



Universidad de Jaén

Escuela de Doctorado

TESIS DOCTORAL



**IMPLEMENTACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA LA
DETERMINACIÓN DE DISRUPTORES ENDOCRINOS
EN PRODUCTOS LÁCTEOS MEDIANTE TÉCNICAS
CROMATOGRÁFICAS ACOPLADAS A
ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

**PRESENTADA POR:
LAURA PALACIOS COLÓN**

**DIRIGIDA POR:
EVARISTO ANTONIO BALLESTEROS TRIBALDO
ANDRÉS JESÚS RASCÓN LÓPEZ**

JAÉN, Junio de 2023

ISBN

IMPLEMENTACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN DE
DISRUPTORES ENDOCRINOS EN PRODUCTOS LÁCTEOS MEDIANTE TÉCNICAS
CROMATOGRÁFICAS ACOPLADAS A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Director

Director

Fdo: Evaristo Antonio Ballesteros Tribaldo

Fdo: Andrés Jesús Rascón López

Catedrático de Universidad

Doctor

Memoria presentada para aspirar al Grado de

Doctor por la Universidad de Jaén

Laura Palacios Colón

Jaén, 2023

D. Evaristo Antonio Ballesteros Tribaldo, Catedrático de Universidad, y D. Andrés Jesús Rascón López, doctor, del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Jaén, en calidad de Directores de la Tesis Doctoral presentada por la Graduada D. Laura Palacios Colón

CERTIFICA: Que la Tesis Doctoral “Implementación de metodologías para la determinación de disruptores endocrinos en productos lácteos mediante técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas” ha sido desarrollada totalmente en el laboratorio del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Jaén y que, a su juicio, reúne todos los requisitos exigidos a este tipo de trabajo.

Y para que conste y surta efectos pertinentes, expiden el presente certificado en la ciudad de Linares a 14 de Junio de 2023.

Fdo.: Evaristo Antonio Ballesteros Tribaldo

Fdo.: Andrés Jesús Rascón López

Agradecimientos

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a las personas que lo han hecho posible, y siempre han estado apoyándome hasta el final.

En primero lugar quiero dar las gracias a mis directores, Evaristo Ballesteros y Andrés Rascón, gracias por la oportunidad de realizar la Tesis, por enseñarse tanto y apoyarme en cada minuto. Ha sido una suerte tener unos directores como vosotros, siempre os estaré agradecida.

Antonio Molina y Juan Francisco García, gracias por el apoyo que me habéis brindado, fuisteis mis profesores de Química Analítica, y de ahí nació mi vocación por esta rama de la química.

A Antonio Ortiz, Ruperto Bermejo y Rafael Cuesta, por el apoyo y por el café de las 11:30 h.

A mis compañeros de laboratorio, Mamen, Ana Belén, Ana, Andrés, Raquel, Safae y Beatriz, han sido muchos los días que hemos pasado juntos, y siempre con buen ambiente, ayudándonos mutuamente y aprendiendo unos de los otros, sois un buen ejemplo de compañerismo y más que compañeros sois mis amigos.

A mis compañeros del Grupo de Investigación FQM-323, David, Bienvenida, Delia, Ana, Priscila, Alfonso, Irene y Marcos, aunque estaba en Linares, siempre os he tenido cuando os he necesitado.

A Pilar, son muchos años los que he pasado en el laboratorio, ha sido una suerte tener una Técnica de apoyo como tú, cada vez que tenía un problema sabía a donde acudir tanto de laboratorio como personal.

A mis amigos, por alegrarse de mis triunfos como si fueran suyos, por celebrar las buenas noticias durante estos años. Los amigos es la familia que uno elige y yo os elegí a vosotros.

A Alberto, has sido mi compañero de vida durante la realización de esta Tesis, gracias por acompañarme y animarme en cada momento, gracias por tanto.

Y por último y más importante, a mis padres, hermanos, cuñados y mis sobrinos. Mi familia es mi apoyo incondicional, los que siempre están y nunca fallan. Son mi motor y mi mayor inspiración. La familia es el pilar fundamental que podemos tener en nuestras vidas. Mis hermanos son el mayor regalo que me pudieron dar mis padres. Gracias por quererme tanto.

Laura Palacios

A mis padres

Por ayudarme a cumplir mis sueños.

Porque los sueños se cumplen.

ÍNDICE

RESUMEN	17
----------------	-----------

SUMMARY	21
----------------	-----------

1 INTRODUCCIÓN	29
-----------------------	-----------

1.1 Principios generales de la Seguridad Alimentaria	29
---	-----------

1.1.1 Contaminación de alimentos	30
----------------------------------	----

1.1.2 Leche, valor nutricional y consumo	36
--	----

1.2 Contaminantes orgánicos en muestras de alimentos: Disruptores endocrinos	40
---	-----------

1.2.1 Mecanismos de acción de los ECDs y riesgos para la salud	41
--	----

1.2.2 Fuentes de los disruptores endocrinos	44
---	----

1.2.3 Disruptores endocrinos y sus propiedades físico-químicas y toxicológicas	45
--	----

1.2.3.1 Plaguicidas organofosforados	45
--------------------------------------	----

1.2.3.2 Parabenos	48
-------------------	----

1.2.3.3 Bisfenoles	51
--------------------	----

1.2.3.4 Contaminantes fenólicos	55
---------------------------------	----

1.2.3.5 Triclosán	58
-------------------	----

1.2.3.6 Hidrocarburos policíclicos aromáticos	59
---	----

1.2.4 Normativas sobre disruptores endocrinos en alimentos	65
--	----

1.3 Metodologías analíticas para la determinación de disruptores endocrinos en alimentos	70
---	-----------

1.3.1 Técnicas de tratamiento de muestras de alimentos	71
--	----

1.3.1.1 Extracción en fase sólida	72
-----------------------------------	----

1.3.1.2 Microextracción en fase sólida	76
--	----

1.3.1.3 Microextracción en fase sólida por tubo	78
---	----

1.3.1.4 Extracción en fase sólida magnética	78
---	----

1.3.1.5 Extracción en fase sólida dispersiva–método QuEChERS	80
--	----

1.3.1.6 Extracción líquido-líquido	82
------------------------------------	----

1.3.1.7 Microextracción dispersiva líquido-líquido	83
--	----

1.3.1.8 Extracción asistida por microondas	86
--	----

1.3.1.9 Extracción asistida por ultrasonidos	87
--	----

1.3.2 Técnicas para la determinación de contaminantes orgánicos en alimentos	87
--	----

1.3.2.1 Cromatografía de gases	88
--------------------------------	----

1.3.2.1.1 Clasificación de CG según la fase estacionaria	89
--	----

1.3.2.1.2 Fases estacionarias de las columnas cromatográficas	90
---	----

1.3.2.1.3 Control de temperatura	91
----------------------------------	----

1.3.2.1.4	Detectores _____	92
1.3.2.1.5	Espectrometría de masas _____	95
1.3.2.1.6	Cromatografía de gases-espectrometría de masas _____	97
1.3.2.1.7	Cromatografía de gases-espectrometría de masas en tándem _____	98
1.3.2.2	Cromatografía líquida en columna _____	100
1.3.2.2.1	Detectores _____	101
1.3.2.2.2	Acoplamiento de la técnica de cromatografía líquida en columna con la espectrometría de masas _____	105
1.3.2.2.2.1	Cromatografía líquida-espectrometría de masas _____	105
1.3.2.2.2.2	Cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem _____	107
1.4	Referencias _____	108

2. DETERMINACIÓN A NIVEL DE TRAZA DE HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS EN PRODUCTOS LÁCTEOS ADQUIRIDOS EN ESPAÑA MEDIANTE LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN UN SISTEMA CONTINUO Y LA DETECCIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS _____ 129

3. VALIDACIÓN Y APLICACIÓN DE UN MÉTODO EXACTO Y SENSIBLE PARA LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y DETERMINACIÓN DE DISRUPTORES ENDOCRINOS EN PRODUCTOS LÁCTEOS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS ____;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

4. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE CONTAMINANTES FENÓLICOS EN PRODUCTOS LÁCTEOS CONSERVADOS EN VARIOS TIPOS DE ENVASES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE GASES-ESPECTROMETRÍA DE MASAS _____;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

5. DETERMINACIÓN DE PARABENOS Y COMPUESTOS FENÓLICOS EN PRODUCTOS LÁCTEOS MEDIANTE EL USO DE UN SISTEMA SPE EN CONTINUO DE DOS PASOS QUE INCLUYE UN SORBENTE DE ELIMINACIÓN DE MATRIZ MEJORADA EN COMBINACIÓN CON UHPLC-MS/MS. ____;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

CONCLUSIONES _____;ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LA INVESTIGACIÓN; ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.

RESUMEN

Resumen

En la presente Tesis Doctoral se ha planteado como objetivo principal la implementación de metodologías para la determinación de disruptores endocrinos (EDCs) en productos lácteos mediante técnicas cromatográficas acopladas a espectrometría de masas. Los EDCs son sustancias exógenas que alteran una o más funciones del sistema endocrino y causan efectos adversos en la salud de un organismo o en su progenie. La selección de EDCs objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral se ha realizado en base a su relevancia a nivel mundial por su alta exposición hacia los humanos. Los EDCs seleccionados han sido las familias de parabenos, plaguicidas organofosforados, compuestos fenólicos e hidrocarburos policíclicos aromáticos. Todos ellos regulados en la actualidad mediante normativas que legislan los EDCs en alimentos.

Dada a la complejidad de la matriz y su determinación a nivel traza, se requiere la combinación de diversas etapas de tratamiento de muestra con el fin de preconcentrar los analitos diana y eliminar la matriz que los contiene. Las técnicas de tratamiento aplicadas en la presente Tesis Doctoral son la extracción líquido-líquido en combinación con una etapa de clean-up y preconcentración a través de la extracción en fase sólida. En la técnica de extracción en fase sólida se han optimizado diferentes materiales adsorbentes con el fin de garantizar la selectividad y sensibilidad del método. Los métodos desarrollados han cumplido con las validaciones analíticas en cuanto a sensibilidad, selectividad, precisión, efecto matriz, robustez y veracidad. Las técnicas de análisis empleadas son cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a espectrometría de masas en tándem.

Los métodos desarrollados se han aplicado a distintas muestras de productos lácteos con diferentes porcentajes de grasas y proteínas y gran variedad de envases. Las muestras analizadas son: leche de vaca, oveja, cabra y ecológica de vaca; yogures, natillas, batidos, nata líquida, quesos, mantequillas y margarinas. Algunos de los resultados a destacar es la presencia de bisfenol A en la mayoría de las muestras analizadas, sin embargo, no ha excedido el límite máximo permitido.

SUMMARY

Summary

The main objective of this Doctoral Thesis is the implementation of methodologies for the determination of endocrine disruptor chemicals (EDCs) in milk and dairy products by chromatographic techniques coupled to mass spectrometry. EDCs are exogenous substances that alter one or more functions of the endocrine system and cause adverse health effects in an organism or its progeny. The selection of EDCs under study in this PhD Thesis was made based on the worldwide impact and human exposure. The selected EDCs are parabens, organophosphorus pesticides, phenolic compounds, and polycyclic aromatic hydrocarbons. Currently, there are regulations that legislate EDCs in food.

Due to the complexity of the matrix and its determination at trace level, the combination of several sample treatment steps are required to preconcentrate the target analytes and remove the matrix. The developed extraction techniques in this Thesis is liquid-liquid extraction in combination with solid phase extraction. For the solid phase extraction, different sorbent materials have been optimized to ensure the selectivity and sensitivity of the method. The developed methods have complied with the analytical validation in terms of sensitivity, selectivity, precision, matrix effect, robustness, and trueness. The analytical techniques used are gas chromatography coupled to mass spectrometry and high-performance liquid-liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.

The different developed methods have been applied to different samples of milk and dairy products with different percentages of fat and protein content and, also, packed in a wide variety of packaging materials. The samples analyzed were cow, sheep, goat, and organic cow's milk; yogurts, custards, milkshakes, liquid cream, cheeses, butters and margarines. Something to highlight is the presence of bisphenol A in most of the analyzed samples, however it did not exceed the maximum permitted limit.

