

# MEMORIA PRÁCTICUM

**Determinación, mediante  
cromatografía de líquidos con  
detección fluorescente, de bisfenol A  
y fenol migrado desde juguetes y  
envases de suero**



**UNIVERSIDAD  
DE BURGOS**

**AUTOR:** Mar Arce Antón

**TUTORES:** María Cruz Ortiz Fernández  
Silvia Sanllorente Méndez

Burgos, 12 de julio de 2016



UNIVERSIDAD DE BURGOS  
Facultad de Ciencias  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Master Oficial en Química Avanzada**  
**Facultad de Ciencias**

**AUTORIZACIÓN Y ACTA DE CALIFICACIÓN**  
**DEL PRACTICUM**

CURSO: 2015/2016

**Datos del Profesor/es tutor/es:**

APELLIDOS:  NOMBRE:   
APELLIDOS:  NOMBRE:

Autoriza  No autoriza

La presentación del trabajo.

**Datos del Alumno/a:**

APELLIDOS:   
NOMBRE:

**Datos del Trabajo:**

Nombre del Trabajo:

Calificación del *Practicum*:

Burgos, 6 de julio de 2016

Dña. María de la Cruz Ortiz Fernández Dña. Silvia Sanllorente Méndez  
Profesoras tutoras del *Practicum*

# ÍNDICE

1. RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	1
2. OBJETIVOS .....	2
3. INTRODUCCIÓN .....	2
4. FUNDAMENTO TEÓRICO .....	4
4.1. Técnica analítica .....	4
4.1.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-FLD) .....	4
4.2. Análisis quimiométrico .....	6
4.2.1. Diseño de experimentos D-óptimo .....	6
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL .....	8
5.1. Instrumentación y software .....	8
5.2. Disoluciones patrón .....	9
5.3. Muestras problema .....	9
5.3.1. Juguetes .....	9
5.3.2. Suero clínico y ampollas de suero convencional .....	10
5.4. Muestras para el diseño de experimentos .....	11
6. RESULTADOS .....	11
6.1. Optimización mediante el diseño de experimentos D-óptimo .....	11
6.2. Construcción y validación de las rectas de calibrado .....	15
6.3. Migración de fenol y bisfenol A en las muestras problema .....	20
7. CONCLUSIONES .....	22
8. BIBLIOGRAFÍA .....	22

## 1. RESUMEN

En los últimos años ha resonado con fuerza en los medios de comunicación la posible peligrosidad para la salud humana, fundamentalmente en niños y bebés, derivada de la continua exposición al bisfenol A (BPA) migrado de objetos cotidianos fabricados con diversos tipos de plástico (PVC, policarbonato, etc).

Los informes más recientes a nivel europeo indican, sin embargo, que el contenido de PBA, que llega a nuestro organismo a través de diversas vías de contacto, en ningún caso supera los límites legales establecidos. Pero es cierto, que los efectos por la ingesta continuada del mismo y durante un tiempo prolongado, así como los posibles procesos que puedan incrementar su migración, siguen siendo objeto de estudio por los organismos responsables de la salud.

Debido a su importancia, en el siguiente trabajo se ha determinado BPA y fenol migrado desde juguetes y desde suero clínico y el adquirido en farmacias (ampollas normales de suero, lágrimas artificiales, etc) utilizando como técnica analítica cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC-FLD).

Mediante un diseño de experimentos D-óptimo, se han escogido las condiciones cromatográficas (temperatura de la columna y flujo y composición de la fase móvil) que permiten maximizar las áreas de pico de ambos analitos y minimizar su tiempo de retención para garantizar una metodología lo más sensible posible y rápida. Una vez elegidas estas tres condiciones, se han construido y validado los calibrados correspondientes así como también se ha calculado el límite de decisión y la capacidad de detección en los límites establecidos para cada uno de los analitos estudiados y finalmente se ha determinado el contenido de fenol y BPA en las muestras problema.

## ABSTRACT

In recent years, the possible danger to human health, mainly in children and babies, that is derivated from continuous exposure to bisphenol A (BPA) (migrated from manufactured everyday objects which are made of different types of plastic (PVC, polycarbonate, etc.)), has been heard strongly in the media.

However, latest studies shows that in Europe the content of PBA, which reaches our bodies through different contact routes, in any case exceed legal limits. But it is true that the effects caused by continued intake of this analyte and for a long time, as well as, possible processes that could increase their migration, are still under consideration by the responsible health agencies.

Because of its importance, in the following project, BPA and phenol migrated from toys and from clinical serum and from the one bought in pharmacies (normal blisters serum, artificial tears, etc) have determined. High Performance Liquid Chromatography coupled to a fluorescence detector (HPLC-FLD) is the analytical technique used in this project.

By means of a D-optimal experimental design, chromatographic conditions (column temperature and flow and composition of the mobile phase) have been chosen those that let us to maximize the peak area and to minimize the retention time. This allows to guarantee a more sensitive and fast method. Once these three conditions have been selected, the related calibrates have been constructed and validated, and also, the decision limit and the detection capability has been calculated in the limits set for each of the analytes studied. Finally the content of phenol and BPA have been carried out in the test sample.

## 2. OBJETIVOS

Los objetivos propuestos en este trabajo son los siguientes:

- Optimizar mediante un diseño de experimentos D-óptimo un procedimiento para determinar BPA y fenol mediante cromatografía de líquidos con detección fluorescente.
- Construir y validar modelos de calibrado para ambos analitos y evaluar el límite de decisión ( $CC\alpha$ ) y la capacidad de detección ( $CC\beta$ ) del procedimiento empleado para el límite establecido en la disolución acuosa de migración.
- Determinar el contenido migrado desde juguetes, de BPA y fenol en HCl 0.07M y en agua (simulando las vías de contacto por las que los niños de corta edad pueden estar expuestos a estos compuestos).
- Determinar el contenido de estos analitos en envases de suero clínico y otros sueros obtenidos en farmacia (ampollas, lágrimas artificiales).

## 3. INTRODUCCIÓN

El 2,2-bis(4-hidroxifenil)propano, más comúnmente conocido como bisfenol A (BPA), es un compuesto orgánico con dos grupos funcionales fenol muy utilizado en la fabricación de plásticos. Se trata de un monómero fundamental en la producción de resina epoxi y de policarbonato (PC). El policarbonato es un polímero transparente el cual se emplea para fabricar una gran variedad de productos de la vida cotidiana como:

- Biberones y botellas de agua.
- Equipamiento deportivo.
- Dispositivos médicos y dentales.
- Cristal de gafas, cámaras fotográficas, proyectores, microscopios.
- Juguetes de alta resistencia para niños de corta edad.
- CD, DVD, bolígrafos, reglas.
- Fluorescente, enchufes, conectores y algunos electrodomésticos.
- Cubiertas en naves industriales, pabellones, invernaderos.
- Cristales antibalas y escudos antidisturbios de la policía.

También se usa en la síntesis de polisulfonas y cetonas de poliéter, como antioxidante en algunos plastificantes y como un inhibidor de polimerización en el PVC.

Algunos de estos materiales plásticos y artículos están destinados a estar en contacto con alimentos o con nuestro organismo por vías directas como la saliva o indirectas como la piel, y así el BPA puede migrar a los alimentos o ser ingerido directamente.

El BPA se trata de un compuesto que presenta cierta controversia en cuanto a los riesgos que supone para la salud humana. Desde la década de 1930, era considerado como sospechoso de ser dañino para los humanos y muchos medios de comunicación fueron los que resaltaron los riesgos del uso de BPA en productos de consumo habitual después de que varios gobiernos emitieran informes cuestionando su seguridad.

A consecuencia de lo anterior, algunas cadenas de venta retiraron, de entre sus productos, aquellos que contenían este compuesto. Pero no fue hasta 2010 debido a un informe elaborado por la FDA (Administración de Alimentos y Fármacos) de Estados Unidos cuando se despertó una mayor conciencia con respecto a la exposición del BPA en fetos, bebés y niños pequeños.

En Europa a finales del año 2012, se realizó un estudio científico en Francia y este país decidió prohibir el BPA en todos los envases de alimentos por considerarlo un peligro para la salud, asegurando que prevalecía el principio de precaución. Las autoridades estatales y los expertos llevaban años esperando un nuevo informe de la EFSA (Agencia de Seguridad Alimentaria de la UE), el cual se realizó a principios del año 2015 y en el que se concluyó que no es dañino siempre que la ingesta sea inferior al límite establecido, aunque seguirán realizándose estudios. EFSA y FDA no coinciden en cuanto el riesgo que este analito supone para la salud humana.

Los riesgos derivados del BPA están causados por su actividad como disruptor endocrino, ya que es capaz de causar desequilibrios en el sistema hormonal a concentraciones muy bajas con posibles repercusiones sobre la salud. La presencia continua de este disruptor en el organismo se ha relacionado con un mayor riesgo de padecer diversos trastornos orgánicos con efectos sobre el sistema reproductor masculino y femenino, sobre el cerebro y el comportamiento, sobre el metabolismo y el sistema cardiovascular, sobre la tiroides, sobre el sistema inmunitario, sobre el intestino, y efectos carcinogénicos (cáncer de próstata y de mama).

Sus posibles efectos tóxicos se deben al consumo de alimentos que han sido contaminados por contacto con materiales que contienen esta sustancia: envases, revestimientos de latas de conserva, *tuppers*, tickets de compra, etc. La amplia distribución de productos con BPA, especialmente en los países desarrollados, provoca una exposición continua de la población, pudiendo verse afectado cualquier sector de edad, desde fetos hasta ancianos. Además los niveles de exposición al BPA pueden verse incrementados por procesos a los que han sido sometidos los materiales plásticos: uso repetido, limpieza en lavavajillas y con cepillo y detergentes, altas temperaturas (microondas o cocción), antigüedad del objeto plástico, pH de la comida con la que esté en contacto, etc.

Teniendo en cuenta el peso de un bebé en comparación con el de una persona adulta, la exposición al mismo compuesto supone un mayor riesgo. Esta es la razón por la cual en la mayoría de los artículos encontrados que se han empleado en la revisión bibliográfica se realiza la determinación y cuantificación de BPA en biberones para bebés [1-12]. Como se ha podido observar en otros artículos, es habitual también realizar la extracción y determinación del BPA en botellas de agua [3,13,14], o en otros envases (vasos o vajilla) fabricados con PC o algún tipo diferente de plástico [15-19]; y de forma menos común en filmes para embalar comida [20], en residuos de plástico [21], en papel térmico utilizado en tickets de compra [22], o en juguetes y otros utensilios destinados a bebés [22].

