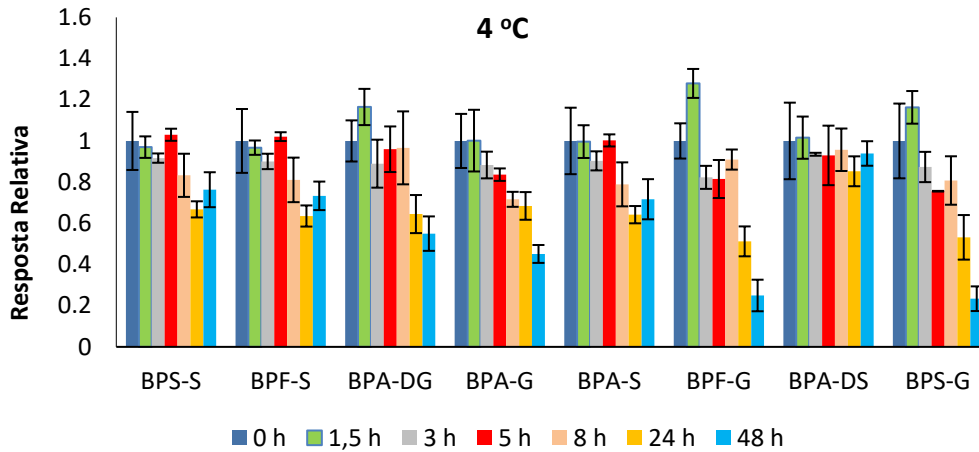


Figura 24: Estabilidade dos metabolitos a 4°C.

Como aparece na Figura 24, os sulfatos son bastante estables en mostras de auga residual a 4°C. Os glucurónidos son máis estables nestas mostras, moito máis ca se estivesen a temperatura ambiente, xa que aínda permanecen despois dos dous días, aínda que só unha fracción da concentración inicial.

Por último, as mostras foron inxectadas co método cromatográfico optimizado para os precursores, para saber cal foi a cantidade de metabolitos que se transformaron en precursores. Na Figura 25 móstrase o producido en función da cantidade que había no inicio dos metabolitos.

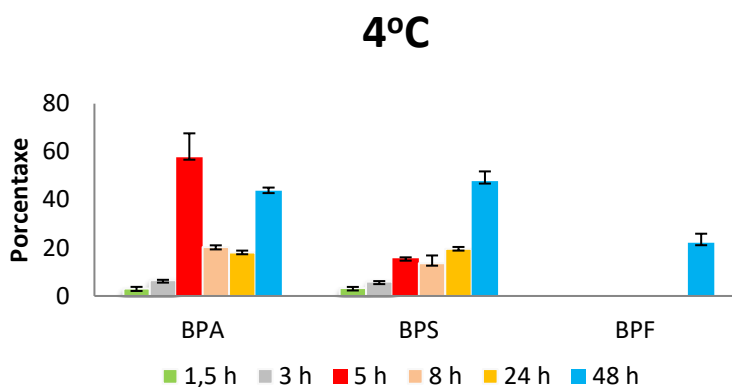


Figura 25: Formación relativa dos precursores a 4°C.

Principalmente detectouse a presenza de BPS, pero nun 40%, valores menores aos detectados a temperatura ambiente. Só se apreciou formación do BPF ao cabo de 48 h.

Como conclusión pódese afirmar que se poden empregar os sulfatos como marcadores de exposición, pero non os glucurónidos, xa que se degradan para producir os BP orixinais.

### VI. FUTURO DESENVOLVEMENTO

A parte experimental quedou parada o 16 de marzo de 2020 debido á imposibilidade de ir ao laboratorio pola pandemia do Covid-19. Os pasos que quedaban para a finalización do traballo son descritos a continuación:

- 1) Rematar a optimización da SPE: emprego de distintos volumes de elución, comprobar o volume de rotura, outros cartuchos, cos que avaliar a extracción máis efectiva, etc.
- 2) Validación instrumental: avaliar a repetibilidade e reproducibilidade instrumental, avaliar a linealidade dos BPs e BPA-DG, e reavaliar a linealidade dalgúns metabolitos.
- 3) Validación do método global: recuperación a varios niveis de concentración en auga residual, efectos matriz e límites de detección e cuantificación do método.
- 4) Aplicación do método a mostras reais: por exemplo as mostras recollidas o 11, 12, 13, 14 e 15 de marzo de 2020. Isto permitiría a avaliación da exposición que sofre a poboación de Santiago de Compostela aos bisfenóis.