OBJETO DEL TRABAJO

Objeto del trabajo

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral radica en el desarrollo y la validación de diferentes metodologías analíticas para la determinación de disruptores endocrinos en muestras de leche y productos lácteos. Tras una revisión bibliográfica se han estudiado los disruptores endocrinos más importantes, tanto por su exposición como por su toxicidad.

Los objetivos específicos propuestos se enumeran a continuación:

1. Revisión exhaustiva de la bibliografía existente de los disruptores endocrinos tanto información general, como los contaminantes elegidos en la matriz de objeto de estudio.
2. Desarrollo, cuantificación y validación analítica de métodos precisos para la determinación de parabenos, alquilfenoles, fenilfenoles, plaguicidas organofosforados, bisfenoles, triclosán e hidrocarburos policíclicos aromáticos en muestras de leche y productos lácteos.
3. Puesta a punto de un sistema de extracción en fase sólida para eliminar la mayor parte de las interferencias que presentan las matrices, usando y optimizando distintos adsorbentes. Se pretende eliminar el efecto matriz así como aumentar la sensibilidad.
4. Puesta a punto de métodos analíticos basados en cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem para la cuantificación de estos contaminantes a nivel de trazas.
5. Estudio y aplicación de las metodologías propuestas en muestras comerciales de leche y productos lácteos. En concreto, las muestras objeto de estudio son la leche de vaca, cabra y oveja, batidos, natillas, yogures, nata, quesos, mantequillas y margarinas.

Además, se pretende estudiar si los envases de los productos lácteos afectan a la aparición de los diversos contaminantes objeto de estudio en estos tipos de muestras.

CAPÍTULO 1

1 Introducción

1.1 Principios generales de la Seguridad Alimentaria

La Seguridad Alimentaria, según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), “se consigue con alimentos seguros y sistemas alimentarios sostenibles a través de un asesoramiento científico transparente, independiente y fiable” (EFSA, 2023).

En Europa, la legislación alimentaria fue creada para cubrir las necesidades específicas con la finalidad de crear un único mercado europeo. En 1997, la Comisión Europea publicó el “Libro Verde sobre los principios generales de la legislación alimentaria de la Unión Europea”. El objetivo principal de este libro es estimular una reflexión a nivel europeo acerca de la Seguridad Alimentaria y proponer las disposiciones fundamentales de la legislación al sector alimentario. Como se comenta en el Libro Verde “la cadena alimentaria es cada vez más compleja a causa del número creciente de participantes, desde los productores primarios hasta los distribuidores y los minoristas pasando por la industria alimentaria” por lo que es esencial garantizar su inocuidad para el consumidor. Lo que se pretende determinar con el este libro es:

1. Si los reglamentos vigentes responden a las necesidades y a las expectativas de los consumidores, los fabricantes, los comerciantes y los productores.
2. Si los sistemas de control y de inspección funcionan de manera satisfactoria.
3. Cómo se podría seguir desarrollando en el futuro la legislación comunitaria sobre productos alimenticios.

A inicios del 2000, y tras situaciones acaecidas de la Unión Europea, la Comisión Europea dispuso de un nuevo marco jurídico recogido en un Libro Blanco de la Seguridad Alimentaria. En el cual se contenían diversas propuestas de acción comunitaria en un campo específico. Su objetivo principal fue “completar y modernizar la actual legislación alimentaria de la Unión Europea, hacerla más coherente, comprensible y flexible, fomentar una mejor aplicación de la misma y proporcionar mayor transparencia a los consumidores”.

El “Reglamento (CE) N°178/2002, establece los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria (Unión Europea, 2002), se crea la EFSA y se fijan los procedimientos relativos a la Seguridad Alimentaria. Se define el factor de peligro como “todo agente químico, físico o biológico, presente en un alimento o en un pienso, que pueda causar un efecto perjudicial para la salud”. Las principales funciones y objetivos de la EFSA es la evaluación de riesgo, comunicación de manera objetiva y transparente, contribuyendo a un aumento en la confianza del consumidor. La EFSA ha creado una base de datos de riesgos químicos, *Chemical hazards data-OpenFoodTox*, en la que se pretende recopilar todos los datos acerca de la caracterización de riesgos de más de 4000 sustancias químicas diferentes (AECOSAN, 2023).

1.1.1 Contaminación de alimentos

En los últimos años ha aumentado la preocupación por la exposición a contaminantes provenientes de alimentos. Los procesos de producción alimentaria pueden provocar la entrada de sustancias en los alimentos en cualquier momento: durante su fabricación, manipulación, almacenamiento, elaboración o distribución. Los contaminantes también están presentes en el medio ambiente, pudiendo llegar a los alimentos con relativa facilidad. Debido a su facilidad de transporte y estabilidad están ampliamente distribuidos en la sociedad (Codex Alimentarius, 2023).

En este sentido, se ha realizado un enorme número de estudios que demuestran la presencia de nuevas sustancias químicas que se denominan contaminantes químicos. Muchas de estas sustancias han sido clasificadas como altamente persistentes y peligrosas para el medio ambiente, siendo potencialmente cancerígenas, tóxicas y bioacumulables en los seres vivos. Debido al incremento exponencial de la contaminación medioambiental, y la utilización de ciertos productos químicos para incrementar o mejorar la producción agrícola o ganadera, el 17 de mayo del 2001 entró en vigor el Convenio de Estocolmo sobre los contaminantes orgánicos persistentes. La entrada de este Convenio supuso un avance en la lucha global contra la contaminación del planeta, teniendo como objetivo proteger la salud

humana y el medio ambiente (CPRAC, 2023). A continuación, se describen algunos de los contaminantes más importantes en alimentos:

Dioxinas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) incluye a estas sustancias en el grupo de contaminantes orgánicos persistentes (COP). Las dioxinas son un conjunto de compuestos orgánicos que comprenden 75 policlorodibenzo-p-dioxinas (PCDD) y 135 policlorodibenzofuranos (PCDF) congéneres, de los cuales 17 entrañan riesgos toxicológicos. Los PCDD/PCDF son contaminantes no intencionados, es decir, son liberados al medio ambiente al ser subproductos de reacciones no controlados y sin aplicación comercial. Estas sustancias son principalmente subproductos que se forman en las instalaciones de fundición de metales, incineración de materia orgánica en presencia de compuestos que contienen cloro y combustión de combustibles fósiles. Debido a la persistencia y estabilidad química, estos contaminantes se pueden encontrar en suelos, sedimentos y aire. Gracias a sus propiedades lipofílicas se acumulan en la grasa de los animales, entrando en la cadena alimentaria y finalmente, llegando a los seres humanos. El contenido total de PCDD/F se puede detectar fácilmente en todo tipo de alimentos, especialmente en alimentos grasos de origen animal (AECOSAN, 2023; Schrenk & Chopra, 2013). Los PCDF se forman en alimentos tratados a altas temperaturas como consecuencia de la degradación térmica y oxidativa de los componentes naturales de los alimentos como, azúcares, ácido ascórbico, aminoácidos y ácidos poliinsaturados. Se han encontrado concentraciones significativas de PCDF en alimentos como café, conservas, pan tostado y cereales (Jackson & Al-TaHER, 2010).

Bifenilos polibromados y bifenilos policlorados

Los bifenilos polibromados (PBBs) y bifenilos policlorados (PBCs) pertenecen a un grupo de productos químicos conocidos como organohalogenados, ambos son productos químicos intencionados. Los PBBs se aplicaban como aditivos ignífugos en plásticos de una gran variedad de productos, incluidos muebles, textiles, dispositivos electrónicos y otros productos para el hogar. Por otra parte, los PCBs son productos que se utilizaban como

material aislante en equipos eléctricos, aceite de transformadores o disolvente para plaguicidas. Aunque el uso de estos contaminantes está restringido o prohibido en la UE, su liberación al medioambiente se produce principalmente por productos tratados con PBBs y PBCs, por fugas de equipos eléctricos o bien por el desecho inapropiado de equipos obsoletos. Los humanos están expuestos a estos contaminantes a través del consumo de alimentos contaminados como: pescado, arroz, lácteos y productos cárnicos (AECOSAN, 2023; Kodavanti & Loganathan, 2019).

Acrilamida y 3-monocloropropandiol

La acrilamida y el 3-monocloropropandiol (3-MSPD) merecen una atención especial ya que son contaminantes que se producen por procesos térmicos cotidianos. El procesado de alimentos es fundamental para la seguridad y calidad de los alimentos. Sin embargo, las reacciones térmicas pueden conducir a la formación de contaminantes en alimentos. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha clasificado a la acrilamida como probablemente cancerígena para los humanos (Grupo 2A), mientras que al 3-MCPD lo clasifica como posiblemente cancerígenos (Grupo 2B). La exposición a altos niveles de acrilamida puede afectar al sistema nervioso. Las autoridades internacionales consideran que la acrilamida es un problema importante para la Seguridad Alimentaria. La acrilamida se produce durante el calentamiento de alimentos ricos en carbohidratos como patatas fritas, pan, galletas y café. La reacción de Maillard es la principal vía de formación de acrilamida en alimentos (Mencin et al., 2020). La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda no superar unos niveles de concentración de 0.5 µg/kg para el agua de bebida, además la legislación europea recomienda no superar una migración química en envolturas de plástico de 10 µg/kg (Moreno Navarro et al., 2007). También se ha prestado atención a 3-MSPD ya que apareció en aceites vegetales refinados. Debido al uso generalizado de aceites vegetales para procesar alimentos, la exposición de 3-MSPD puede ser elevada (Stadler & Theurillat, 2017). La EFSA estableció una Ingesta Diaria Tolerable (TDI) de 3-MSPD libre y enlazado en 0.8 µg por kg de peso corporal por día (EFSA, 2023).

Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por diferentes géneros de hongos filamentosos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, son contaminantes frecuentes de numerosos productos agrícolas (Al-Jaal et al., 2019). Se sabe que las micotoxinas causan serios problemas de salud a las personas y a los animales. Estas sustancias pueden tener efectos negativos sobre la salud, pudiendo causar cáncer, problemas gastrointestinales y de riñón. Algunas micotoxinas son también inmunodepresoras, reduciendo la resistencia a enfermedades infecciosas (Kebede et al., 2020). La exposición a las micotoxinas puede ocurrir por vía oral, dérmica, respiratoria y parenteral, siendo la vía oral la principal (Al-Jaal et al., 2019). Las micotoxinas aparecen a lo largo de toda la cadena alimentaria, desde los cultivos hasta los alimentos procesados, piensos y alimentos crudos. Los alimentos sin procesar y que son susceptibles a la contaminación por micotoxinas son: cereales, frutas, frutos secos, verduras, granos de café, cacao y especias (AECOSAN, 2023).

Nitratos y nitritos

Los nitratos se han considerado tradicionalmente como contaminantes debido a sus riesgos potenciales. Los nitratos se presentan en muestras ambientales como aguas, suelos, alimentos y productos agrícolas. También se encuentran como aditivo alimentario en sales de sodio o potasio para inhibir el crecimiento microbiano, el curado y desarrollar las características de sabor en pescados y carnes. La seguridad de los nitratos/nitritos en la dieta, ya sea natural o agregada, ha sido de interés durante las últimas décadas. Los nitratos en sí presentan baja toxicidad. Su toxicidad viene determinada por su conversión en nitritos. Los nitratos se pueden reducir fácilmente en nitritos por reducción bacteriana tanto en los alimentos (durante el procesado y el almacenamiento), como en el propio organismo (en la saliva y el tracto gastrointestinal) (Singh et al., 2019; Wikoff et al., 2018). Los nitritos en sangre pueden oxidar el hierro de la hemoglobina a metahemoglobina, inhibiendo el transporte del oxígeno, ocasionando hipoxia en los tejidos. Enfermedades como la diabetes tipo 2 se ha asociado a una ingesta de nitratos/nitritos potenciada por nuestra dieta diaria, siendo uno de los principales problemas de salud no transmisible y de más rápido crecimiento en todo el mundo. Además de la diabetes tipo 2, los nitratos/nitritos pueden estar asociados a

enfermedades cardíacas, enfermedades inflamatorias crónicas y cáncer (Lundberg et al., 2018).