Entre los artículos consultados se ha observado la diversidad de técnicas analíticas empleadas en la determinación y cuantificación de BPA. La técnica de determinación analítica que se utiliza mayoritariamente es cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) [3-8,12,13,16,17,21,22]. Otros autores se decantan por técnicas como espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS) [14]; cromatografía de líquidos de muy alta resolución acoplada a espectrometría de masas (UHPLC-MS) [18]; cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC-FLD) [2,7,9-11,19], con detectores de ultravioleta y fluorescencia (HPLC-UV-FLD) [15,20], y con detector fotodiodo en línea de ultravioleta (HPLC-DAD) [1].

En este trabajo se va a realizar la determinación y cuantificación del BPA en juguetes para niños de corta edad y en diversos recipientes de suero fabricados con plástico para diversos usos, todos ellos adquiridos en distintos establecimientos de la ciudad de Burgos. Se ha elegido como objeto de análisis los juguetes por varios motivos: i) gran parte de los artículos relacionados con BPA son sobre biberones mientras que sobre juguetes no hay prácticamente ninguno [22-24], y ii) se trata de un utensilio muy utilizado por la población de corta edad. Se decidió realizar la determinación de BPA en

recipientes de suero pensando en artículos de uso cotidiano fabricados con plástico y que pudieran estar en contacto con la piel o ser ingeridos o inyectados en vena como puede ser el suero de uso clínico, también motivado porque es habitual su empleo, y además, en cualquier sector de la población independientemente de su edad.

También se ha decidido realizar la determinación y cuantificación simultánea de fenol, considerando que pueda llegar a originarse a partir del BPA migrante. La técnica analítica empleada para este análisis es cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC-FLD), de acuerdo con la normativa vigente al respecto [25-28]. Los límites establecidos para fenol y BPA son 15 y 0.1 mgL<sup>-1</sup> (15 ppm y 100 ppb) respectivamente [27,29]. Para ambos analitos se calcula el límite de decisión (CC $\alpha$ ) y la capacidad de detección (CC $\beta$ ) de la recta de calibración construida para estos límites en la disolución acuosa de migración establecidos por normativa.

## 4. FUNDAMENTO TEÓRICO

### 4.1. TÉCNICA ANALÍTICA

#### 4.1.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-FLD)

La cromatografía líquida en columna es la técnica más antigua dentro de la cromatografía, pero su importancia no se ha reconocido hasta la década de los setenta en adelante, gracias al desarrollo de la cromatografía de líquidos de alta resolución o de alta eficiencia, comúnmente conocida como HPLC (que proviene de las siglas del inglés High Performance Liquid Chromatography) [30,31].

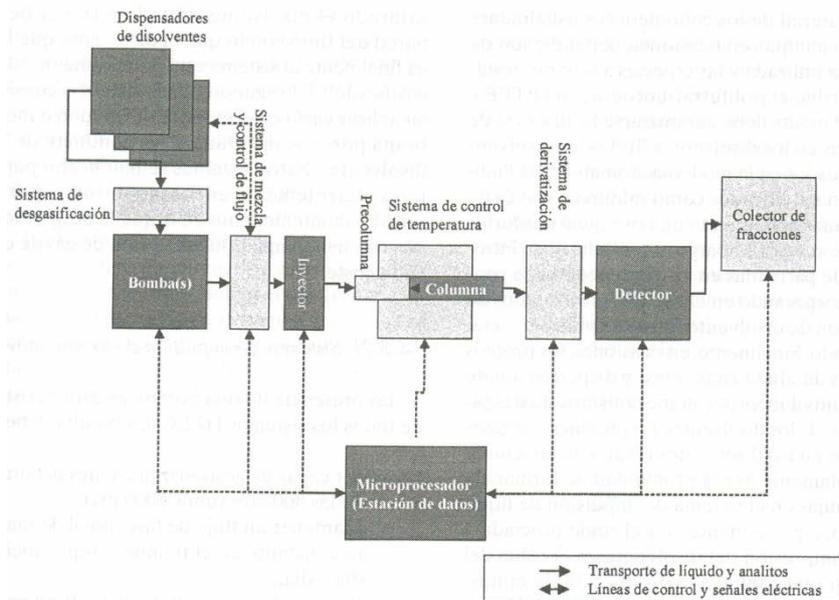
La técnica HPLC destaca por su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y, principalmente, por su gran aplicabilidad a sustancias, como aminoácidos, proteínas, hidrocarburos, fármacos, plaguicidas, antibióticos, etc, que son de primordial interés en la industria, en la ciencia y en la sociedad en general.

Con motivo de alcanzar un caudal de eluyente razonable para tamaños de partícula de relleno de columna del orden de  $\mu\text{m}$ , se requieren presiones elevadas. A consecuencia de ello, el equipo necesario en HPLC tiende a ser más sofisticado y caro que el que se utiliza en otras técnicas cromatográficas.

Un sistema moderno de cromatografía de líquidos está compuesto por los siguientes elementos básicos:

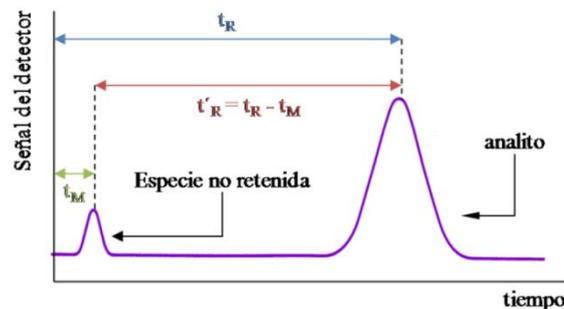
- Recipientes para la fase móvil y sistemas de tratamiento de los disolventes.
- Sistemas de bombeo.
- Sistemas de inyección de la muestra.
- Columna para cromatografía de líquidos con su relleno correspondiente.
- Detector adecuado.
- Sistema capaz de informar del resultado de la separación, es decir, un sistema de detección de las especies que abandonan la columna.

Estos elementos pueden presentar diferentes configuraciones según el modo cromatográfico elegido y las características de la fase móvil y muestra a separar. La Figura 1 muestra los elementos mencionados en un sistema habitual de HPLC.



**Figura 1.** Diagrama esquemático de la instrumentación necesaria y recomendable en HPLC [30].

El sistema de lectura muestra el resultado de la separación en forma de cromatograma (Figura 2), que consiste en una imagen que traduce visualmente la evolución, en función del tiempo, de un parámetro que depende de la concentración instantánea del soluto a la salida de la columna. La posición de los picos sobre el eje tiempo puede usarse para identificar los componentes de la muestra, y las áreas bajo los picos sirven de medida cuantitativa de la concentración de cada especie.

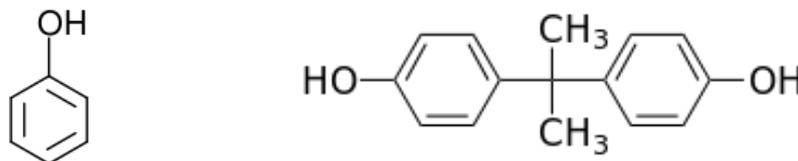


**Figura 2.** Cromatograma característico de una mezcla de dos componentes en el que se muestra cómo se mide el tiempo de retención de un analito ( $t_R$ ), el tiempo muerto ( $t_M$ ) y el tiempo de retención ajustado ( $t'_R$ ) [31].

La separación se basa en la diferencia de velocidad a la que los analitos atraviesan la columna cromatográfica. Esta diferencia se debe a la distinta tendencia que muestran los componentes de una muestra a ser retenidos en la fase estacionaria, y está determinada por la magnitud de las constantes de los equilibrios de distribución de las especies entre las fases estacionaria y móvil.

En la mayoría de los detectores basados en la espectroscopia de fluorescencia, la emisión fluorescente se detecta por medio de un detector fotoeléctrico colocado perpendicularmente respecto al haz de excitación. Los detectores más sencillos utilizan una fuente de excitación de mercurio y uno o más filtros para aislar la radiación emitida. Los instrumentos más sofisticados consisten en una fuente de radiación de xenón o una fuente láser y emplean un monocromador de red para aislar la radiación fluorescente.

En este estudio intervienen dos compuestos aromáticos, fenol y BPA, que presentan distintas estructuras conjugadas debido al par de electrones despareados del oxígeno y los dobles enlaces conjugados (Figura 3) y ambos destacan por su fluorescencia nativa.



**Figura 3.** Estructura química del fenol a la izquierda, y del bisfenol A a la derecha.

## 4.2. ANÁLISIS QUIMIOMÉTRICO

### 4.2.1. Diseño de experimentos D-óptimo

En este trabajo, la optimización se realiza a través de la metodología de diseño de experimentos ya que permite la automatización de la optimización y la interpretación fácil, directa y objetiva de los resultados. En la metodología de diseño de experimentos se deben considerar tres aspectos antes de crear el plan experimental: el dominio experimental en el que se va a trabajar, los factores a estudiar y las respuestas que se desean analizar y optimizar. Una vez establecidos estos puntos, se debe seleccionar el tipo de diseño de experimentos que se va a construir y ejecutar, y el modelo que se va a utilizar para relacionar los factores con las respuestas.

Una de las alternativas más útiles son los diseños D-óptimo, ya que permiten adaptar el plan experimental al problema estudiado y reducen sustancialmente el número de experiencias a realizar sin la pérdida de eficiencia y precisión en los resultados [32].

Primero se establece el dominio experimental, que consiste en definir todos los factores que se deseen estudiar y sus respectivos niveles. Después, se define un modelo lineal para explicar la relación entre la respuesta experimental ( $y$ ) y el valor de los factores ( $X$ ):

$$y = X\beta + \varepsilon \quad (1)$$

donde  $X=(x_{ij})$  es la matriz del modelo de dimensiones  $n \times p$  ( $n$  es el número de experimentos,  $p$  es el número de coeficientes del modelo);  $y$  es el vector de las respuestas experimentales;  $\beta$  es el vector de los coeficientes del modelo y  $\varepsilon$  es el vector del error experimental que acompaña a la estimación de cada coeficiente del modelo.

El modelo se debe ajustar a los datos experimentales, de tal manera que la estimación  $b$  de los coeficientes  $\beta$  del modelo de la Ecuación 1,  $b = (b_1, b_2, \dots, b_p)$ , se obtiene mediante mínimos cuadrados a partir de:

$$b = (X^tX)^{-1}X^ty \quad (2)$$

donde  $X^tX$  es la matriz de información y  $(X^tX)^{-1}$  la matriz de dispersión.