## VII. CONCLUSIÓNS

Neste traballo iniciouse o desenvolvemento dun método analítico para a determinación de tres bisfenois e varios dos seus metabolitos en mostras de auga residual. As principais conclusións do traballo, ata onde se puido desenvolver debido ao confinamento, son as seguintes:

- A determinación dos bisfenois e os seus metabolitos mediante LC-MS é posible, pero para iso é necesario empregar dúas columnas con mecanismos diferentes: fase inversa para os bisfenois e HILIC para os metabolitos (sulfatos e glucurónidos) debido á súa maior polaridade.
- O método desenvolto presenta unha boa linealidade, repetibilidade e límites de detección aceptables, aínda que a validación instrumental non se puido completar para todos os compostos.
- Os bisfenois son estables en augas residuais e non xeran metabolitos. De igual maneira os metabolitos conxugados con sulfato tamén son estables, mentres que os glucurónidos se degradan a partir de 24 h para revertir nos bisfenoisparentais. Por tanto, os sulfatos poderían empregarse como biomarcadores de exposición en auga, pero non os glucurónidos.
- Iniciouse o desenvolvemento dun método de SPE con cartuchos Oasis WAX, cuxos resultados preliminares mostran que o método é prometedor para os sulfatos (excepto o BPA-DS), mentres que a recuperación en xeral para os glucurónidos sería moito peor.
- Sería preciso rematar a optimización da SPE e validar o método para a súa posterior aplicación a mostras de auga residual.

## CONCLUSIONES

En este traballo se iniciou o desenvolvemento de un método analítico para a determinación de tres bisfenoles e varios dos seus metabolitos en mostras de auga residual. As principais conclusións do traballo, hasta donde se puido desenvolver debido ao confinamento, son as seguintes:

- La determinación de los bisfenoles y sus metabolitos mediante LC-MS es posible, pero para ello es necesario emplear dos columnas con mecanismos diferentes: fase inversa para los bisfenoles y HILIC para los metabolitos (sulfatos y glucurónidos) debido a su mayor polaridad.
- El método desarrollado presenta una buena linealidad, repetibilidad y límites de detección aceptables, aunque la validación instrumental no se pudo completar para todos los compuestos.
- Los bisfenoles son estables en aguas residuales y no generan metabolitos. De igual manera los metabolitos conjugados con sulfato también son estables, mientras que los glucurónidos se degradan a partir de 24 h para revertir en los bisfenoles parentales. Por

tanto, los sulfatos podrían emplearse como biomarcadores de exposición en agua, pero no los glucurónidos.

- Se inició el desarrollo de un método de SPE con cartuchos Oasis WAX, cuyos resultados preliminares muestran que el método es prometedor para los sulfatos (excepto el BPA-DS), mientras que la recuperación en general para los glucurónidos sería mucho peor.
- Sería preciso terminar la optimización de la SPE y validar el método para su posterior aplicación a muestras de agua residual.

## CONCLUSIONS

In that work was started the development of an analytical method for the determination of three bisphenols and several of their metabolites in wastewater. The main conclusions of this work, as far as it was developed due to the lockdown are:

- It is possible to determine bisphenols and their metabolites by LC-MS, but two columns with different mechanisms are required: reversed-phase for bisphenols and HILIC for metabolites (sulfates and glucuronides), due to their greater polarity.
- The developed method provided good linearity, repeatability, and detection limits, although instrumental validation could not be completed for all of compounds.
- Bisphenols are stable in wastewater and do not produce metabolites. In the same way, sulfate conjugated metabolites are stable too, while glucuronides degradation occurs at 24 h to produce the parent bisphenols. Hence, sulfates could be used as exposure biomarkers to be measured in water, but not glucuronides.
- The development of the SPE was started with Oasis WAX. Preliminary results indicate that this sorbent provides promising results for sulfates (except to BPA-DS), but glucuronides recovery was worse.
- It is necessary to finalize SPE optimization and validate the method, in order to later on apply it to the analysis of wastewater samples.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. J. Mathieu-Denoncourt, S.J. Wallace, S.R. de Solla, V.S. Langlois. Plasticizer endocrine disruption: Highlighting developmental and reproductive effects in mammals and non-mammalian aquatic species. *General and Comparative Endocrinology* (2015) 74-88.
2. M. Bolgar, J. Hubball, J. Groeger, S. Meronek. Plastic Additives. Handbook for the chemical analysis of plastic and polymer additives (2015) 1-48.
3. O. Horn, S. Nalli, D. Cooper, J. Nicell. Plasticizer metabolites in the environment. *Water Research* 38 (2004) 3693-3698.
4. [www.polymer-additives.specialchem.com/selection-guide/plasticizers](http://www.polymer-additives.specialchem.com/selection-guide/plasticizers) (consultada 23/3/2020).
5. I. González-Mariño, R. Rodil, I. Barrio, R. Cela, J.B. Quintana. Wastewater-Based Epidemiology as a New Tool for Estimating Population Exposure to Phthalate Plasticizers. *Environmental Science and Technology* 51(7) (2017) 3902-3910.
6. P. Du, Z. Zhou, H. Huang, S. Han, Z. Xu, Y. Bai, X. Li. Estimating population exposure to phthalate esters in major Chinese cities through wastewater-based epidemiology. *Science of the Total Environment* 643 (2018) 1602-1609.
7. C. Gys, A. Kovačič, C. Huber, F.Y. Lai, E. Heath, A. Covaci. Suspect and untargeted screening of bisphenol S metabolites produced by *in vitro* human liver metabolism. *Toxicology Letters* 295 (2018) 115-123.
8. S. Waidyanatha, S.R. Black, R.W. Snyder, Y.L. Yueh, V. Sutherland, P.R. Patel, S.L. Watson, T.R. Fennell. Disposition and metabolism of the bisphenol analogue, bisphenol S, in Harlan Sprague Dawley rats and B6C3F1/N mice and *in vitro* in hepatocytes from rats, mice, and humans. *Toxicology and Applied Pharmacology* 351 (2018) 32-45.
9. H.J. Lehmler, B. Liu, M. Gadobge, W. Bao. Exposure to Bisphenol A, Bisphenol F, and Bisphenol S in U.S. Adults and Children: The National Health and Nutrition Examination Survey 2013-2014. *ACS Omega* 3 (2018) 6523-6532.
10. W. Qiu, H. Shao, P. Lei, C. Zheng, C. Qiu, M. Yang, Y. Zheng. Immunotoxicity of bisphenol S and F are similar to that of bisphenol A during zebrafish early development. *Chemosphere* 194 (2018) 1-8.
11. Ministerio para la transición ecológica y el reto demográfico. [www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/emisiones/prob-amb/gases\\_fluorados](http://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/atmosfera-y-calidad-del-aire/emisiones/prob-amb/gases_fluorados) (consultada 31/3/2020).
12. Chemspider. Properties. Predicted-ChemAxon. [www.chemspider.com](http://www.chemspider.com) (consultada 10/3/2020).

13. J. Gu, J. Zhang, Y. Chen, H. Wang, M. Guo, L. Wang, W. Zhen, S. Wu, L. Shi, A. Gu, G. Ji. Neurobehavioral effects of bisphenol S exposure in early life stages of zebrafish larvae (Danio rerio). *Chemosphere* 217 (2019) 629-635.
14. J. Yang, K.M. Chan. Evaluation of the toxic effects of brominated compounds (BDE-47, 99, 209, TBBPA) and bisphenol A (BPA) using a zebrafish liver cell line, ZFL. *Aquatic Toxicology* 159 (2015) 138-147.
15. Q. Yang, X. Yang, J. Liu, Y. Chen, S. Shen. Effects of exposure to BPF on development and sexual differentiation during early life stages of zebrafish (Danio rerio). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology and Physiology* 210 (2018) 44-56.
16. L.N. Vandenberg, R. Hauser, M. Marcus, N. Olea, W.V. Welshons. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology* 24 (2007) 139-177.
17. C. Karrer, M. Andreassen, N. von Goetz, F. Sonnet, A.K. Sakhi, K. Hungerbühler, H. Dirven, T. Husøy. The EuroMix human biomonitoring study: Source-to-dose modeling of cumulative and aggregate exposure for the bisphenols BPA, BPS and BPF and comparison with measured urinary levels. *Environment International* 136 (2020) 105397.
18. K. Mokra, K. Wozniak, B. Bukowska, P. Sicinska, J. Michalowicz. Low-concentration exposure to BPA, BPF and BPAF induces oxidative DNA base lesions in human peripheral blood mononuclear cells. *Chemosphere* 201 (2018) 119-126.
19. H. Zhang, Q. Quan, M. Zhang, N. Zhang, W. Zhang, M. Zhan, W. Xu, L. Lu, J. Fan, Q. Wang. Occurrence of bisphenol A and its alternatives in paired urine and indoor dust from Chinese university students: Implications for human exposure. *Chemosphere* 247 (2020) 125987.
20. J. Sajiki, K. Takahashi, J. Yonekubo. Sensitive method for the determination of bisphenol-A in serum using two systems of high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 736 (1999) 255-261.
21. Y. Ikezuki, O. Tsutsumi, Y. Takai, Y. Kamei, Y. Taketani. Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Human Reproduction* 17(11) (2002) 2839-2841.
22. T. Takeuchi, O. Tsutsumi. Serum bisphenol A concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 291(1) (2002) 76-78.
23. T. Takeuchi, O. Tsutsumi, Y. Ikezuki, Y. Takai, Y. Taketani. Positive relationship between androgen and the endocrine disruptor, bisphenol A, in normal women and women with ovarian dysfunction. *Endocrine Journal* 51(2) (2004) 165-169.