Metales pesados

Los metales pesados son un grupo de elementos químicos que presentan una densidad alta y cierta toxicidad para el ser humano, incluso a concentraciones bajas. La contaminación de los alimentos vegetales por metales pesados, como cadmio (Cd), mercurio (Hg), arsénico (As) y plomo (Pb) se han considerado como una de las principales vías de exposición (AECOSAN, 2023). Los metales pesados provienen principalmente de la minería, la fundición y otros procesos de transformación de minerales. Algunos metales pesados como el Zn y Cu, se han utilizado ampliamente como aditivos para piensos junto a antibióticos para prevenir enfermedades del ganado (Zhai et al., 2023).

La peligrosidad de los metales pesados es mayor ya que no son degradables, ni destruidos fácilmente de forma natural o biológica, ya que no tienen funciones metabólicas específicas para los seres vivos. Una vez emitidos al medioambiente, pueden permanecer durante cientos de años acumulándose en las plantas, contaminando el suelo y acumulándose en los tejidos orgánicos. Además, su concentración en los seres vivos aumenta a lo largo de la cadena alimentaria (AECOSAN, 2023). El cobre (Cu), selenio (Se), zinc (Zn), a nivel de traza, son esenciales para mantener un correcto metabolismo en los seres vivos. Sin embargo, a concentraciones altas produce toxicidad. Los metales pesados pueden incorporarse al medio ambiente por medio de residuos industriales que son vertidos sin previos tratamientos, depositándose en lagos y ríos (Méndez et al., 2009)

Plaguicidas

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) ha definido los plaguicidas como cualquier sustancia o combinación de sustancias propuestas para prevenir, destruir, repeler o mitigar las plagas, o como reguladores de plantas, desecantes, defoliantes o estabilizadores de nitrógeno (USEPA, 2023). En consecuencia, los plaguicidas juegan un papel importante en la vida cotidiana, desafortunadamente, la comunidad científica ha clasificado a los plaguicidas como sustancias neurotóxicas. Los plaguicidas son sustancias

diseñadas para matar insectos atacando su sistema nervioso, pero debido a su falta de selectividad, también pueden afectar a otros organismos no diana, incluidos los seres humanos. Una de las enfermedades más frecuentes asociadas a la exposición de plaguicidas es la enfermedad del Parkinson. Existen numerosos tipos de plaguicidas, algunos afectan a varias especies y tipos de organismo, mientras que otros actúan sobre especies particulares (Dardiotis et al., 2023). Los plaguicidas más utilizados son los plaguicidas organofosforados (OPP) y los organoclorados (OCP) y carbamatos. Los OCP afectan al sistema nervioso central, riñón e hígado, además, se caracterizan por acumularse en los tejidos grasos. Los OPP y carbamatos también afectan al sistema nervioso central, mediante el proceso de inhibición de la enzima colinesterasa. Se puede establecer su grado de toxicidad según el orden (INSHT, 2023):

Organofosforados > Organoclorados > Carbamatos

Los plaguicidas organofosforados son objeto de estudio de la presente Tesis Doctoral, se describen con mayor profundidad en el Apartado 1.2.3.1.

Fármacos

Los productos farmacéuticos son una clase de sustancias químicas terapéuticas con numerosas estructuras con la finalidad de prevenir y tratar enfermedades. Son compuestos que se consideran como contaminantes emergentes y representan una gran amenaza para la salud humana, incluso a concentraciones bajas. Estos contaminantes son liberados al medio ambiente, mediante las excreciones de los seres humanos y animales, ya que no son metabolizados adecuadamente o se eliminan de forma inadecuada en la corriente de aguas residuales, ingresando en los sistemas de alcantarillado y plantas de tratamiento de aguas (Zhai et al., 2023; Zhou et al., 2023). De acuerdo con las estructuras y propiedades, los productos farmacéuticos se pueden clasificar en antibióticos, hormonas, analgésicos, antiinflamatorios no esteroideos, agentes cardiovasculares, antipsicóticos y antidepresivos.

Los antibióticos son los fármacos que impiden la reproducción de las bacterias. Debido al crecimiento de la población, el consumo de antibióticos aumentó en todo el mundo en un 65% entre 2000 y 2015, y se espera que esta cifra siga en aumento en un 200% entre

2015 y 2030. El antibiótico más consumido es la penicilina. Las hormonas es el principal fármaco utilizado para el crecimiento y desarrollo de humanos y animales (Zhou et al., 2023). Hasta la fecha, nueve hormonas (incluyendo 17 β -estradiol y 17 α -etinilestradiol) se han incluido como contaminantes prioritarios en la Lista de Contaminantes Químicos de la Agencia de Protección Ambiental de USA (USEPA, 2022b).

Otros

Otra familia de contaminantes de gran interés son los disruptores endocrinos, donde se incluyen una amplia gama de sustancias orgánicas, como bisfenoles, parabenos, hidrocarburos policíclicos aromáticos, plaguicidas organofosforados, triclosan y compuestos fenólicos. Estos contaminantes son objeto de estudio en la Memoria de esta Tesis Doctoral, por lo que se describirán en profundidad en apartados posteriores.

1.1.2 Leche, valor nutricional y consumo

En países desarrollados la mayor parte de la leche es procesada en cierta medida y gran parte de ella sirve de materia prima para la producción de una amplia gama de productos lácteos. Los productos lácteos son probablemente los más diversos de todos los grupos de alimentos (Nollet & Toldrá, 2010). Los principales componentes de la leche son agua (87.4%), grasas (3.7%), proteínas (3.4%), lactosa (4.8%) y minerales (0.7%). En la Tabla 1, se puede ver una composición más específica de la leche de vaca que es la más consumida.

Tabla 1. Composición nutritiva de la leche de vaca (Rodríguez et al., 2023).

Energía (Kcal/100 mL)	68	Microminerales (µg/100mL)	
Proteínas (g/100mL)	3.5	Hierro	50
Caseínas	80%	Yodo	4.5
Proteínas del suero	20%	Manganeso	3
Lactoalbúmina	0.09%	Selenio	3
Lactoferrina	0.001%	Cromo	2
Seroalbúmina	0.03%	Vitaminas (µg/100mL)	
Grasas (g/100mL)	3.7	A	100
Ácido linoleico	2%	D	1.4
Colesterol	0.12	C	4000
Glúcidos (g/100mL)	6	E	40
Lactosa	5	K	6000
Macrominerales (mmol/100mL)		B1	44
Sodio	2.2	B2	44
Potasio	3.5	B6	175
Calcio	2.9	B12	0.4
Microminerales (µg/100mL)		Niacina	94
Zinc	3500	Biotina	3.5
Cobre	20	Ácido fólico	5.5

Proteínas

Las proteínas de la dieta aportan los aminoácidos necesarios para el desarrollo de las células y para la formación y mantenimientos de los tejidos corporales. Los aminoácidos se pueden encontrar libres o formando parte de las proteínas de los alimentos. La composición proteicas de la leche constituye un 80% caseína y un 20% de proteínas séricas (Baró et al., 2001).

Grasas

La materia grasa de la leche es considerada como unas de las grasas más complejas de origen animal, debido a la gran cantidad de ácidos grasos con diferentes estructuras bioquímicas, peso molecular y grado de insaturación. En términos generales, la grasa láctea está compuesta aproximadamente por 70 % de ácidos grasos saturados, 26 % de ácidos grasos monoinsaturados y 4 % de ácidos grasos poliinsaturados. Los tres ácidos grasos más abundantes en la fracción lipídica de la leche son el palmítico, mirístico y esteárico (García et al., 2014).

Consumo de leche y productos lácteos en España

El Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación viene realizando unas estadísticas mensuales con el objetivo de obtener información sobre la situación productiva de la leche de vaca. La población objeto de estudio está formada por todas las empresas, tanto industrias como centros de recogida, que compran leche de vaca en las explotaciones ganaderas ubicadas en la Península y Baleares. Los datos de estas encuestas se encuentran recogidos en la Tabla 2. La industria láctea en España procesa una media anual de 611.7 toneladas al año de leche de vaca.

La leche provee de nutrientes (proteínas, vitaminas, etc.) a los seres humanos; sin embargo, en la composición de la leche también se puede encontrar contaminantes orgánicos que son menos conocidos y de menor regulación que pueden ser ingeridos, inhalados o adsorbidos por la piel o las mucosas de los animales. Este grupo de contaminantes orgánicos se absorbe al torrente sanguíneo de los lactantes o se almacenan en sus grasas (Nollet & Toldrá, 2010).

Los contaminantes orgánicos presentes en los productos lácteos pueden dividirse en cuatro categorías (Nollet & Toldrá, 2010):

- Medicamentos veterinarios
- Hongos, bacterias y sus subproductos (toxinas)
- Plaguicidas
- Disruptores endocrinos
- Contaminantes orgánicos persistentes

En el Apartado 1.2 se realizará un estudio exhaustivo sobre los plaguicidas, los hidrocarburos policíclicos aromáticos y los disruptores endocrinos presentes en leche y productos lácteos, objeto de estudio en esta Tesis Doctoral.

Tabla 2. Estadística mensual de recogida de leche de vaca y productos elaborados por las industrias lácteas españolas.

Cantidades en toneladas	2021		2022									
	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre
Recogida												
Leche de vaca	590.1	616.3	630.6	585.3	650.8	631.5	654.3	614.0	607.2	602.0	571.7	586.3
% medio de materia grasa	3.92	3.91	3.86	3.84	3.81	3.80	3.71	3.64	3.62	3.64	3.75	3.84
% medio de proteínas	3.41	3.38	3.35	3.34	3.33	3.32	3.27	3.25	3.22	3.26	3.33	3.39
Productos obtenidos												
Leche de consumo directo	335.2	354.2	368.6	351.6	369.9	367.9	342.5	351.9	351.2	343.7	333.0	345.8
Nata de consumo directo	13.8	15.3	15.5	14.5	16.4	17.1	15.3	14.5	14.6	12.1	14.4	14.2
Yogures	76.3	68.8	80.2	77.0	85.0	87.9	83.6	77.3	82.5	80.6	83.7	90.6
Leche concentrada	5.1	5.2	5.6	4.9	5.8	5.1	4.7	6.0	5.9	6.4	7.1	6.3
Otras leches en polvo (1)	1.2	2.2	1.9	1.9	1.9	1.8	2.1	2.1	2.2	2.2	2.1	2.2
Leche desnatada en polvo	0.4	0.5	0.6	0.6	0.6	0.5	0.6	0.7	0.7	0.4	0.4	0.3
Mantequilla	2.3	2.6	2.5	2.5	2.5	2.6	2.4	1.7	1.9	1.9	1.7	1.8
Queso de vaca (2)	16.4	14.9	16.6	15.4	15.6	16.3	16.1	15.3	16.8	15.1	14.8	15.7

(1)-Incluye en polvo de nata, leche entera y leche parcialmente desnatada

(2)-No incluye el queso de mezcla

Fuente: Industrias Lácteas Mensual (2023).

1.2 Contaminantes orgánicos en muestras de alimentos: Disruptores endocrinos

La Organización Mundial de la Salud define a los disruptores endocrinos (EDCs) como “sustancias exógenas o mezclas de sustancias que alteran una o más funciones del sistema endocrino y consecuentemente causan efectos adversos en la salud de un organismo intacto o en su progeñie”. Esta definición de EDCs fue aprobada posteriormente por el Comité Científico de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (OMS, 2023). La lista de las sustancias clasificadas como EDCs aumenta continuamente y, aunque se ha logrado un progreso científico en este ámbito, la preocupación sigue siendo alta. Hay dos razones principales para poner el foco sobre ellos: el grado de exposición del consumidor y la segunda es la evidencia que vincula esta exposición con varias enfermedades (Djordjevic et al., 2020).