El efecto de un factor o una interacción se evalúa mediante la significación de su coeficiente,  $b_i$ . Por lo tanto, es necesario conocer la varianza esperada en dicha estimación, la cual viene dada por:

$$\text{Var}(b_i) = c_{ii} s^2 \quad (3)$$

donde  $c_{ii}$  ( $i = 1, \dots, p$ ) es la varianza de los coeficientes y se corresponde a los elementos de la diagonal principal de  $(X^tX)^{-1}$ ;  $s^2$  es una estimación de  $\text{Var}(\varepsilon)$ .

Como la varianza de los coeficientes,  $c_{ii}$ , también depende del tamaño del modelo experimental, se estandariza y se obtienen los denominados factores de inflación de

varianza (VIF), cuyo valor es siempre mayor o igual a 1 y debe ser siempre inferior a 4 para que la estimación de los coeficientes del modelo sea lo suficientemente precisa.

Por otro lado, la región de confianza conjunta para los coeficientes estimados,  $b$ , es un hiperelipsoide (por tratarse de más de dos factores). Se dice que la matriz  $X$  es D-óptima cuando el volumen del hiperelipsoide es mínimo.

Una vez que ha sido definido el dominio experimental formado por los factores a estudiar y sus respectivos niveles, se conoce el número de experimentos posibles (candidatos),  $N_C$  (número de experimentos máximo que se pueden realizar por restricciones del propio problema a estudiar). A continuación, se establece el modelo con  $N_b$  coeficientes para la relación entre la respuesta experimental y los valores de los factores.

Para cada número de experimentos,  $N$ , entre  $N_b$  y  $N_C$  se construyen las matrices experimentales con información de suficiente calidad, es decir, se determina la matriz  $X_N$  que es D-óptima. Dicho de otro modo, se extraen los  $N$  experimentos de los  $N_C$  que proporcionan la estimación conjunta de los coeficientes del modelo más precisa (mínimo volumen del hiperelipsoide de confianza). Se han desarrollado varios algoritmos computacionales [33,34] para obtener la solución D-óptima, que puede no ser única. Después, se selecciona la matriz  $X_N$  entre las disponibles, de modo que el número de experimentos  $N$  sea el menor posible y garantice unas estimaciones suficientemente precisas de los coeficientes del modelo.

Para este estudio, se desean obtener las condiciones óptimas de flujo, temperatura y fase móvil de una separación por cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de fluorescencia (HPLC-FLD). La determinación de los analitos se basa en las áreas y en la separación (diferente tiempo de retención) entre picos cromatográficos, por ello es razonable pensar que las áreas y los tiempos dependan del nivel en que se encuentren estas tres variables (flujo, temperatura y fase móvil). Se pretende que las áreas sean máximas y los tiempos mínimos.

El objetivo del estudio es determinar los niveles significativos de las variables para cada una de las respuestas (área y tiempo de cada analito), y determinar las condiciones óptimas para realizar la separación, determinación y cuantificación del fenol y BPA.

Se ha utilizado un diseño D-óptimo debido a que es una metodología general para adaptar el diseño experimental para cada problema analítico. Los factores y niveles implicados en el análisis son: flujo de la fase móvil a 3 niveles, temperatura de la columna a 3 niveles y composición de la fase móvil a 4 niveles, sumando un total de 36 posibles experimentos de un diseño factorial completo  $N_C=36$  (ver Tabla 1).

**Tabla 1.** Dominio experimental.

	<b>FACTOR</b>	<b>NÚMERO DE NIVELES</b>	<b>NIVELES</b>	
<b>U1</b>	<b>Flujo (mLmin<sup>-1</sup>)</b>	3	0.80	
			0.85	
			0.90	
<b>U2</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	3	20	
			30	
			40	
<b>U3</b>	<b>Fase móvil (v/v)</b>	4	65:0:35	
			metanol-acetonitrilo-agua	70:0:30
				0:45:55
				0:40:60

## 5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 5.1. INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE

#### Productos químicos.

Para la preparación de patrones de calibrado: 2,2-bis(4-hidroxifenil)propano de Aldrich (Madrid, España); fenol de MERCK (Darmstadt, Alemania). Los filtros de jeringa de 0.22  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro empleados eran de Teknokroma (Barcelona, España). Las soluciones se prepararon con los disolventes metanol (99.8% pureza y 0.792  $\text{kgL}^{-1}$ ) y acetonitrilo (99.8% pureza y 0.786  $\text{kgL}^{-1}$ ) de MERCK (Darmstadt, Alemania) y el agua de calidad HPLC se obtuvo mediante un sistema MilliQ de Millipore (Barcelona, España). Además se utilizó para la solución simulante de una posible vía de contacto HCl (37% pureza y 1.19  $\text{kgL}^{-1}$ ) de MERCK (Darmstadt, Alemania).

#### Instrumentos.

El sistema de HPLC utilizado era Agilent Technologies 1260 infinity, equipado con una bomba cuaternaria, un inyector automático y un detector de fluorescencia (longitud de excitación 275 nm y longitudes de onda de emisión 275-400 nm). La columna era Kinetex 5u EVO C-18 100A, de fase reversa, 150mm x 4.6 mm de diámetro interno. Las condiciones de flujo, composición de la fase móvil y temperatura de la columna son las correspondientes a cada punto del diseño de experimentos.

#### Software.

El análisis estadístico de los datos obtenidos se ejecutó con los paquetes informáticos NEMRODOW [35] para el diseño de experimentos, MATLAB [36] y STATGRAPHICS Centurion XVI [37] para la construcción y validación de calibrados y también para el cálculo de concentraciones en las muestras problema, y DETARCHI [38] para la determinación del límite de decisión ( $CC\alpha$ ) y de la capacidad de detección ( $CC\beta$ ) en un límite en la disolución acuosa de migración establecido.

#### Procedimiento total.

Para inyectar las soluciones (preparadas como se describe en los apartados 5.2 *Disoluciones patrón* y 5.3 *Muestras problema*) en el equipo de HPLC, tienen que estar contenidas en viales que se colocan en una bandeja. Los viales son de color ámbar y de 1.5 mL de capacidad con cierre a rosca. Para preparar el vial de cada solución se utilizan jeringas y filtros de 0.22  $\mu\text{m}$ . Para uno de los viales se ha utilizado un inserto debido a que el volumen disponible es inferior a 1.5 mL.

Automáticamente la aguja del equipo de HPLC atraviesa el septum del vial, coge el volumen de disolución seleccionado en el programa, en este caso 20  $\mu\text{L}$ , y lo inyecta después en la columna cromatográfica.

Se programó una secuencia, para los viales que se encuentran en la bandeja del equipo, en las condiciones óptimas elegidas para que inyecte uno detrás de otro, siguiendo un orden creciente de concentración y con las muestras problema al final.

El volumen inyectado se analiza con el sistema HPLC acoplado a un detector de fluorescencia. El proceso de separación cromatográfica se programa para que tenga 5 min de duración y registre durante todo este tiempo el espectro de emisión completo entre 275 y 400 nm cada 1 nm a una longitud de onda de excitación de 275 nm. El programa ofrece la posibilidad de visualizar de manera sencilla la secuencia cromatográfica a cuatro longitudes de onda elegidas, en este caso se eligen 290, 300, 313 y 320 nm.

Aunque se han registrado 125 nm del espectro de emisión, en realidad para este trabajo únicamente se han utilizado las longitudes de onda de emisión de 300 y 313 nm donde presentan el máximo de intensidad fluorescente el fenol y el BPA respectivamente.

## 5.2. DISOLUCIONES PATRÓN

Inicialmente se preparan las disoluciones madre de 480.5 ppm de fenol y 337.1 ppm de BPA en metanol en matraces de 100 mL. Para ello se pesan, en la balanza analítica y con ayuda de un pesa sustancias de vidrio, 0.04805 g de fenol. Se arrastra con metanol comercial hacia el matraz y después se enrasa. De la misma manera se procede para el BPA, pesando en este caso 0.03371 g. Posteriormente se traspasan a botes de color ámbar y se guardan en el frigorífico para preservar la estabilidad en el tiempo de la disolución. Cualquier disolución que se prepare más adelante también se traspasará a un recipiente de estas características.

Para poder construir una recta de calibrado para cada uno de los analitos estudiados, se debe disponer de una serie de disoluciones patrón de distintas concentraciones. Éstas se preparan a partir de las disoluciones madre de fenol y BPA, añadiendo un volumen  $V_F$  y  $V_B$  a un matraz de 25 mL con ayuda de una micropipeta y enrasando con agua MilliQ. La concentración de estas disoluciones es  $C_F$  y  $C_B$ . (Tabla 2)

**Tabla 2.** Disoluciones patrón utilizadas.

ETIQUETA	$V_F$ ( $\mu\text{L}$ )	$V_B$ ( $\mu\text{L}$ )	$C_F$ (ppb)	$C_B$ (ppb)
0	0	0	0.0	0.0
1	3	4	57.7	53.9
2	5	8	96.1	107.9
3	8	10	153.8	134.8
4	11	14	211.4	188.8
5	13	18	249.9	242.7
6	16	22	307.5	296.6
7	18	26	346.0	350.6
8	21	30	403.6	404.5

## 5.3. MUESTRAS PROBLEMA

### 5.3.1. Juguetes

El procedimiento de extracción de fenol y BPA de un juguete utilizado en este estudio intenta simular las vías de contacto a través de las cuales los niños pueden ingerir fenol o BPA. Se utilizan dos técnicas de extracción distintas: i) sumergir el juguete en 1L de agua MilliQ a 40°C durante 24 horas [23,24,28], y ii) sumergir el juguete en 1L de HCl 0.07M a 37°C durante 2 horas, éste último para simular saliva [23].

En este estudio se disponen de 4 tipos de juguetes: muñeca, pony, ardilla y varios soldados, todos ellos de plástico (Figura 4). Para los tres primeros juguetes se decide realizar los dos procedimientos de extracción, en orden i) y ii), recogiendo la solución al finalizar cada uno de ellos. Para los soldados se decide realizar cada uno de los procedimientos i) y ii) a soldados diferentes, para observar en cuál de las dos soluciones migra mayor contenido de fenol y BPA. Previamente se anotan los pesos de los juguetes (Tabla 3).