24. Y. Sun, M. Irie, N. Kishikawa, M. Wada, N. Kuroda, K. Nakashima. Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection. *Biomedical Chromatography* 18(8) (2004) 501-507.
25. X. Ye, Z. Kuklenyik, L.L. Needham, A.M. Calafat. Measuring environmental phenols and chlorinated organic chemicals in breast milk using automated on-line column-switching-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 831(1-2) (2006) 110-115.
26. R. Kuruto-Niwa, Y. Tateoka, Y. Usuki, R. Nozawa. Measurement of bisphenol A concentrations in human colostrum. *Chemosphere* 66(6) (2007) 1160-1164.
27. I. Koichi, W. Megumi, H. Tae, O. Shigeru, U. Tekashi, Y. Yoshihiro, N. Hiroyuki. Application of liquid chromatography-mass spectrometry to the quantification of bisphenol A in human semen. *Journal of Chromatography B: Analytical technologies in the biomedical and life sciences* 773(2) (2002) 97-102.
28. E. Gracia-Lor, N.I. Nikolaos, F. Hernández, E. Zuccato, S. Castiglioni. Wastewater-Based Epidemiology as a Novel Biomonitoring Tool to Evaluate Human Exposure To Pollutants. *Environmental Science and Technology* 52(18) (2018) 10224-10226.
29. L. Bijlsma, A. Celma, I. González, C. Postigo, V. Andreu, M.J. Andrés-Costa, F. Hernández, M. López de Alda, E. López-García, R.M. Marcé, R. M. Montes, E. Pocurull, Y. Picó, M.d.R. Rodil, L. Rodríguez-Gil, Y. Valcárcel, J.B. Quintana. Análisis de aguas residuales con fines epidemiológicos: aplicaciones a la estimación del consumo de sustancias de abuso y en salud pública en general. *Red española ESAR-Net*. [http://www.mscbs.gob.es/biblioPublic/publicaciones/recursos\\_propios/resp/revista\\_cdrom/VOL92/C\\_ESPECIALES/RS92C\\_201808053.pdf](http://www.mscbs.gob.es/biblioPublic/publicaciones/recursos_propios/resp/revista_cdrom/VOL92/C_ESPECIALES/RS92C_201808053.pdf) (consultada 15/4/2020).
30. L. Pang, H. Yang, L. Lv, S. Liu, W. Gu, Y. Zhou, Y. Wang, P. Yang, H. Zhao, L. Guo, J. Dong. Occurrence and Estrogenic Potency of Bisphenol Analogs in Sewage Sludge from Wastewater Treatment Plants in Central China. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 77 (2019) 461-470.
31. D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 9ª. Ed, Belmont, CA: Brooks/Cole. Cap.31.
32. D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler, S.R. Crouch. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 9ª. Ed, Belmont, CA: Brooks/Cole. Cap.33.
33. K.A. Rubinson, J.F. Rubinson. *Análisis Instrumental*. 4ª Ed, Prentice Hall. Cap. 12.