Los EDCs representan un grupo de sustancias que no están definidas principalmente por su estructura química, ya que muchos no representan similitudes estructurales o propiedades químicas comunes, sino más bien se distinguen o reconocen a través de sus efectos biológicos (Giulivo et al., 2016). Los EDCs se pueden distinguir entre estrógenos naturales o productos químicos sintetizados. Entre los primeros cabe destacar la estrona (E1), el estradiol (E2) y el estriol (E3) que son 3 estrógenos esteroideos que existen naturalmente en el cuerpo humano, además de hormonas sexuales y fitoestrógenos. Entre los segundos se incluyen fármacos, productos de cuidado personal, plaguicidas, filtros UV-Vis, conservantes e hidrocarburos policíclicos aromáticos; así como químicos industriales sintetizados con diversos fines: resinas, plásticos, lacas y materiales poliméricos, se trata de una lista interminable lo que hace pensar que la exposición humana es masiva y universal (Lu et al., 2020; Ying et al., 2002).

La exposición a EDCs puede ocurrir a través de la dieta, absorción de la piel e inhalación, aunque numerosos estudios confirman que la principal fuente de exposición es a través de los alimentos. La exposición a estos compuestos químicos no tiene la misma repercusión sobre todos y cada uno de los individuos expuestos (Rodríguez, 2014).

1.2.1 Mecanismos de acción de los ECDs y riesgos para la salud

Las hormonas son un conjunto de moléculas que, junto al sistema nervioso, coordinan diversas funciones en el organismo. Los disruptores endocrinos pueden unirse a los receptores nucleares para imitar las hormonas endógenas, alterando la señalización hormonal (Warner et al., 2020). Los receptores nucleares humanos controlan una gran cantidad de procesos biológicos como el desarrollo y la homeostasis de los órganos, el metabolismo, las funciones inmunes y la reproducción (Balaguer et al., 2019). Los disruptores endocrinos pueden interactuar con múltiples receptores nucleares de dos formas: a) como agonistas, en los que se facilitan las interacciones genómicas; o b) como antagonistas, en los que causan un cambio conformacional en el receptor para bloquear la acción. Es importante destacar que los disruptores endocrinos pueden interferir en la síntesis y degradación de hormonas endógenas para alterar los niveles hormonales (Warner et al., 2020). Sin embargo, existen otras maneras por las cuales los disruptores endocrinos alteran los mecanismos de acción hormonal, tales como la mimetización de la acción de las hormonas, la alteración de su patrón de síntesis y metabolismo y la modulación de los niveles de los receptores endocrinos.

En los últimos años, se han realizado numerosos estudios debido a la exposición inapropiada de los disruptores endocrinos. A continuación, se resumen algunas evidencias acerca de algunos trastornos causados:

Criptorquidia e hipospadias

La criptorquidia es el no descenso de uno o ambos testículos al escroto al nacer, es uno de los defectos congénitos urogenitales más comunes que se observan en los varones recién nacidos. Los hombres con antecedentes de criptorquidia tienen un riesgo 4 a 5 veces mayor de padecer cáncer de testículos. El cáncer de testículos es el cáncer más común en hombres entre 15 a 34 años. La mayoría de los hombres con criptorquidia tiene una calidad de semen deteriorada. La infertilidad masculina es uno de los problemas reproductivos más comunes en la actualidad. La hipospadias es una malformación en el tracto reproductor masculino. La incidencia de hipospadias ha aumentado durante las últimas décadas, y se

sugiere que los disruptores endocrinos podrían ser parcialmente responsables (Jensen et al., 2019).

Endometriosis y síndrome del ovario poliquístico

El síndrome del ovario poliquístico (PCOS) es un trastorno heterogéneo complejo que se caracteriza por la oligo-ovulación o anovulación crónica junto con morfología ovárica poliquística. El PCOS es el trastorno endocrino más común en mujeres en edad reproductiva, y ocurre en aproximadamente 5–10 %. Este síndrome está asociado con la obesidad y la resistencia a la insulina, lo que lleva al desarrollo de diabetes tipo 2 y puede aumentar el riesgo de padecer cáncer de seno y enfermedades cardiovasculares. La endometriosis está caracterizada por el crecimiento extrauterino de las glándulas endometriales y el estroma, es un trastorno que afecta al 8–10% de las mujeres en edad reproductiva. El PCOS causa sangrado interno, inflamación, cicatrización, dolor pélvico crónico e infertilidad. Los efectos de los disruptores endocrinos de algunos productos para el cuidado personal han sido el tema de preocupación de los últimos años porque se han relacionado con el PCOS (Gu et al., 2019). La evidencia creciente sugiere que los disruptores endocrinos pueden estar involucrados etiológicamente en el desarrollo y la gravedad de la enfermedad (Yao et al., 2017). Además, de estas anomalías, los disruptores endocrinos pueden provocar alteraciones en la fertilidad, abortos espontáneos y alteración en la concentración de hormonas femeninas (Giulivo et al., 2016).

Enfermedades metabólicas: obesidad

En el pasado, se consideraba que la obesidad ocurría como un resultado de un desequilibrio entre la ingesta de calorías y el gasto energético en el cuerpo. Sin embargo, investigaciones más recientes han demostrado que la genética, el sistema endocrino y las toxinas ambientales tienen una estrecha relación con el desarrollo de la obesidad. Así, diversas investigaciones han demostrado que los obesógenos, que son sustancias químicas presentes en el medio ambiente y en alimentos, regulan y promueven de manera inapropiada la acumulación de lípidos y la adipogénesis. Además, han confirmado que muchos obesógenos

son disruptores endocrinos que interfieren con la regulación endocrina normal del metabolismo, el desarrollo, mantenimiento del tejido adiposo, el apetito, el peso y el equilibrio energético (García-Mayor et al., 2012).

Enfermedades metabólicas: diabetes

La diabetes mellitus tipo 2 se considera una amenaza pandémica emergente en el mundo y plantea importante preocupación en la salud pública. La mayoría de los estudios se han centrado en el bisfenol A, ya que podría alterar la biosíntesis y secreción de insulina en las células pancreáticas. Esto puede causar resistencia a la insulina y el posterior desarrollo de diabetes tipo 2 (Ward et al., 2020).

Cáncer próstata, testicular, mama y útero.

Varios estudios epidemiológicos han demostrado un aumento significativo en la incidencia de cáncer de próstata, mama, testicular y de útero en los humanos durante los últimos 50 años. La gran dependencia androgénica y estrogénica de las células tumorales de este tipo de cánceres hacen pensar que los disruptores endocrinos están favoreciendo su aparición. Las evidencias epidemiológicas demuestran que el bisfenol A puede estar relacionado con la aparición del cáncer de mama, así como la proliferación de la línea celular de cáncer de próstata humano sensible al andrógeno y el estrés oxidativo (Gramec Skledar & Peterlin Masic, 2016). También hay numerosos estudios sobre la aparición de cáncer de mama después de la exposición a parabenos. Estas investigaciones han demostrado que los parabenos pueden estimular el crecimiento de células de cáncer de mama a través de sus propiedades estrogénicas (Giulivo et al., 2016). Por tanto, se piensa que los disruptores endocrinos a los que se ven expuestas las personas están acelerando la aparición de estos tipos de cánceres. Los casos de cáncer de endometrial también han aumentado notablemente en las últimas décadas, y se ha comprobado que algunos fármacos como el taxoxifeno, usado en el tratamiento de cáncer de mama, favorecen su proliferación, por lo que buscan nuevas vías de tratamiento (Rodríguez, 2014).

Efectos sobre el sistema nervioso

Los disruptores endocrinos influyen en el sistema nervioso a través de varios receptores, modificando la morfología y la respuesta conductual. Algunas etapas críticas del desarrollo, como los períodos intrauterinos, perinatal y de pubertad tienen inconvenientes graves como resultado de la exposición a los disruptores endocrinos. Los estrógenos tienen efectos neuro-protectores, niveles bajos de estrógenos pueden causar síntomas similares a la esquizofrenia tanto en mujeres como en hombres. Las funciones estrogénicas alteradas también pueden provocar mutaciones genéticas. Esto podría conducir a enfermedades como el síndrome de Turner y el síndrome de Klinefelter. También se han observado trastornos neuronales, conductuales y bipolares en bebés y niños debido a la exposición del bisfenol A (Maqbool et al., 2016).

En la Tabla 3 se representa a modo resumen algunos de los posibles efectos adversos que provocan los disruptores endocrinos en las personas (Argemi et al., 2005).

Tabla 3. Posibles efectos que causan los ECDs en la salud (Argemi et al., 2005).

Mujeres	Hombres	Niñas y niños
Cáncer de mama	Reducción de esperma	Pubertad precoz
Endometriosis	Cáncer de testículos	Hiperactividad
Muerte embrionaria y fetal	Cáncer de próstata	Dificultad en el aprendizaje
Malformación en la descendencia	Disminución del nivel de testosterona	Mayor incidencia de cánceres

1.2.2 Fuentes de los disruptores endocrinos

Anteriormente, se ha mencionado que los disruptores endocrinos representan un grupo de sustancias que no están definidas por un mismo patrón, por lo que es difícil deducir su fuente de exposición humana. Los disruptores endocrinos más estudiados son los

bisfenoles, ftalatos, hidrocarburos policíclicos aromáticos y contaminantes orgánicos persistentes; incluyendo plaguicidas, bifenilos polibromados y dioxinas entre otros. En la Tabla 4 se representan las principales familias de sustancias con actividad disruptora y sus fuentes en la exposición humana.

Tabla 4. Fuentes de exposición humana de los disruptores endocrinos (Darbre, 2019).

Compuestos	Usos	Fuente de exposición
Bisfenol A	Plásticos y resinas epoxi	Juguetes, botellas de agua de policarbonato y contenedores de almacenamiento de alimentos
Alquilfenoles	Detergentes	Lugar de trabajo y ambiente doméstico, producto de cuidado personal
Parabenos	Preservativos	Productos para el cuidado personal, alimentos y productos farmacéuticos
Triclosán	Antiséptico y conservantes	Producto de cuidado personal y producto de cuidado doméstico
Bifenilos policlorados	Industria eléctrica	Grasa animal en dieta
Ftalatos	Plastificantes de PVC	Productos de limpieza, cosméticos e industria textil
Plaguicidas	Fungicidas, insecticidas y desinfectantes	Fabricación y aplicación de agroquímicos en agricultura, fumigación y limpieza
Dioxinas	Medio ambiente	Incineración, vertedero y producción industrial
Hidrocarburos policíclicos aromáticos	Industria del alquitrán	Producidos en la combustión incompleta del carbón de combustibles diésel

1.2.3 Disruptores endocrinos y sus propiedades físico-químicas y toxicológicas

1.2.3.1 Plaguicidas organofosforados

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) ha definido los plaguicidas como cualquier sustancia o combinación de sustancias propuestas para prevenir, destruir, repeler o mitigar las plagas, o como reguladores de plantas, desecantes, defoliantes o estabilizadores de nitrógeno. También se utilizan como agentes terapéuticos en medicina humana y veterinaria (Dar et al., 2019). Los plaguicidas organofosforados son parte de la

agricultura moderna. La publicación del libro “Silent Spring” llevo a la retirada de muchos plaguicidas organoclorados debido a su persistencia en el medio ambiente. En ese momento, el uso de plaguicidas organofosforados se disparó debido a su disponibilidad y degradación rápida en el medio ambiente. Aunque los plaguicidas organofosforados se degradan rápidamente y son menos persistentes en el medio ambiente, son mucho más tóxicos que los plaguicidas organoclorados (Jain, 2006).

En la Tabla 5 se resuemen las propiedades físico-químicas de los plaguicidas organofosforados objeto de estudio en la Memoria de esta Tesis Doctoral.

Tabla 5. Propiedades físico-químicas de los plaguicidas organofosforados estudiados (PubMed, 2023).