**Figura 4.** Juguetes analizados (de izquierda a derecha): pony, muñeca, ardilla y soldados.

**Tabla 3.** Peso de los juguetes.

JUGUETE		Muñeca	Pony	Ardilla	Soldados
Peso (g)	Agua MilliQ	10.1175	23.5352	44.2205	10.9992
	HCl 0.07M				11.3410

### 5.3.2. Suero clínico y ampollas de suero convencional

El motivo de realizar un análisis de suero se debe a que está contenido en recipientes de plástico y ha podido ocurrir la migración de fenol y BPA. Entre las muestras problema de suero (Figura 5), se dispone de una bolsa, un gotero y 7 ampollas para ojos con distinta fecha de caducidad (Tabla 4).

En las ampollas no existe dificultad para extraer una pequeña cantidad y conservar el resto del suero dentro de las mismas, pero tanto en la bolsa como en el gotero se necesitan aguja y jeringa para ello.



**Figura 5.** Envases de suero analizados (de izquierda a derecha): gotero y bolsa de suero clínico, ampollas de suero convencional (A-F), y ampolla de suero secretor de lagrimas artificiales (G).

**Tabla 4.** Fecha de caducidad de los envases de suero.

MUESTRA	Gotero	Bolsa	Ampollas						
			A	B	C	D	E	F	G
Fecha de caducidad	04/18	05/14	11/13	11/13	11/13	05/13	06/16	06/16	05/20

## 5.4. MUESTRAS PARA EL DISEÑO DE EXPERIMENTOS

Para realizar el diseño de experimentos, únicamente se utiliza una disolución pero en distintas condiciones de trabajo de la separación cromatográfica (temperatura de la columna y flujo y composición de la fase móvil).

La disolución empleada para ello se prepara a partir de las disoluciones madre de fenol y BPA, añadiendo 100 y 60  $\mu\text{L}$  respectivamente de cada una de ellas a un matraz de 50 mL con ayuda de una micropipeta y a continuación se enrasa con agua MilliQ. Esta disolución se nombra como BF0 y presenta una concentración de 961.0 ppb de fenol y 404.5 ppb de BPA.

## 6. RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados obtenidos estructurados según las partes llevadas a cabo en este trabajo: la optimización del método de análisis cromatográfico, la construcción y validación de las rectas de calibrado para el fenol y el BPA, así como la determinación del contenido migrado de ambos en las muestras problema.

### 6.1. OPTIMIZACIÓN MEDIANTE EL DISEÑO DE EXPERIMENTOS D-ÓPTIMO

Como ya se ha comentado anteriormente, en este trabajo se ha realizado un diseño de experimentos D-óptimo para optimizar las condiciones cromatográficas (temperatura de la columna, y flujo y composición de la fase móvil) que permitan obtener áreas de picos máximas y tiempos de retención mínimos.

Para evaluar el efecto de los tres factores (con tres y cuatro niveles) se utiliza el modelo de la Ecuación 4.

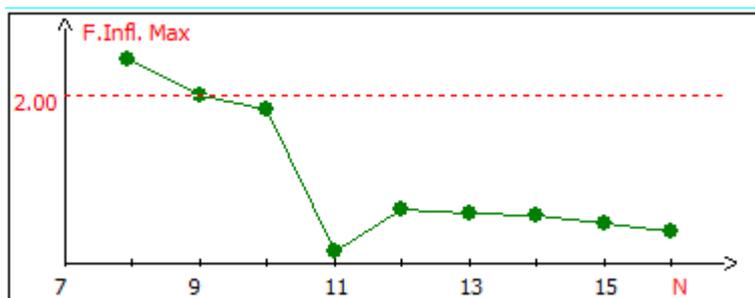
$$y = \beta_0 + \beta_{1A}x_{1A} + \beta_{1B}x_{1B} + \beta_{2A}x_{2A} + \beta_{2B}x_{2B} + \beta_{3A}x_{3A} + \beta_{3B}x_{3B} + \beta_{3C}x_{3C} + \varepsilon \quad (4)$$

En la Ecuación 4, mediante las variables binarias,  $x_{ij}$ , se codifican los niveles de los factores del modo que se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Codificación de los niveles en el modelo de la Ecuación 4.

Factor i (i=1 ó 2)			Factor 3			
<b>Nivel A</b>	$x_{1A} = 1$	$x_{1B} = 0$	<b>Nivel A</b>	$x_{3A} = 1$	$x_{3B} = 0$	$x_{3C} = 0$
<b>Nivel B</b>	$x_{1A} = 0$	$x_{1B} = 1$	<b>Nivel B</b>	$x_{3A} = 0$	$x_{3B} = 1$	$x_{3C} = 0$
<b>Nivel C</b>	$x_{1A} = -1$	$x_{1B} = -1$	<b>Nivel C</b>	$x_{3A} = 0$	$x_{3B} = 0$	$x_{3C} = 1$
			<b>Nivel D</b>	$x_{3A} = -1$	$x_{3B} = -1$	$x_{3C} = -1$

En la Figura 6 se representa el valor máximo de VIF para distintas matrices de N experimentos elegidos de los 36 que componen el diseño factorial completo. Se puede observar que se necesitan al menos 9 experimentos para que los valores máximos de los VIF sean inferiores a 2. También se concluye que el mejor valor máximo de VIF se obtiene con N=11, por este motivo se decide realizar un diseño D-óptimo con 11 experimentos distintos, lo cual a su vez permite tener grados de libertad suficientes para la estimación del residuo y realizar el test de fallo de ajuste.



**Figura 6.** Diagrama del valor máximo de VIF frente al número de experimentos N elegidos del diseño factorial completo.

En este caso con los 11 experimentos de la Tabla 6 se tiene un factor de inflación de varianza (VIF) entre 1.31 y 1.82 para las estimaciones de los coeficientes, que son valores muy buenos ya que el mínimo teórico del VIF es 1 y siempre debe ser menor de 4 [35].

**Tabla 6.** Plan de experimentación del diseño D-óptimo.

Experimento del diseño factorial completo	Flujo (mLmin <sup>-1</sup> )	Temperatura (°C)	Fase móvil (v/v) metanol-acetonitrilo-agua
1	0.80	20	65:0:35
5	0.85	30	65:0:35
9	0.90	40	65:0:35
10	0.80	20	70:0:30
15	0.90	30	70:0:30
17	0.85	40	70:0:30
21	0.90	20	0:45:55
23	0.85	30	0:45:55
25	0.80	40	0:45:55
29	0.85	20	0:40:60
31	0.80	30	0:40:60

Los modelos se han construido a partir de la ejecución del plan de experimentación de la Tabla 6 realizando tres réplicas adicionales del experimento número 1. Se ha encontrado un dato anómalo para la respuesta del  $t_r$  del bisfenol A que corresponde al experimento número 10 del diseño factorial completo. En la Tabla 7 se muestran los modelos ajustados para cada una de las respuestas experimentales, para la respuesta  $Y_4$  ( $t_r$  del bisfenol A) sin el dato anómalo.

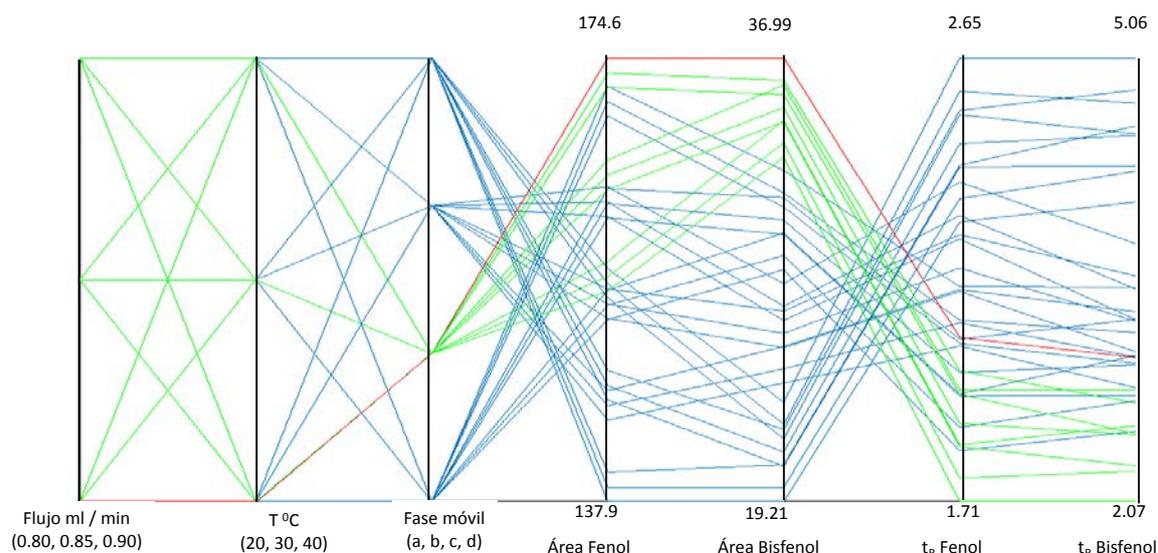
Con estos modelos se ha estimado el valor de las dos áreas y los dos tiempos de retención en todas las posibles condiciones experimentales del diseño factorial completo. En la Figura 7 se muestran en un gráfico de coordenadas paralelas los valores ajustados. Estos gráficos diseñados por Inselberg [39] permiten representar simultáneamente más de tres variables, que es el límite de las habituales representaciones en coordenadas ortogonales.

Estas representaciones introducidas en química analítica por el grupo de investigación de las tutoras de este trabajo [40] se han mostrado de gran utilidad en los análisis de datos cromatográficos con múltiples respuestas [41].

**Tabla 7.** Modelos ajustados para las respuestas experimentales:  $Y_1$  área de pico del fenol,  $Y_2$  área de pico del bisfenol A,  $Y_3$  tiempo de retención del fenol,  $Y_4$  el tiempo de retención del bisfenol A.

	$Y_1$	$Y_2$	$Y_3$	$Y_4$
<b>Test de significación del modelo, p-valor</b>	0.00022	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
<b>Test de fallo de ajuste, p-valor</b>	0.970	0.880	0.141	0.171
<b>Coefficiente de determinación <math>R^2</math> (%)</b>	97.5	98.9	99.9	99.9
<b>Coef. de determinación <math>R^2</math>, en predicción (%)</b>	94.3	96.2	99.2	98.3
$S_{yx}$	2.27	0.71	0.01	0.04
<b>COEFICIENTES ESTIMADOS (en negrita los estadísticamente significativos al 5%)</b>				
$b_0$	<b>157.33</b>	<b>28.16</b>	<b>2.1397</b>	<b>3.3538</b>
$b_{1A}$	<b>8.43</b>	<b>1.20</b>	<b>0.1136</b>	<b>0.2251</b>
$b_{1B}$	-0.01	0.11	0.0016	0.0085
$b_{2A}$	1.23	<b>0.79</b>	<b>0.0640</b>	<b>0.2725</b>
$b_{2B}$	-0.02	-0.11	-0.0071	-0.0331
$b_{3A}$	<b>5.25</b>	<b>2.33</b>	<b>-0.1506</b>	<b>-0.3415</b>
$b_{3B}$	<b>7.61</b>	<b>6.84</b>	<b>-0.2590</b>	<b>-0.8149</b>
$b_{4B}$	<b>-3.06</b>	<b>-2.21</b>	<b>0.0723</b>	-0.0478

En cada uno de los tres primeros ejes de la Figura 7 se representan los niveles de los factores, mientras que en los cuatro siguientes son las respuestas (los valores de las áreas de pico y de los tiempos de retención). Cada línea quebrada une los niveles de uno de los puntos del dominio experimental (los tres niveles de cada uno de los factores) con los valores que le corresponden de las cuatro respuestas. Para facilitar la visibilidad de las líneas, el rango de cada variable se ha transformado de modo que todas estén expresadas en el intervalo codificado [0,1]. Sin embargo se han escrito los valores reales en los extremos de los intervalos de cada variable.



**Figura 7.** Gráfico de coordenadas paralelas. Niveles de los factores en los tres primeros ejes, la codificación para la composición de la fase móvil es: a) 65:0:35, b) 70:0:30, c) 0:45:55 y d) 0:40:60. Valores de las respuestas en los cuatro ejes siguientes. En verde las soluciones del Frente Pareto. En rojo la solución elegida.

La primera observación que se deduce del gráfico es que hay una fuerte interacción entre las áreas de fenol y BPA con los tiempos de retención porque las líneas que unen los valores obtenidos se cortan, de modo que cuando al cambiar las condiciones experimentales de la cromatografía las áreas crecen los tiempos decrecen y viceversa. Sin embargo este efecto no se da entre las áreas, cuando crecen lo hacen las del fenol y BPA al tiempo, aunque en distinta cuantía. Para los tiempos de retención, las líneas en la escala real son casi paralelas y no ocurre ninguna inversión de pico al cambiar las condiciones experimentales.

### **Optimización multirrespuesta mediante el Frente Pareto.**

Ahora se trata de buscar unas condiciones cromatográficas que optimicen las cuatro respuestas, es decir que hagan máximas las áreas de pico del fenol y del BPA y mínimos ambos tiempos de retención. Una opción es construir el Frente Pareto de las soluciones optimales y luego decidir entre las del Frente Pareto en base a criterios prácticos [42,43].

Dadas dos condiciones cromatográficas distintas (i, j), se dice que las respuestas para las condiciones j dominan a las respuestas para las condiciones i (abreviadamente j domina a i) cuando se cumple:

- a)  $\text{Área fenol (i)} \leq \text{Área fenol (j)}$   
 $\text{Área BPA (i)} \leq \text{Área BPA (j)}$   
 $t_r \text{ fenol (i)} \geq t_r \text{ fenol (j)}$   
 $t_r \text{ BPA (i)} \geq t_r \text{ BPA (j)}$
- b) Al menos una de las desigualdades anteriores es estricta

Las soluciones no dominadas forman el Frente Pareto, de hecho respecto de ellas otra solución cualquiera es peor al menos en una de las cuatro respuestas.

El Frente Pareto de las 36 soluciones se muestra en color verde en la Figura 7. Es notable que todas las condiciones cromatográficas que lo forman comparten una característica común, y es que la composición de la fase móvil ha de estar al segundo nivel, 70:0:30. Sin embargo, el flujo y la temperatura pueden tomar cualquiera de los tres niveles.

El análisis de las nueve condiciones cromatográficas del Frente Pareto muestran que todas ellas mantienen el área de pico del BPA por encima de 33 unidades hasta 36.99, y son las áreas más grandes. La diferencia de área entre la mayor y la menor es de un 11%. En función de las condiciones experimentales en las que se trabaje hay mayor diferencia, en valor absoluto, para el área del fenol, que varía de 155 a 174.6 (lo que equivale a una disminución máxima del 11%). Dentro de las soluciones del Frente Pareto (en verde en la Figura 7) se distinguen tres grupos para el área del fenol. De estos se observa que a mayor área, los tiempos de retención de ambos analitos son mayores, y como se quiere minimizar los tiempos de retención, se ha considerado el grupo de las condiciones experimentales que dan áreas mayores para ambos analitos dado que la disminución en el tiempo de retención supone una disminución de más de un 50% en los tiempos de retención de ambos analitos. Las condiciones experimentales cromatográficas para la solución elegida son: flujo de  $0.80 \text{ mLmin}^{-1}$  y temperatura  $20^\circ\text{C}$  (marcada en rojo en la Figura 7) que además es una condición experimental de las del diseño D-óptimo.

En estas condiciones seleccionadas ( $0.80 \text{ mLmin}^{-1}$ ,  $20^\circ\text{C}$  y 70:0:30 para la composición de la fase móvil) se hicieron dos nuevos cromatogramas en dos días distintos obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 8, pudiéndose considerar iguales a lo predicho por el modelo para el primer ensayo, sobre todo si se tiene en cuenta que las áreas no están estandarizadas.

**Tabla 8.** Resultados experimentales en las condiciones cromatográficas optimizadas, siendo  $Y_1$  área de pico del fenol,  $Y_2$  área de pico del bisfenol A,  $Y_3$  tiempo de retención del fenol,  $Y_4$  tiempo de retención del bisfenol A. Entre paréntesis figuran los valores predichos por el modelo.

	$Y_1$	$Y_2$	$Y_3$	$Y_4$
<b>Día 1 (día de análisis)</b>	179.2 (174.6)	38.7 (36.99)	2.033 (2.058)	2.754 (3.036)
<b>Día 2</b>	174.3	36.7	2.048	2.788
<b>Día 3</b>	172.7	36.5	2.038	2.761

## 6.2. CONSTRUCCIÓN Y VALIDACIÓN DE LAS RECTAS DE CALIBRADO

Una vez elegidas las condiciones cromatográficas óptimas para llevar a cabo la determinación de fenol y BPA migrado ( $0.8 \text{ mLmin}^{-1}$  de flujo,  $20^\circ\text{C}$  de temperatura, 70:0:30 (v/v) de composición), se realiza el análisis de las disoluciones patrón. Con ello se pretende construir y validar una recta de calibrado para cada uno de los analitos.

Inicialmente, se parte de las disoluciones patrón y las correspondientes áreas calculadas con el software incorporado en el equipo cromatográfico que se muestran en la Tabla 9. Como se puede observar se han realizado réplicas de los patrones 0, 1, 7 y 8 para evaluar el fallo de ajuste del método. Además, hay que tener en cuenta que la ausencia de pico en el tiempo de retención correspondiente a cada analito se considera un área de pico igual a 0.

**Tabla 9.** Disoluciones patrón para la construcción de las rectas de calibrado.

ETIQUETA	$C_F$ (ppb)	Area <sub>F</sub>	$C_B$ (ppb)	Area <sub>B</sub>
<b>0</b>	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>0rep</b>	0.0	0.0	0.0	0.0
<b>1</b>	57.7	6.7	53.9	6.4
<b>1rep</b>	57.7	6.8	53.9	6.1
<b>2</b>	96.1	11.6	107.9	11.3
<b>3</b>	153.8	23.7	134.8	12.0
<b>4</b>	211.4	39.9	188.8	15.4
<b>5</b>	249.9	45.1	242.7	23.1
<b>6</b>	307.5	52.4	296.6	29.1
<b>7</b>	346.0	55.9	350.6	31.3
<b>7rep</b>	346.0	55.6	350.6	31.3
<b>8</b>	403.6	80.0	404.5	36.9
<b>8rep</b>	403.6	79.9	404.5	36.4

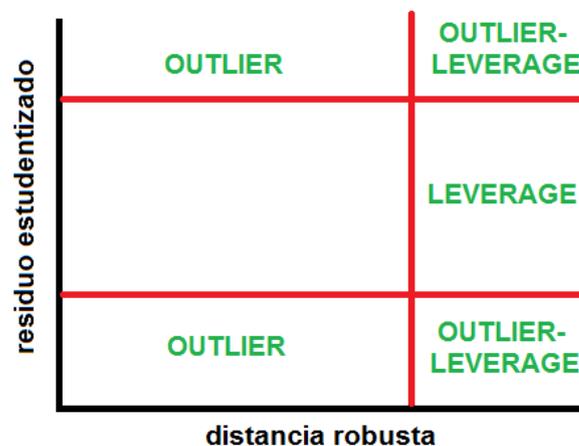
La construcción de estas rectas se va a basar en la regresión robusta univariante, es decir, que mediante un análisis robusto de los datos experimentales se va a identificar los datos anómalos para su posterior eliminación, asegurando que se tienen las condiciones idóneas para obtener la mejor solución (máximo verosímil) por mínimos cuadrados.

Se pueden encontrar tres tipos de datos anómalos: outlier o anómalos en el eje Y, leverage o anómalos en el eje X, y outlier-leverage o anómalos en los dos ejes. Los criterios que siguen los puntos experimentales para ser considerados anómalos de uno u otro tipo son los siguientes:

- Índice robusto o distancia robusta (RD) para diagnosticar la resistencia que opone un punto experimental a la regresión.
- Residuo estudentizado (RS).

Así un dato es (Figura 8):

- Outlier, cuando cuyo residuo estudentizado sea superior a 2.5 en valor absoluto y además su distancia robusta sea inferior al valor crítico.
- Leverage, cuando su residuo estudentizado sea inferior a 2.5 en valor absoluto, pero su distancia robusta sea superior al valor crítico.
- Outlier-leverage, cuando cuyo residuo estudentizado sea superior a 2.5 en valor absoluto y además su distancia robusta sea superior al valor crítico.