Compuestos	MM (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad en agua (mg/L)	pK _a	logK _{ow}
Diclorvos	221		140	10	-	1.43
Dimetoato	229	49	107	23.8	15.9	0.34
Diazinón	304		83	40	4.19	4.19
Paratión -metil	263	35	154	55	7.15	2.6
Malatión	330	2.9	156	14	-	2.36
Clorpirifos	351	41	160	1.4	-	4.96
Fentión	278	7	87	2	-	3.8
Bromofos-metil	366		111	-	-	-
Metidatión	302	40	-	187	-	2.29
Fentión-sulfoxido	294	-	-	-	-	-

MM: masa molecular; Solubilidad en agua a 20°C; pK_a: constante de disociación ácida; logK_{ow}: coeficiente de repartición de octanol-agua.

La aplicación recurrente de plaguicidas se implementa en la agricultura moderna a un ritmo exponencial para satisfacer la creciente demanda del rendimiento agrícola. Los plaguicidas se aplican anualmente por millones de toneladas en todo el mundo. La tasa de consumo en diversos países depende de su área agrícola y tipo de rendimiento. Tres de los países más consumidores del mundo (kg/año) son Turquía, Colombia e India (Dar et al., 2019). Sin embargo, de los países de la Unión Europea, España es el país que vende una

mayor cantidad de plaguicidas, seguido de Francia, Italia y Alemania, según la oficina estadística de la Unión Europea Eurostat (Eurostat, 2023).

Los plaguicidas han jugado un papel importante en la “Revolución Verde” al contrarrestar el ataque de plagas y desempeñar un papel esencial en el cumplimiento de los requisitos de una población enormemente creciente. Sin embargo, la revolución ha provocado varios problemas, tales como pérdidas de fertilidad del suelo, la acidificación del suelo, la lixiviación de nitratos, la resistencia de las especies a plaguicidas y las pérdidas de diversidad biológica. Su mal uso o uso excesivo conduce a la contaminación ambiental (agua, aire y suelo) y dan como resultados riesgos directos e indirectos tanto para los humanos como para el medio ambiente (Dar et al., 2019).

Estos compuestos tóxicos se pueden absorber fácilmente a través de la piel, las membranas mucosas, el tracto gastrointestinal y respiratorio. La acción principal de los plaguicidas organofosforados sobre los seres vivos es la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa que resulta de la acumulación del neurotransmisor acetilcolina en las sinapsis y la sobreestimación de los nervios y músculos en el sistema nervioso central, periférico y autónomo (Sánchez-Santed et al., 2016). Estos contaminantes producen signos de toxicidad. Las intoxicaciones agudas por estos compuestos se empezaron a notificar a partir de la década de 1940. Los primeros síntomas del sistema nervioso central por la exposición a compuestos organofosforados incluyeron vértigo, inquietud, ansiedad y temblor. En casos de intoxicación moderada, los síntomas fueron seguidos por dolor de cabeza y por insomnio con sueño excesivo y pesadillas. En casos de intoxicación extremadamente severa, los síntomas fueron seguidos por ataxia, temblor, somnolencia, dificultad para concentrarse, confusión mental, desorientación y cambios en el habla. También se informaron de apatía, abstinencia y depresión (Stallones & Beseler, 2016). Las enfermedades que se relacionan con la exposición a plaguicidas son enfermedades neurodegenerativas, cáncer, Parkinson y trastornos reproductivos (Sánchez-Santed et al., 2016). En la Figura 1 se representan las estructuras de los plaguicidas organofosforados objeto de estudio.

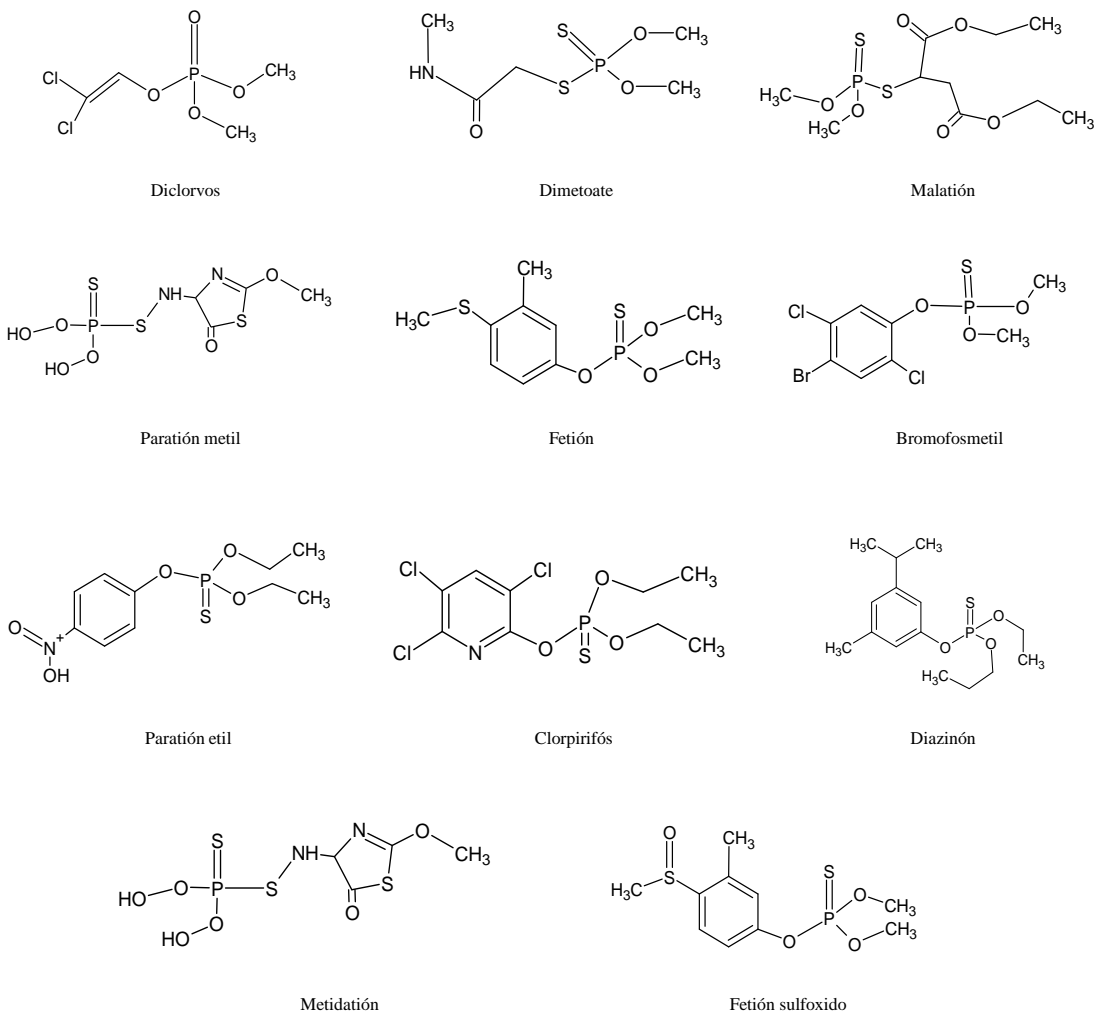


Figura 1. Estructuras plaguicidas organofosforados objeto de estudio.

1.2.3.2 Parabenos

Los parabenos son un grupo de compuestos químicos sintéticos que se utilizan como conservantes antimicrobianos en diversos alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos. Representan los homólogos de alquilo o arilo del ácido p-hidroxibenzoico y difieren entre sí por el tipo de sustituyente, que puede ser una cadena de alquilo o un anillo aromático.

Los parabenos más comúnmente encontrados con cadena lineal son el metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno y butilparabeno. El isopropilparabeno y el isobutilparabeno son

ejemplos de parabenos con una cadena ramificada como sustituyente, mientras el bencilparabeno representa los ésteres aromáticos del ácido p-hidroxibenzoico. Son estables y efectivos en un amplio rango de pH y suficientemente solubles en agua. Las propiedades fisicoquímicas dependen en gran medida del tipo de sustituyente presente (Haman et al., 2015). La tendencia a aumentar la resistencia a la hidrólisis del agua junto con un aumento en la longitud de la cadena alquílica es notable. En forma pura, los parabenos son sólidos cristalinos de color blanco y estables en condiciones normales. Son inodoros y tienen un sabor a quemado (Nowak et al., 2018). Son compuestos lipofílicos con coeficientes de partición octanol/agua elevados (expresados como $\log K_{ow}$) (Tavares et al., 2009) y que al aumentar el tamaño de su cadena hidrocarbonada, presenta mayor carácter hidrofóbico. En la Tabla 6 se informa sobre las características físico-químicas de los parabenos objeto de estudio en la presente Memoria de Tesis Doctoral.

Tabla 6. Propiedades físico-químicas de los parabenos estudiados (PubMed, 2023).

Compuestos	MM (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad en agua (g/l)	Pka	LogK _{ow}
Metilparabeno	152	131	275	2	8.47	1.66
Etilparabeno	166	118	298	0.86	8.50	2.19
Isopropilparabeno	180	96	160	-		2.66
Propilparabeno	180	98	133	0.3	8.47	2.71
Isobutilparabeno	194	-	-	-		-
Butilparabeno	194	70	157	0.15	8.47	3.24
Bencilparabeno	228	114	-	0.05	8.20	3.56

MM: Masa molecular; Solubilidad en agua a 20°C; Pka: constante de disociación ácida; logK_{ow}: coeficiente de repartición de octanol-agua.

Químicamente, los parabenos se sintetizan por esterificación del ácido p-hidroxibenzoico con un alcohol apropiado en presencia de un catalizador (por ejemplo, el ácido sulfúrico concentrado o ácido p-toluenosulfónico). En menor medida los parabenos son producidos por plantas y bacterias (Haman et al., 2015). En soluciones ácidas, los parabenos son estables y en soluciones alcalinas, los parabenos se hidrolizan a ácido p-hidroxibenzoico y el alcohol correspondiente (Błędzka et al., 2014). Durante mucho tiempo y dado a su alto poder antimicrobiano, se han considerado como conservantes seguros e inofensivos, ya que

se absorben rápidamente y se metabolizan en ácido p-hidroxibenzoico, que es menos tóxico que los compuestos originales (Tavares et al., 2009). Sin embargo, también se pueden encontrar en otros productos como cigarrillos, barnices y pegamento, alimentación animal y productos para cuidado de la salud (Haman et al., 2015). En la Figura 2 se representan las estructuras de los parabenos objeto de estudio.

En las últimas dos décadas, se ha llevado a cabo una profunda discusión sobre la seguridad de los parabenos. Hoy en día, numerosos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, comienzan a mostrar indicios de su potencial como disruptores endocrinos, obteniéndose importantes conclusiones que lo avalan y que se exponen a continuación. Por un lado, distintas investigaciones han demostrado la capacidad para unirse a los receptores hormonales estrogénicos y competir para unirse a los estrógenos naturales, comprobándose que los parabenos exhiben actividades estrogénicas como agonistas completos, debido a la afinidad de unión al receptor de estrógenos relativamente baja en comparación con las hormonas naturales u otros disruptores endocrinos (Błędzka et al., 2014). Por otro lado, algunas investigaciones demuestran la actividad anti-androgénica de algunos parabenos al unirse a los receptores de andrógenos humanos (AR) y provocar la inhibición de la transcripción inducida por testosterona (T), mermando su producción (Chen et al., 2007).