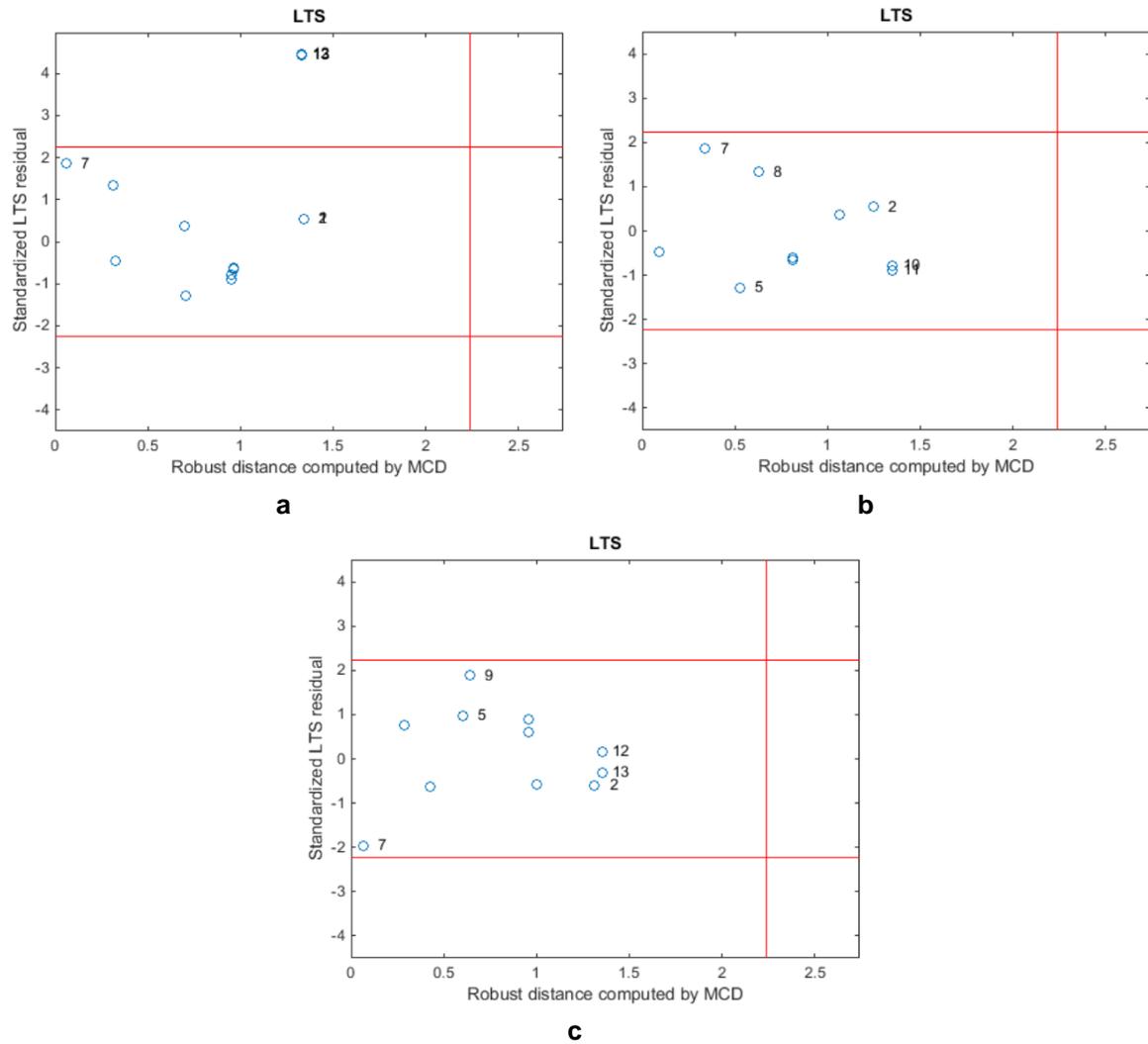


**Figura 8.** Tipos de datos anómalos en regresión robusta univariante.

El método de regresión robusta utilizado es regresión de mínimos cuadrados recortada (LTS), el cual minimiza la suma de los cuadrados de los  $h$  residuos más pequeños, donde  $h$  debe ser al menos la mitad del número de observaciones. El valor predeterminado de  $h$  es aproximadamente  $0,75n$  (siendo  $n$  el número total de observaciones). Se trata de un método robusto en el sentido de que el ajuste de estimación de la regresión no está influenciado indebidamente por los valores anómalos de los datos experimentales, incluso si existiesen varios puntos anómalos.

Para el fenol se obtiene que los puntos 8 y 8rep (correspondientes a los puntos 12 y 13 de la Figura 9.a) son anómalos por presentar un residuo estudentizado alto, es decir, son datos outlier. Se deciden eliminar estos valores y realizar de nuevo la regresión robusta mediante LTS [36]. Ahora no se obtiene ningún dato anómalo (Figura 9.b), por lo que se procede a la construcción de la recta con el resto de valores experimentales mediante mínimos cuadrados (OLS).

Para el BPA no se ha encontrado ningún dato anómalo (Figura 9.c) [36], por lo que se procede a la construcción de la recta con todos los puntos experimentales mediante mínimos cuadrados (OLS).

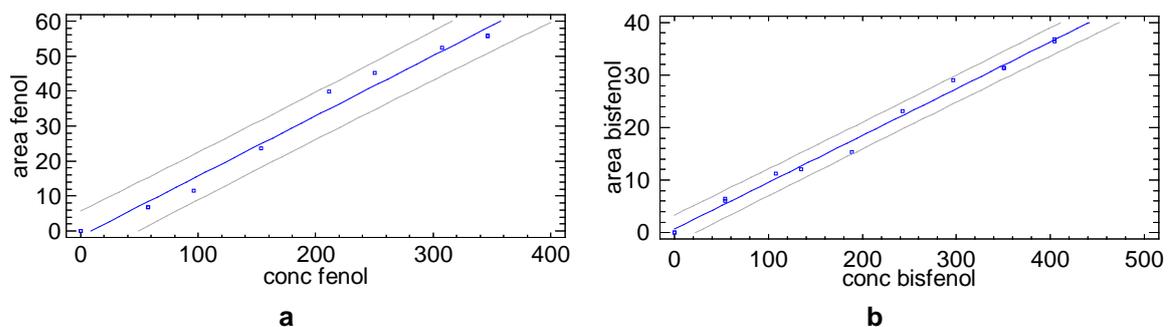


**Figura 9.** Representación del residuo estudentizado frente a la distancia robusta para los valores experimentales para el calibrado a) completo del fenol, b) sin las medidas 8 y 8rep del fenol, c) completo del bisfenol A.

En la Figura 10 se representan las rectas de calibrado construidas para el fenol y el BPA respectivamente [37]. Así como en las Ecuaciones 5 y 6 se describen los modelos ajustados mediante OLS para ambos analitos.

$$\text{Area}_F = -1.47172 + 0.17189C_F \quad (5)$$

$$\text{Area}_B = 0.639423 + 0.0892257C_B \quad (6)$$



**Figura 10.** Rectas de calibrado del a) fenol, b) bisfenol A.

Para validar estas rectas se debe realizar un análisis de los residuos (normalidad, independencia, homogeneidad de varianzas por niveles), un test de significación y otro de fallo de ajuste del modelo, además de la identificación de datos anómalos, lo cual ya se ha realizado mediante el método de regresión robusta LTS.

### Residuos.

Debido a que el estudio de homogeneidad de varianzas se realiza cuando existen réplicas y en este caso sólo hay réplicas para tres valores de concentración, se decide obviar el análisis de esta parte de la validación.

La normalidad de los residuos se evalúa mediante distintos test de normalidad y bondad de ajuste cuyas hipótesis nula ( $H_0$ ) y alternativa ( $H_a$ ) son las siguientes. Todos los test de este trabajo se realizan al 95% de confianza, cuya hipótesis nula  $H_0$  se rechaza cuando el estadístico p-valor sea inferior a 0.05.

$H_0$ : los residuos siguen una distribución normal

$H_a$ : los residuos no siguen una distribución normal

Como se puede observar a partir de los p-valores recogidos en la Tabla 10, los residuos de ambas rectas construidas se ajustan a una distribución normal.

**Tabla 10.** Estadísticos p-valor para el estudio de normalidad de los residuos.

FENOL		BISFENOL A	
Test	P-Value	Test	P-Value
Chi-Square	0.193784	Chi-Square	0.104152
Shapiro-Wilk W	0.304903	Shapiro-Wilk W	0.398987
Skewness Z-score	0.470092	Skewness Z-score	0.974864
Kurtosis Z-Score	-	Kurtosis Z-Score	-

La independencia de los residuos se estudia mediante el test de Durbin-Watson cuyas hipótesis nula y alternativa son:

$H_0$ : los residuos no están correlacionados

$H_a$ : existe correlación positiva entre los residuos

Como los p-valores son 0.0137 y 0.2681, para el fenol y el BPA respectivamente, significa que los residuos del calibrado del fenol están correlacionados mientras que los residuos del calibrado del BPA son independientes.

### Modelo.

Los parámetros característicos de los modelos construidos para el fenol y el BPA se recogen en la Tabla 11. Se puede observar para ambos analitos que la variabilidad de la respuesta experimental explicada por el modelo estimado es muy alta. Por otro lado, la desviación típica residual es bastante grande.

**Tabla 11.** Parámetros de las rectas de calibrado.

PARÁMETROS	FENOL	BISFENOL A
Término independiente	-1.47	0.64
Pendiente	0.172	0.089
Varianza explicada ( $R^2$ )	98.62	99.39
Desviación típica residual ( $s_{yx}$ )	2.85	1.11

Para evaluar la significación, y el fallo de ajuste (cuando existen réplicas), del modelo se utilizan los siguientes test de hipótesis. En base a los estadísticos p-valor que se muestran en la Tabla 12, se puede afirmar que ambos modelos son significativos.

- $H_0$ : el modelo no es significativo
- $H_a$ : el modelo es significativo

Estos modelos se van a utilizar en el apartado 6.3 *Migración de fenol y bisfenol A en las muestras problema* para predecir el contenido migrado de fenol y BPA desde juguetes y desde envases de suero.

**Tabla 12.** Análisis de la varianza de las rectas de calibrado.

Source	FENOL					BISFENOL A				
	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
Model	5245.27	1	5245.27	644.77	0.0000	2194.88	1	2194.88	1781.42	0.0000
Residual	73.22	9	8.14			13.55	11	1.23		
Lack-of-Fit	73.17	6	12.19	731.66	0.0001	13.38	7	1.91	44.99	0.0012
Pure Error	0.05	3	0.017			0.17	4	0.043		
Total (Corr.)	5318.49	10				2208.43	12			

### Límite de decisión ( $CC\alpha$ ) y capacidad de detección ( $CC\beta$ )

Un análisis de determinación se considera no conforme si se supera el límite de decisión ( $CC\alpha$ ) del método de confirmación para el analito correspondiente. Al existir un límite establecido (PL) que no está permitido sobrepasar de una sustancia, el límite de decisión se define como la concentración por encima de la cual puede decidirse con una certeza estadística de  $1-\alpha$ , que el límite permitido se ha sobrepasado (siendo  $\alpha$  un 5%) [33,44].

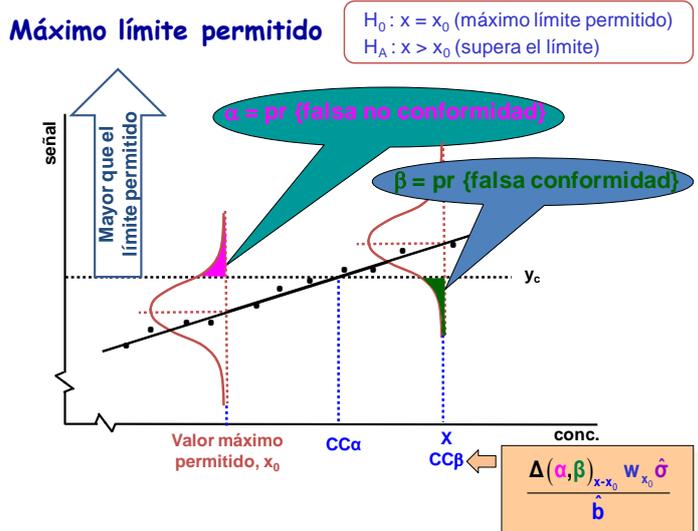
La capacidad de detección ( $CC\beta$ ) indica el contenido mínimo de la sustancia de interés que se puede cuantificar en una muestra con una probabilidad de error  $\beta$  (siendo  $\beta$  un 5%). En el caso de sustancias con un límite permitido establecido, significa que la capacidad de detección es la concentración a la que el método es capaz de detectar concentraciones del límite permitido con una certeza estadística de  $1-\beta$ .

Por lo tanto, la decisión de cumplimiento o no se realiza mediante el siguiente test de hipótesis unilateral:

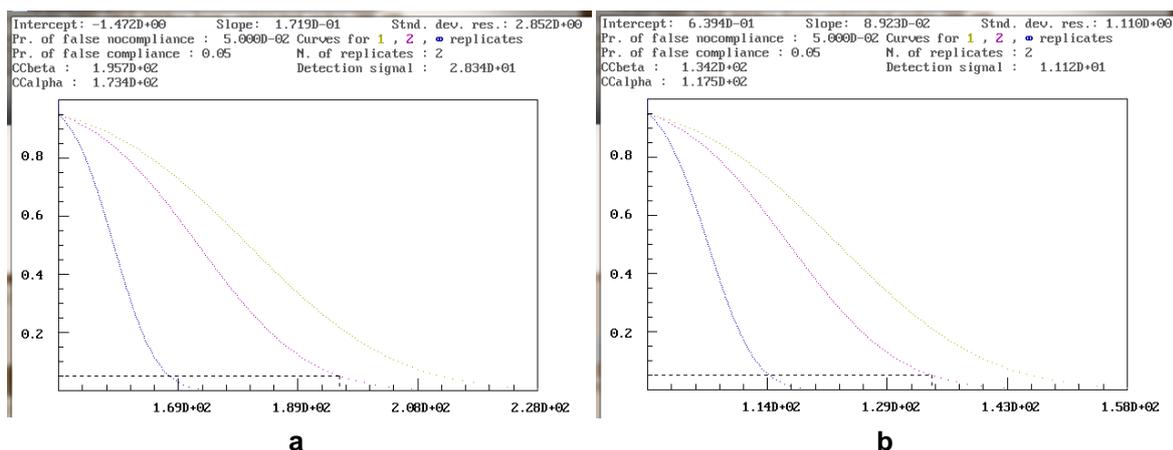
- $H_0$ :  $x = x_0$  (máximo límite permitido)
- $H_a$ :  $x > x_0$  (la concentración del analito es mayor que el límite permitido)

Así,  $\alpha$  y  $\beta$  son las probabilidades de falso no-cumplimiento y de falso cumplimiento respectivamente. Estos conceptos, junto con la región crítica ( $y_c$ ) se muestran en la Figura 11.

En las Figura 12.a y 12.b se representan las curvas correspondientes al cálculo del límite de decisión ( $CC\alpha$ ) y la capacidad de detección ( $CC\beta$ ) que ocupa a este trabajo, es decir, para los calibrados construidos anteriormente del fenol y del BPA siendo la concentración límite en la disolución acuosa de migración permitida ( $x_0$ ) 100 ppb para el BPA y 150 ppb para el fenol. Teniendo en cuenta el rango de concentraciones del calibrado para el fenol (0-350 ppb), se ha decidido determinar  $CC\alpha$  y  $CC\beta$  en un límite  $x_0=150$  ppb (1/100 veces el límite legal que es 15 ppm). Los resultados obtenidos han sido: 117.5 y 134.2 ppb respectivamente para el BPA y 173.4 y 195.7 ppb para el fenol.



**Figura 11.** Test de hipótesis para decidir, usando el modelo de calibrado para una señal univariante, si en una muestra el límite permitido se sobrepasa.



**Figura 12.** Representación del límite de decisión ( $CC_\alpha$ ) y la capacidad de detección ( $CC_\beta$ ) en los límites en la disolución acuosa de migración permitidos para a) fenol y b) bisfenol A.

### 6.3. MIGRACIÓN DE FENOL Y BISFENOL A EN LAS MUESTRAS PROBLEMA

Las muestras problema analizadas se han decidido nombrar de la siguiente manera. En el caso de los juguetes (ardilla, muñeca, pony y soldados) se ha etiquetado con el correspondiente método de extracción utilizado (ácido clorhídrico o agua). Para las muestras de suero clínico o suero farmacéutico, se van a distinguir como Ojos las correspondientes a las distintas ampollas (A-G) de suero fisiológico de uso farmacéutico en ojos, y como Bolsa y Gotero las muestras de suero clínico contenido en dichos tipos de envase.

En la Tabla 13 se recogen las características (tiempo de retención y área) de los picos cromatográficos encontrados para cada una de las muestras problema. Como se puede observar en alguna de las muestras aparecen dos filas para la misma muestra, esto se debe a que en el cromatograma apareció un desdoblamiento del pico y al ser integrado el

software lo reconoce como dos picos independientes con sus tiempos y áreas respectivos. Más adelante se analizará individualmente cada uno de estos casos. Además en esta misma tabla se muestra la concentración del analito que ha migrado a la solución desde los juguetes o desde el envase del suero, calculada a partir de los modelos de calibración validados en el apartado 6.2 *Construcción y validación de las rectas de calibrado*.

**Tabla 13.** Características de los picos cromatográficos encontrados en las muestras problema.

MUESTRA PROBLEMA	FENOL			BISFENOL A		
	Tiempo (min)	Área	Conc (ppb)	Tiempo (min)	Área	Conc (ppb)
Ardilla H <sub>2</sub> O	2.045	3.5	28.92	2.676	0.650	0.12
Ardilla H <sub>2</sub> O				2.820	0.120	-5.82
Muñeca H <sub>2</sub> O	2.052	2	20.20	–	–	–
Pony H <sub>2</sub> O	2.071	9.3	62.67	–	–	–
Soldados H <sub>2</sub> O	–	–	–	–	–	–
Ardilla HCl	–	–	–	–	–	–
Muñeca HCl	–	–	–	–	–	–
Pony HCl	–	–	–	–	–	–
Soldados HCl	–	–	–	–	–	–
OjosA	2.074	30.5	186.00	–	–	–
OjosB	2.033	5.1	38.23	–	–	–
OjosB	2.080	7.1	49.87	–	–	–
OjosC	2.025	4.9	37.07	–	–	–
OjosC	2.072	6.2	44.63	–	–	–
OjosD	2.076	101.7	600.22	–	–	–
OjosE	2.078	45.2	271.52	–	–	–
OjosF	2.078	44.7	268.61	–	–	–
OjosG	2.064	4.6	35.32	–	–	–
Bolsa	2.065	1.1	14.96	–	–	–
Gotero	2.079	7.5	52.19	–	–	–

Analizando los resultados de la Tabla 13, se puede determinar que no ha migrado BPA de ninguno de los juguetes ni de los envases de suero, ya que únicamente el software detecta un pico que puede integrar para la muestra de la ardilla en agua. Este es un ejemplo de desdoblamiento del pico, para el cual se concluye que no hay contenido de BPA en la muestra.

Para el estudio del fenol, se observa que desde los juguetes este analito migra en agua pero no en HCl (simulante para saliva). Además esto sucede en todos los juguetes menos en los soldados. En el caso de las muestras de suero, se determina que todas presentan fenol. Se ha observado un desdoblamiento de pico en las muestras OjosB y OjosC, las cuales se deciden obviar porque se desconoce i) el área total que tendría en caso de ser un solo pico, y ii) podría haber algún interferente que también presente emisión fluorescente a ese tiempo de retención.

Tras el análisis de los resultados obtenidos para las muestras de suero se puede afirmar que difiere bastante el contenido migrado en las muestras de suero convencional para ojos (OjosA-OjosF) de las muestras OjosG (un suero especial para segregar lágrimas artificiales) y Bolsa y Gotero (suero de uso clínico). No se ha observado ninguna pauta clara de los datos obtenidos en relación a la fecha de caducidad de las ampollas de suero para ojos.