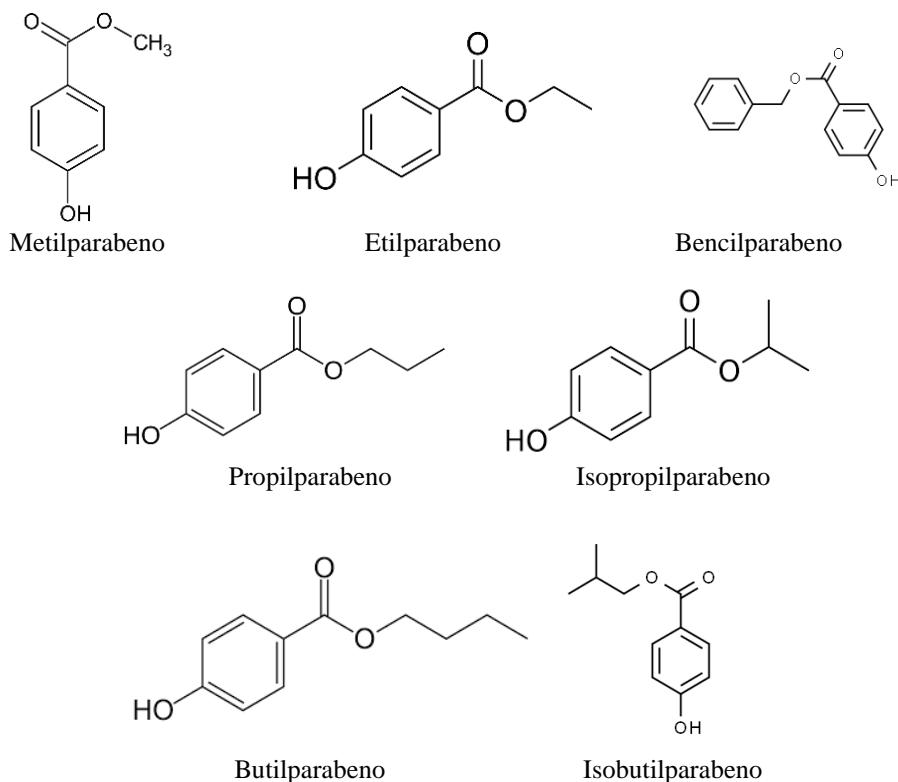


Figura 2. Estructuras de los parabenos estudiados.

1.2.3.3 Bisfenoles

El bisfenol A (BPA) es el nombre comúnmente usado para el 2,2-bis (4-hidroxifenil) propano. El bisfenol A es el bisfenol más predominante y fue sintetizado por primera vez en 1891 por el químico ruso Alexander P. Dianin mediante una reacción de condensación de dos moléculas de fenol y una molécula de acetona con cloruro de hidrógeno y resina de intercambio iónico que actuó de catalizador (Ohore & Zhang, 2019).

Hoy en día, el BPA es uno de los componentes de síntesis de mayor producción a nivel mundial (Ma et al., 2019). Es un compuesto químico que se usa ampliamente como monómero principalmente en la producción de resinas epoxídicas y policarbonatos. Debido a su propiedad para resistir altas temperaturas (hasta 145 °C), y sus excelentes propiedades tanto técnicas como mecánicas, los policarbonatos tienen infinidad de aplicaciones como juguetes,

utensilios, vasijas de plástico, chupetes, papel térmico, equipo médico, tuberías de agua potable, sistemas eléctricos, industria automóvil y aeronáutica, etc. (Figura 3). Además las resinas epoxídicas se usan ampliamente como recubrimiento protector de los envases de alimentos y bebidas enlatadas, pinturas, adhesivos y laminado electrónicos debido a su resistencia al calor (Pelch et al., 2019). La producción mundial de BPA aumentó gradualmente de 5 a 8 millones de toneladas durante el período 2010 - 2021 y se estima que se registre un crecimiento anual de más de un 6% durante el periodo de 2022–2028 (Intelligence, 2023) .

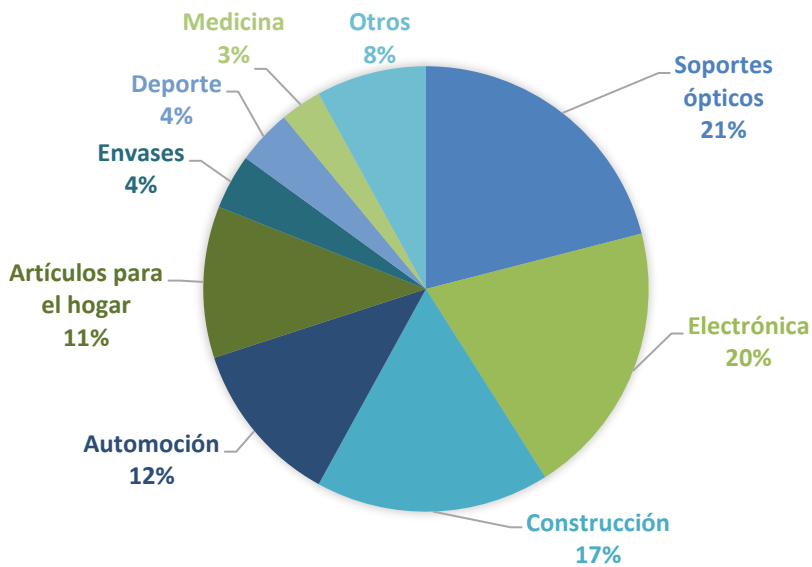


Figura 3. Distribución de los usos del bisfenol A en Europa por sectores (Rodríguez, 2014).

El BPA se puede clasificar como un compuesto interferente de la función endocrina debido a sus características estrogénicas. Actualmente, debido a su comportamiento bioquímico, el BPA es el disruptor endocrino que más preocupación está causando a la comunidad científico-médica. Así, diferentes estudios han demostrado que los efectos del BPA son más peligrosos que otros disruptores endocrinos (Rodríguez, 2014). Las serias preocupaciones sobre los efectos adversos del BPA en la salud humana han llevado a la industria a reemplazarlo con otros bisfenoles en algunas aplicaciones. Debido a la similitud de estructuras con el BPA, se pueden obtener las mismas o mejores propiedades con bisfenoles análogos como puede ser el bisfenol F (BPF), bisfenol S (BPS), bisfenol Z (BPZ)

y bisfenol B (BPB). En la Figura 5 se representa las estructuras de estos bisfenoles. Desafortunadamente, los perfiles de toxicidad también son similares a los del BPA, con la desventaja de ser menos conocidos por la comunidad científica (Caballero-Casero et al., 2016). En la Tabla 7 se presentan las características físico-químicas de los bisfenoles objeto de estudio en esta Memoria.

Tabla 7. Propiedades físico-químicas de los bisfenoles estudiados (PubMed, 2023).

Compuestos	MM (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad en agua (g/L)	pK _a	LogK _{ow}
Bisfenol A	228	157	220	0.12	10.29	3.64
Bisfenol F	200	163	362	-	9.91	2.76
Bisfenol B	242	126	345	1	10.27	4.15
Bisfenol Z	268	192	371	insoluble	9.91	4.87
Bisfenol S	250	-	240	1.1	7.64	2.14

MM: masa molecular; Solubilidad en agua a 20°C; pK_a: constante de disociación ácida; logK_{ow}: coeficiente de repartición de octanol-agua.

La evaluación de la exposición humana al BPA mostró que los humanos están expuestos directa e indirectamente al BPA, con una ingesta global estimada de 30.76 ng/kg peso corporal/día. La exposición al BPA se produce mediante inhalación de polvo, exposición dérmica e ingestión (Ohore & Zhang, 2019). En varios estudios de biomonitoring en humanos, el BPA se ha detectado regularmente en orina, sangre, leche y otras muestras biológicas (Gramec Skledar & Peterlin Mašič, 2016). La ingesta diaria de BPA entre adultos en diferentes países se representa en la Figura 4.

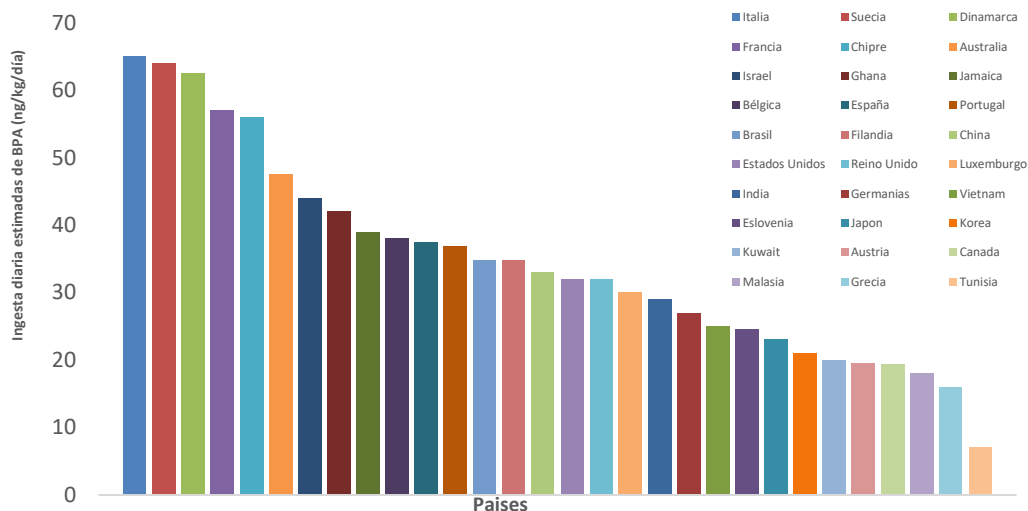


Figura 4. Ingesta diaria de BPA entre adultos en diferentes países (Ohore & Zhang, 2019).

El BPA puede contaminar los alimentos debido a la bioacumulación directa en las matrices alimentarias causada por la contaminación ambiental o a su posible lixiviación del embalaje. La liberación de BPA de los envases de policarbonato a los alimentos está modulada por varios factores donde se incluyen composición de los alimentos, si el contacto con los alimentos es directo o no, tiempo de contacto, temperatura de contacto y valores de pH, grosor del material de embalaje, naturaleza química y la cantidad de compuesto migrante. Un factor de exposición muy importante en adultos es a través de las botellas de policarbonato, mientras que el caso de los niños, la exposición al BPA es por los biberones de policarbonato, actualmente prohibidos en numerosos países (Russo et al., 2019; Vilarinho et al., 2019)

A continuación, se resumen los mecanismos tóxicos involucrados por la vía del receptor de estrógenos demostrados para el BPA: a) *Vía del receptor de estrógeno*: donde el BPA se considera como un xenoestrógeno debido a su competencia con estradiol (E2) para unirse a receptores nucleares (ER). Aunque la afinidad de unión del BPA es menor que la del estradiol, una gran cantidad de estudios *in vitro* han demostrado que el BPA produce una interrupción de la función celular a dosis bajas, confirmando que el BPA tiene efectos de disruptor endocrino (Vilarinho et al., 2019). b) *Vía de receptor de andrógenos*: donde el BPA se considera comúnmente que tiene efecto antiandrogénico. Después de ingresar en el cuerpo,

puede competir con los andrógenos para unirse a los receptores de andrógenos, como antagonista, interrumpiendo la función normal de los andrógenos, causando la disfunción reproductiva y del desarrollo (Ma et al., 2019).

Toda esta actividad ha hecho que se relacione la exposición del BPA con el desarrollo de numerosas anomalías y enfermedades. Así, el impacto del BPA en los seres humanos incluye problemas cardiovasculares, efectos relacionados con la reproducción, la fertilidad, cáncer, obesidad infantil y diabetes tipo II (Rajabnejad et al., 2020). Además, la exposición al BPA se ha asociado con trastornos del comportamiento neurológico en los niños, lo que lleva a un deterioro cognitivo y de aprendizaje, y a problemas con la memoria defectuosa (Xiao et al., 2020).

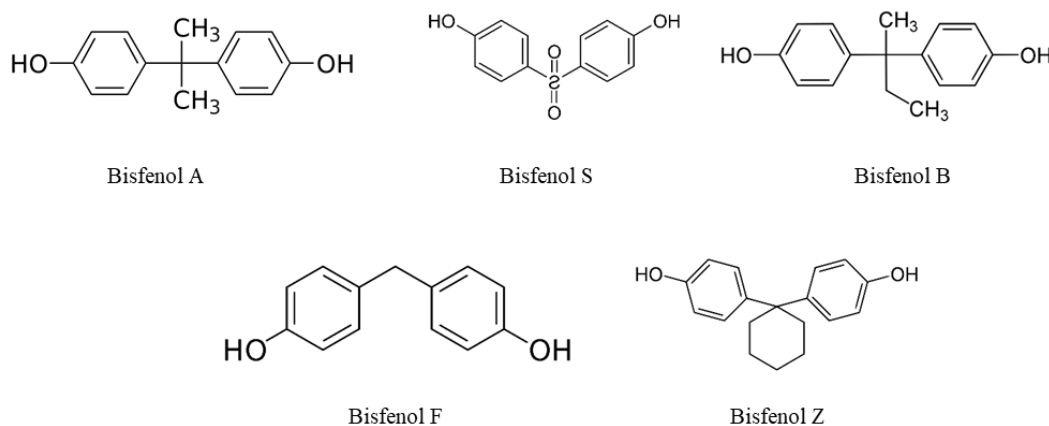


Figura 5. Estructuras de los bisfenoles objeto de estudio en esta Memoria.

1.2.3.4 Contaminantes fenólicos

Los compuestos fenólicos se caracterizan principalmente por presentar en su estructura un grupo hidroxilo (-OH). La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) y la Unión Europea (EU) han considerado estos contaminantes como contaminantes orgánicos prioritarios. Estos contaminantes han sido detectados en multitud de muestras tales como en tejidos biológicos, alimentos, aguas residuales y sedimentos (Tang et al., 2021). Todos estos compuestos (clorofenoles, alquifenoles, fenilfenoles, etc.) son

derivados del fenól y se han identificado como sustancias químicas potencialmente tóxicas para los seres humanos, afectando al sistema nervioso central, respiratorio y causar irritación en la piel (Pratap et al., 2022).

Los clorofenoles son un grupo de sustancias producidas por la halogenación electrofílica de fenol con cloro. Son utilizados como plaguicidas, antisépticos y desinfectantes. El pentaclorofenol es el clorofenol más destacado y se utiliza principalmente como fungicida. Los clorofenoles pueden dañar el hígado, el cerebro y el sistema nervioso central. El 4-clorofenol se considera peligroso para la piel humana (Badanthadka & Mehendale, 2023).

Los alquifenoles son subproductos de la degradación microbiana de los polietoxilatos de alquifenol, constituyen una clase de EDCs. Los dos alquifenoles detectados con mayor frecuencia son 4-nonilfenol y 4-*tert*-octilfenol. Además, representan unos de los principales grupos de tensioactivos no iónicos más utilizados, con aproximadamente un 80% de cuota en el mercado (Dong et al., 2015). Son ampliamente utilizados en la industrial, servicios públicos, negocios y en casa como detergente, formulaciones de plaguicidas y solubilizantes. El nonilfenol y el 4-*tert*-octilfenol actúan como pseudoestrógenos. Tanto los experimentos *in vivo* como *in vitro* han reportado que estos contaminantes podrían actuar como un compuesto estrogénico (Yang et al., 2020), lo que presenta riesgos para la salud cuando se consumen a través de los alimentos, agua o mariscos contaminados. La exposición a estos contaminantes también puede darse a través de absorción cutánea o inhalación de polvo en interiores (Acir & Guenther, 2018). Al actuar como disruptores endocrinos de los estrógenos pueden alterar la capacidad reproductiva de los seres humanos que los consumen. Un estudio sugirió que el nonilfenol podría ingresar en las células testiculares, lo que puede provocar alteraciones y reducir la actividad de los espermatozoides. Algunos estudios encontraron que el nonilfenol y el 4-*tert*-octilfenol podrían afectar directamente o indirectamente al sistema nervioso central (Yang et al., 2020).

Los fenilfenoles más utilizados son el 2-fenilfenol y el 4-fenilfenol. Son fungicidas utilizados como desinfectante en productos industriales, domésticos y como fungicidas post-

cosecha en la industria de producción de fruta (Frederiksen et al., 2013). Los alquifenoles y fenilfenoles comparten una estructura común con un anillo fenólico.

En la Tabla 8, se presentan las características físico-químicas de los alquifenoles objeto de estudio en la presente Tesis Doctoral. Además, en la Figura 6 se representan las estructuras de contaminantes fenólicos estudiados.

Tabla 8. Propiedades físico-químicas de los contaminantes fenólicos estudiados en esta Memoria (PubMed, 2023).

Compuestos	MM (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad en agua (g/L)	LogKow	pK
Fenol	94	40	181	80	1.47	9.88
3,4-Dimetilfenol	122	63-67	227	5.3	2.23	10.36
2,5-Dimetilfenol	122	75-77	212	3.54	-	-
4-Clorofenol	129	41-45	220	27	2.5	9.41
4-Cloro-3-metilfenol	142	63-65	242	4	-	9.55
4- <i>tert</i> -Butilfenol	150	96-100	236	8.7	2.44	10.16
2- <i>tert</i> -Butil-4-metilfenol	164	50-55	244	insoluble	3.63	11
4-Pentilfenol	164	24	342	-	3.7	-
2-Fenilfenol	170	59-59	282	700	3.30	9.97
4-Fenilfenol	170	164-166	321	700	3.20	9.55
4-Hexilfenol	178	31	-	-	4.3	10.18
4-Heptilfenol	192	28	156	-	4.15	10.16
Nonilfenol	220	8	295	5	5.76	10
4- <i>tert</i> -Octilfenol	206	79-82	-	7	4.12	4.21
Pentaclorofenol	266	191	309	0.01	5.01	4.70

MM: masa molecular; Solubilidad en agua a 20°C; pK_a: constante de disociación ácida; logK_{ow}: coeficiente de repartición de octanol-agua.

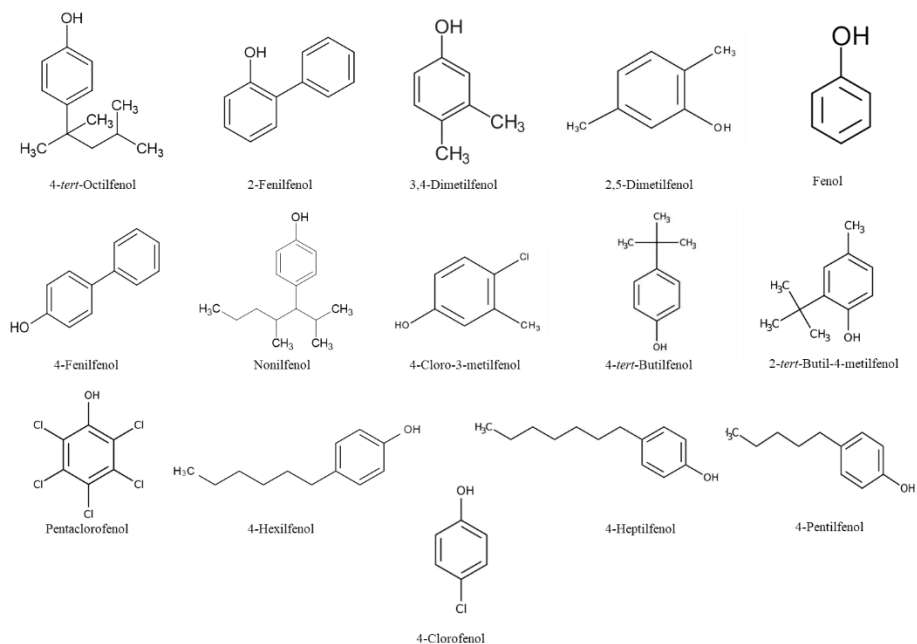


Figura 6. Estructuras de los contaminantes fenólicos objeto de estudio en esta Memoria.

1.2.3.5 Triclosán

El triclosán es un agente antibacteriano sintético, liposoluble y de amplio espectro. Se agrega comúnmente a una variedad de productos industriales y de cuidado personal, tales como jabón de manos, champús, pasta de dientes, productos textiles, juguetes, plásticos y pinturas (Wang & Tian, 2015). Presenta una estructura de éter bifenilo halogenado similar a la del bisfenol A, dioxinas y hormonas tiroideas. Por este motivo se levantaron sospechas, ya que se podría tratar de un disruptor endocrino. En la Tabla 9 se listan las características físico-químicas del triclosán.

En 2011, el uso comercial anual del triclosan fue casi de 100 toneladas en China, con un constante aumento durante los años. Por ello, la aplicación a gran escala de este compuesto orgánico causó una gran incidencia en aguas residuales, ríos, lagos y sedimentos (Guo et al., 2020). Los humanos están expuestos diariamente al triclosán a través del contacto directo con

productos de cuidado personal, y otras fuentes incluyendo alimentos, agua potable y polvo (Xie et al., 2020). La ingestión y la absorción dérmica son las rutas más importantes de la absorción humana de este tóxico (Wang & Tian, 2015).

Tabla 9. Propiedades físico-químicas del triclosán (PubMed, 2023).

Compuesto	MM (g/mol)	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad en agua (mg/L)	LogK _{ow}	pK _a
Triclosán	289	55	120	1	4.76	-

MM: masa molecular; Solubilidad en agua a 20°C; pK_a: constante de disociación ácida; logK_{ow}: coeficiente de repartición de octanol-agua.

Estudios realizados en especies acuáticas y modelos de roedores han demostrado que el triclosán actúa como disruptor endocrino (Wang & Tian, 2015). El triclosán se ha asociado a diferentes problemas de salud, incluida la resistencia a los antibióticos, la irritación de la piel, la alteración endocrina o neurotóxica e incluso reacciones inmunotóxicas bajo la exposición extrema al triclosán (Solá-Gutiérrez et al., 2020). En la Figura 7 se representa la estructura del triclosán en estudio.

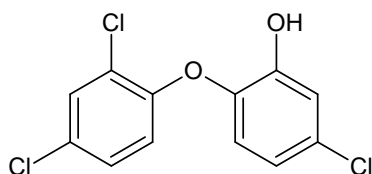


Figura 7. Estructura del triclosán

1.2.3.6 Hidrocarburos policíclicos aromáticos

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs, por sus siglas en inglés) son un grupo de compuestos químicos presentes en el medio ambiente y en los alimentos. Son compuestos orgánicos que contienen dos o más anillos aromáticos. Existen más de cien compuestos de PAHs diferentes y no se presentan de forma aislada sino formando mezclas (Duedahl-Olesen, 2013)

Los PAHs se forman y se liberan de forma natural a través de la contaminación ambiental (por ejemplo: derrames de petróleo, volcanes, incendios forestales, etc.). También puede surgir como resultado de la actividad humana a través de la pirólisis o combustión incompleta de materia orgánica (por ejemplo: basura, madera, gasolina, productos derivados de petróleo y carbón). Por otro lado, estos contaminantes se pueden generar durante el procesado industrial de los alimentos como puede ser el ahumado, la fritura, el secado, el horneado, el asado y la barbacoa de carbón (Kacmaz, 2019).

Los PAHs son contaminantes tóxicos, con altos puntos de fusión y de ebullición. Estas propiedades afectan a la absorción y a la retención tanto en el medio ambiente como en el cuerpo humano (Stallings-Smith et al., 2018). Estos contaminantes presentan otras características, como la sensibilidad a la luz, resistencia al calor, conductividad, capacidad de emisión, resistencia a la corrosión, acción fisiológica y poseen espectros de absorbancia UV muy característicos (Drwal et al., 2019). En la Tabla 10 se presentan las propiedades físico-químicas de los 16 PAHs considerados como prioritarios por la USEPA y que han sido objeto de estudio en esta Memoria.

Tabla 10. Propiedades físico-químicas de los 16 PAHs prioritarios (PubMed, 2023).

Compuestos	MM	Punto de fusión (°C)	Punto de ebullición (°C)	Solubilidad en agua (g/L)	LogKow	pKa
Naftaleno	128	80	218	30	3.1	3.37
Acenaftileno	152	92	265	16	-	4.07
Acenafteno	154	96	279	3.47	3.8	4.33
Fluoreno	166	116	298	1.8	3.9	4.18
Fenantreno	178	101	340	1.29	4.1	4.1
Antraceno	178	218	342	0.073	4.3	4.45
Fluoranteno	202	110	375	0.26	4.3	5.33
Pireno	202	150	404	0.135	4.8	5.32
Benzo(a)antraceno	228	159	435	0.014	4.8	5.61
Criseno	228	256	448	0.0006	4.9	5.86
Benzo(b)fluoranteno	252	168	-	0.0012	6.2	6.57
Benzo(k)fluoranteno	252	217	480	0.00055	5.6	6.84
Benzo(a)pireno	252	179	495	0.0038	5.3	6.04
Dibenzo[a,h]antraceno	278	267	524	0.0005	6.3	6.75
Benzo[g,h,i]perileno	276	278	-	0.00026	-	7.23
Indeno[1.2.3-cd]pireno	276	162	-	0.062	6.2	7.66

MM: masa molecular; Solubilidad en agua a 20°C; pK_a: constante de disociación ácida; logK_{ow}: coeficiente de repartición de octanol-agua.