## 7. CONCLUSIONES

Las conclusiones alcanzadas en este trabajo son las siguientes:

- Gracias a la metodología de diseño de experimentos, mediante un diseño D-óptimo se ha reducido el número de experimentos de 36 a 11 experimentos, lo que implica un ahorro de tiempo y reactivos considerable.
- Las condiciones óptimas encontradas para maximizar el área de los picos de ambos analitos, para un diseño de 3 factores (dos a 3 niveles y uno a 4 niveles), han sido  $0.8 \text{ mLmin}^{-1}$  para el flujo,  $20^\circ\text{C}$  para la temperatura de la columna y 70:0:30 metanol-acetonitrilo-agua para la composición de la fase móvil.
- Los modelos de calibrado son válidos para el rango lineal entre 0 y 350 ppb y entre 0 y 400 ppb para el fenol y BPA respectivamente.
- El límite de decisión ( $CC\alpha$ ) y la capacidad de detección ( $CC\beta$ ), para el límite permitido en la disolución acuosa de migración, son 117.5 y 134.2 ppb respectivamente para el BPA (al límite de 100 ppb establecido en la normativa) y 173.4 y 195.7 ppb para el fenol (al límite de 150 ppb).
- En los 4 juguetes estudiados no se ha encontrado contenido migrado de BPA en ninguno de los simulantes de las posibles vías de contacto. Se ha encontrado fenol migrado desde la mayoría de estos juguetes en agua pero no en HCl 0.07M que es el simulante para la saliva.
- En el caso del suero tampoco se ha encontrado contenido de BPA, sin embargo, sí presenta contenido de fenol: OjosA 186.00 ppb, OjosD 600.22 ppb, OjosE 271.52 ppb, OjosF 268.61 ppb, OjosG 35.32 ppb, Bolsa 14.96 ppb, y Gotero 52.19 ppb.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] N. D. Shrinithiviahshini, D. Mahamuni, N. Praveen (2014). Bisphenol A migration study in baby feeding bottles of selected brands available in the Indian market. *Current Science*, Vol. 106, 8, 1081-1084.
- [2] M. I. Santillana, E. Ruiz, M. T. Nieto, J. Bustos, J. Maia, R. Sendón, J. J. Sánchez (2011). Migration of bisphenol A from polycarbonate baby bottles purchased in the Spanish market by liquid chromatography and fluorescence detection. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 28, 11, 1610-1618.
- [3] Xu-Liang Cao, J. Coriveau (2008). Migration of Bisphenol A from Polycarbonate Baby and Water Bottles into Water under Severe Conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6378-6381.
- [4] C. Brede, P. Fjeldal, I. Skjevraak, H. Herikstad (2003). Increased migration levels of bisphenol A from polycarbonate baby bottles after dishwashing, boiling and brushing. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 20, 7, 684-689.

- [5] Z. A. Moghadam, M. Mirlohi, H. Pourzamani, A. Malekpour, Z. Amininoor, M. R. Merasi (2015). Exposure assessment of Bisphenol A intake from polymeric baby bottles in formula-fed infants aged less than one year. *Toxicology Reports*, 2, 1273-1280.
- [6] C. Kubwabo, I. Kosarac, B. Stewart, B. R. Gauthier, K. Lalonde, P. J. Lalonde (2009). Migration of bisphenol A from plastic baby bottles, baby bottle liners and reusable polycarbonate drinking bottles. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 26, 6, 928-937.
- [7] J. Maia, J. M. Cruz, R. Sendón, J. Bustos, J. J. Sanchez, P. Paseiro (2009). Effect of detergents in the release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles. *Food Research International*, 42, 1410-1414.
- [8] K. A. Ehlert, C. W. E. Beumer, M. C. E. Groot (2008). Migration of bisphenol A into water from polycarbonate baby bottles during microwave heating. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 25, 7, 904-910.
- [9] S. Biedermann-Brem, K. Grob, P. Fjeldal (2008). Release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles: mechanisms of formation and investigation of worst case scenarios. *European Food Research and Technology*, 227, 1053-1060.
- [10] M. I. Santillana, E. Ruiz, M. T. Nieto, A. Rodríguez Bernaldo de Quirós, R. Sendón, M. E. Cirugeda, J. J. Sanchez (2013). Polycarbonate baby bottles: study of the release of Bisphenol A. *European Food Research and Technology*, 236, 883-889.
- [11] S. Biedermann-Brem, K. Grob (2009). Release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles: water hardness as the most relevant factor. *European Food Research and Technology*, 228, 679-684.
- [12] Sung-Hyun Nam, Young-Min Seo, Man-Goo Kim (2010). Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere*, 79, 949-952.
- [13] A. Guart, F. Bono-Blay, A. Borrell, S. Lacorte (2011). Migration of plasticizersphthalates, bisphenol A and alkylphenols from plastic containers and evaluation of risk. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 28, 5, 676-685.
- [14] Ying-Ying Fan, Jian-Lun Zheng, Jing-Hua Ren, Jun Luo, Xin-Yi Cui, Lena Q. Ma (2014). Effects of storage temperature and duration on release of antimony and bisphenol A from polyethylene terephthalate drinking water bottles of China. *Environmental Pollution*, 192, 113-120.
- [15] C. Nerín, C. Fernández, C. Domeño, J. Salafranca (2003). Determination of potential migrants in polycarbonate containers used for microwave ovens by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5647-5653.
- [16] M. L. Oca, M. C. Ortiz, A. Herrero, L. A. Sarabia (2013). Optimization of a GC/MS procedure that uses parallel factor analysis for the determination of bisphenols and their diglycidyl ethers after migration from polycarbonate tableware. *Talanta*, 106, 266-280.
- [17] M. L. Oca, L. A. Sarabia, A. Herrero, M. C. Ortiz (2014). Optimum pH for the determination of bisphenols and their corresponding diglycidyl ethers by gas chromatography–mass spectrometry. Migration kinetics of bisphenol A from polycarbonate glasses. *Journal of Chromatography A*, 1360, 23-38.
- [18] C. Bignardi, A. Cavazza, C. Laganà, P. Salvadeo, C. Corradini (2015). UHPLC-high-resolution mass spectrometry determination of bisphenol A and plastic additives released by polycarbonate tableware: influence of ageing and surface damage. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407, 7917-7924.

- [19] Duck Soo Lim, Seung Jun Kwack, Kyu-Bong Kim, Hyung Sik Kim, Byung Mu Lee (2009). Potential Risk of Bisphenol A Migration From Polycarbonate Containers After Heating, Boiling, and Microwaving. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Parte A*, 72, 1285-1291.
- [20] J. López-Cervantes, P. Paseiro-Losada (2003). Determination of bisphenol A in, and its migration from, PVC stretch film used for food packaging. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 20, 6, 596-606.
- [21] T. Yamamoto, A. Yasuhara (1999). Quantities of Bisphenol A leached from plastic waste samples. *Chemosphere*, Vol. 38, 11, 2569-2576.
- [22] P. Viñas, I. López-García, N. Campillo, R. E. Rivas, M. Hernández-Córdoba (2012). Ultrasound-assisted emulsification microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry using the Taguchi design method for bisphenol migration studies from thermal printer paper, toys and baby utensils. *Food Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404, 671-678.
- [23] R. Troiano (PerkinElmer), W. Goodman (PerkinElmer) (2009). UHPLC separation and detection of bisphenol A (BPA) in plastics. Application Note of PerkinElmer: Liquid Chromatography.
- [24] Chi Man Ng, Wilhad M. Reuter (2015). Analysis of Bisphenol A in Toys by HPLC with Fluorescence Detection. Application Note of PerkinElmer: Liquid Chromatography.
- [25] UNE-CEN/TS 13130-13, Materiales y artículos en contacto con alimentos. Sustancias en materias plásticas sujetas a limitaciones. Parte 13: Determinación de 2,2-bis(4-hidroxifenil)propano (Bisfenol A) en simulantes de alimentos, 2006.
- [26] UNE-EN 71-10, Seguridad de los juguetes. Parte 10: Compuestos químicos orgánicos. Preparación y extracción de muestras, 2006.
- [27] UNE-EN 71-11, Seguridad de los juguetes. Parte 11: Compuestos químicos orgánicos. Métodos de análisis, 2006.
- [28] UNE-EN 14372, Artículos de puericultura. Cubiertos y utensilios para la alimentación. Requisitos de seguridad y ensayos, 2005.
- [29] UNE-EN 71-9, Seguridad de los juguetes. Parte 9: Compuestos químicos orgánicos. Requisitos, 2006.
- [30] R. Cela, R. A. Lorenzo y M. C. Casais, Técnicas de separación en Química Analítica, Editorial Síntesis, Madrid, 2002.
- [31] D. A. Skoog, F. J. Holler y T. A. Nieman, Cromatografía de líquidos de alta eficiencia, en "Principios de Análisis Instrumental" (5ª edición), McGraw Hill, Madrid, 2001.
- [32] L. Sarabia, M. C. Ortiz, Response surface methodology, en "Comprehensive Chemometrics: Chemical and biochemical data analysis", S. D. Brown, R. Tauler, B. Walczak, Elsevier, Amsterdam, 2009, pp 378-382.
- [33] G. A. Lewis, D. Mathieu, R. Phan-Tan-Luu, Pharmaceutical Experimental Design, Marcel Dekker, New York, 1999.
- [34] P. F. De Aguiar, B. Bourguignon, M. S. Khost, D. L. Massart, R. Phan-Tan-Luu (1995). D-Optimal designs. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 30, 199-210.
- [35] D. Mathieu, J. Nony, R. Phan-Tan-Luu (2007). NEMRODOW, Versión 2007\_03, L.P.R.A.I. Marsella, Francia.
- [36] MATLAB, Versión 7.12.0.635 (R2011a), The Mathworks, Inc., Natick, MA, USA.

- [37] STATGRAPHICS Centurion XVI Versión 16.2.04 (64 bit). Statpoint Technologies, Inc. 2013.
- [38] L.A. Sarabia, M.C. Ortiz (1994). DETARCHI: A program for detection limits with specified assurance probabilities and characteristic curves of detection. *Trends in Analytical Chemistry*, 13, 1-6.
- [39] A. Inselberg, *Parallel Coordinates: Visual Multidimensional Geometry and Its Applications*, Springer, Dordrecht, Heidelberg, 2009.
- [40] M. C. Ortiz, L. A. Sarabia, M. S. Sánchez, D. Arroyo (2011). Improving the visualization of the Pareto-optimal front for the multi-response optimization of chromatographic determinations, *Analytica Chimica Acta*, 687, 129-136.
- [41] A. Herrero, C. Reguera, M. C. Ortiz, L. A. Sarabia, M. S. Sánchez (2014). Ad-hoc blocked design for the robustness study in the determination of dichlobenil and 2,6-dichlorobenzamide in onions by programmed temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1370, 187-199.
- [42] M. S. Sánchez, M. C. Ortiz, L. A. Sarabia, R. Lletí (2005). On Pareto-optimal fronts for deciding about sensitivity and specificity in class-modelling problems, *Analytica Chimica Acta*, 544, 236-245.
- [43] C. Reguera, M. S. Sánchez, M. C. Ortiz, L. A. Sarabia (2008). Pareto-optimal front as a tool to study the behaviour of experimental factors in multi-response analytical procedures, *Analytica Chimica Acta*, 624, 210-222.
- [44] M. C. Ortiz, L. A. Sarabia, M. S. Sánchez (2010). Tutorial on evaluation of type I and type II errors in chemical analyses: From the analytical detection to authentication of products and process control. *Analytica Chimica Acta*, 674, 123-142.