La exposición a los PAHs se puede producir a través de la dieta y por su inhalación, razón por la cual muchas agencias ambientales y nutricionales están tratando de limitar su propagación (Drwal et al., 2019). Las principales rutas de exposición a algunos PAHs se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11. Principales fuentes de contaminación de los PAHs (Mojiri et al., 2019)

Pireno	Acenaftileno	Fluoreno
Combustión incompleta de fósiles y biomasas especialmente en gasificaciones o pirólisis	Materiales para la producción de pigmentos, polímeros y colorantes avanzados	Motores de turbinas de gas, gasolina y diésel
Acenafteno	Antraceno	Naftaleno
Destilación por aceite de creosota	Combustión incompleta de materiales orgánicos	Alquitrán y durante el refinado del petróleo
Benzo(a)antraceno	Fluoranteno	Benzo (a)pireno
La principal fuente es el aire, combustión de los combustibles y la madera	Se produce a través de quemaduras de maderas y gasolinas	Alquitrán, alimentos (parrilla y ahumados) y humos del tabaco
Benzo(b)fluoranteno	Benzo(k)fluoranteno	
Combustibles fósiles y tabaco	Tabaco y aire contaminado	

Los PAHs además se ser considerados como cancerígenos y mutagénicos diversas investigaciones han demostrado que también pueden afectar al sistema endocrino. Varios estudios han demostrado que estos compuestos actúan como antiestrógenos y antiandrogenos e interfiere con la homeostasis de los organismos al imitar las hormonas endógenas. Por ejemplo, se examinó la actividad de la hormona tiroidea en ratas machos expuestas a benzo[a]pireno durante 72 horas, y los resultados obtenidos revelaron que el benzo[a]pireno descomponía la hormona tiroidea reduciendo la tasa metabólica (Zhang et al., 2016). Otro estudio ha demostrado que el benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, criseno, dibenzo[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-cd]pireno afectan sobres la actividad estrogénica, antiandrogénica y antiestrogénica, a través de la diafonía entre el receptor de hidrocarburos arílicos y el receptor de estrógenos. Este efecto se demostró que la exposición de los PHAs en las primeras etapas de la vida de los peces, inducía toxicidad en el desarrollo e incluía la formación de edema pericárdico (Hawliczek et al., 2012).

Dada la exposición generalizada de las personas a estos contaminantes, y la capacidad de los PAHs para interrumpir la señalización endocrina, se ha demostrado que los PAHs

afectan a la calidad del esperma, la función testicular, la viabilidad del óvulo y enfermedades reproductivas. También se han detectado cánceres en órganos reproductivos (senos, ovarios y próstata) (Bolden et al., 2017). Además del daño al sistema reproductivo, otros estudios han demostrado que la exposición a largo plazo de las personas a los PAHs se asocia con un mayor riesgo de contraer enfermedades como la aterosclerosis, infertilidad, diabetes y cáncer (Tfouni & Camargo, 2012). En la Figura 8 se presenta las estructuras de los 16 PAHs prioritarios y objeto de estudio en esta Memoria.

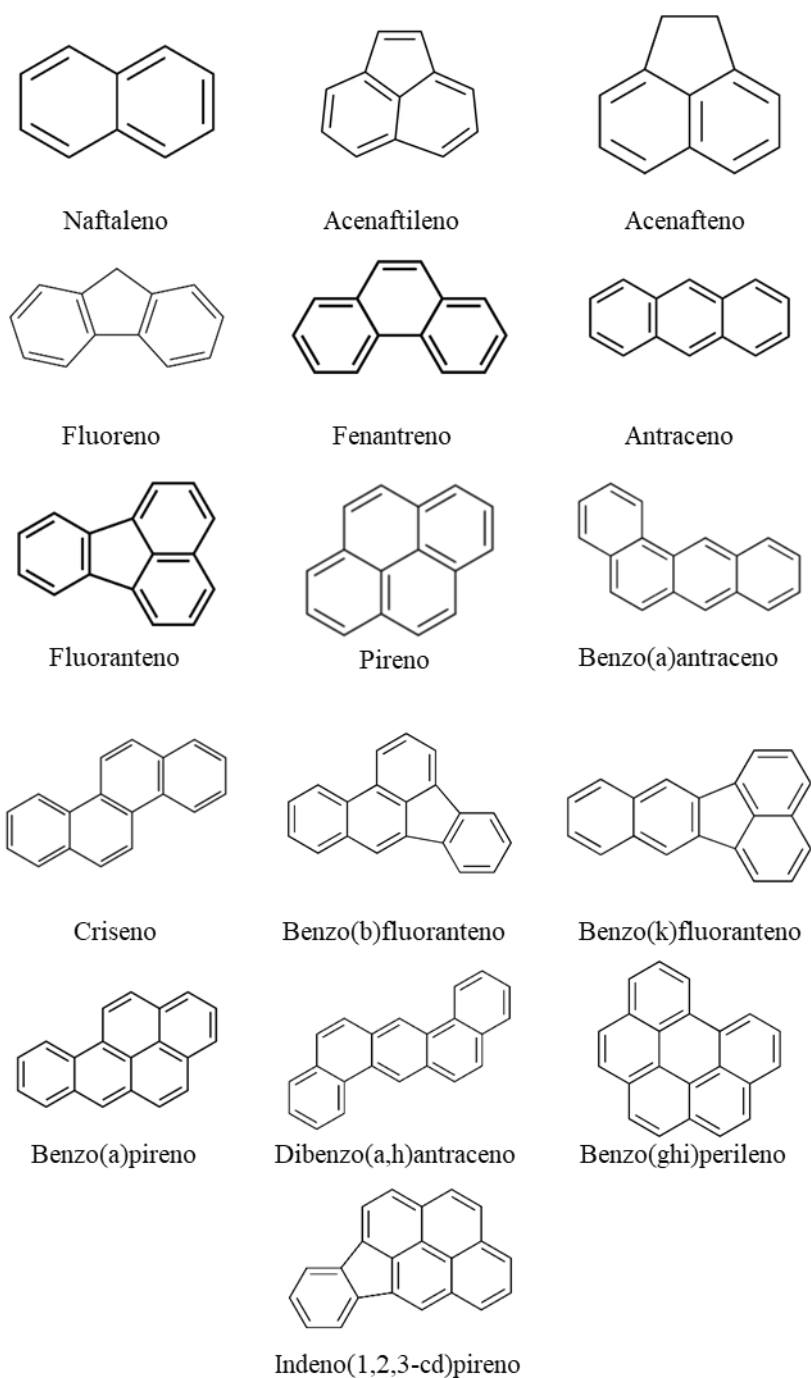


Figura 8. Estructuras de los 16 PAHs prioritarios estudiados.

1.2.4 Normativas sobre disruptores endocrinos en alimentos

En 2018, se emitió en Bruselas un comunicado de la Comisión al Parlamento Europeo sobre los disruptores endocrinos. El comunicado representaba una actualización en materia de modo que siga siendo puntero y abordando de forma coherente la presencia de sustancias endocrinas en diferentes ámbitos, todo ello aprovechando el mayor conocimiento de la materia, los resultados logrados y la experiencia adquirida (Unión Europea, 2018a).

Actualmente, existen disposiciones específicas sobre la manera de abordar la cuestión de los disruptores endocrinos. En el Reglamento (CE) 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo se establecen los Límites Máximos de Residuos (LMR) (Unión Europea, 2009), término que se define como el límite legal superior de concentración de un residuo de plaguicidas en alimentos o pienso establecido con el Reglamento (UE) N° 396/2005 (Unión Europea, 2005). Este reglamento está basado en las buenas prácticas agrícolas y la menor exposición del consumidor necesaria para proteger a todos los consumidores, incluidos a los más vulnerables. Es necesario destacar que estos LMRs no son límites toxicológicos, sino límites toxicológicamente aceptables. Es decir, la superación de un LMR no implica necesariamente la existencia de un riesgo para la salud. Las bases de datos de LMRs lo establece la Unión Europea, apoyándose también en el Codex Alimentarius y, por último, el Registro Oficial de productos fitosanitarios del MAPA. A continuación, en la Tabla 12 se enumera los LMRs de los contaminantes objeto de interés en la presente Memoria de Tesis Doctoral en muestras de leche.

Tabla 12. LMRs de algunos de los EDCs estudiados en esta Memoria.

Contaminantes	mg/kg
Diazinón	0.2
Dimetoato	0.05
Paratión-metil	0.01
Malatión	0.02
BPA	0.05
BPS	0.05
Fenol	0.05
2,6-Dimetilfenol	0.05
4- <i>tert</i> -Butilfenol	0.05

Por otro lado, el Reglamento (CE) N° 1907/2006 (Unión Europea, 2006) es el Reglamento relativo al registro, evaluación, autorización y restricción de las sustancias y mezclas químicas. En este Reglamento, se han incluido restricciones a la fabricación, la comercialización y el uso de determinadas sustancias, mezclas y artículos peligrosos. El pentaclorofenol y el nonilfenol han sido incluidos en esta lista; las restricciones de dichos compuestos se especifican en la Tabla 13. Además, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos, ha considerado al pentaclorofenol como probable cancerígeno (Grupo 2B).

Tabla 13. Restricciones del nonilfenol y pentaclorofenol por el Reglamento (CE) N° 1907/2006

Nonilfenol	<p>No se comercializarán ni utilizarán como sustancias o en mezclas con una concentración igual o superior al 0,1 en peso para los fines siguientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Limpieza industrial e institucional • Limpieza doméstica • Tratamiento de los textiles y del cuero
Pentaclorofenol	<p>No podrá comercializarse ni utilizarse:</p> <ul style="list-style-type: none"> • como sustancia • como componente de otras sustancias, o en mezclas, en concentraciones iguales o superiores al 0,1 % en peso

En cuanto a la legislación en aguas, la Comisión Europea ha incluido varios disruptores endocrinos en la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la Política de Aguas, actualizada por última vez por la Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo. En la lista de sustancias prioritarias se incluyen sustancias como: diclorvos, clorpirifos, pentaclorofenol, nonilfenol, octilfenoles e hidrocarburos policíclicos aromáticos (Unión Europea, 2013).

Para el caso del bisfenol A, la EFSA ha sido clasificado como disruptor endocrino, y sus análogos se han clasificado como tóxicos. La Comisión Europea prohibió el uso de BPA en la industria de los biberones en 2011. La IDT comunicada por la EFSA es de 4.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día. El BPS, uno de los análogos del BPA, también ha sido restringido por la EFSA para su uso en materiales en contacto con alimentos con un LME de 0,05 mg/kg de alimento (EFSA, 2015). Según la EFSA (2006), la exposición de los lactantes al BPA es menor (0.2 g/kg de peso corporal/día) que en los lactantes de 3 meses que consumen leche de botellas de plástico, y se estima que es de 4 g/kg de peso corporal/día para niveles normales de migración y de 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día para niveles altos de migración (EFSA, 2006). El Reglamento (UE) 2018/213 por el que se modifica el Reglamento 10/2011 sobre el uso del BPA en los barnices, revestimientos y materiales de plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos; prohíbe el uso del bisfenol A en los biberones de bebés y otros envases para la comida y establece límites de migración específica de 0.05 mg de BPA por kg de alimento (Unión Europea, 2018b). En Estados Unidos, la exposición de los lactantes al BPA se ha restringido desde que la US Food and Drug Administration (US FDA) prohibió su uso en resinas de policarbonato para biberones y tazas de bebé, resinas epoxídicas en revestimientos para envases de preparados para lactantes y envases metálicos, etiquetados como "sin BPA". El nivel sin efecto adverso observado (NOAEL) para la población general se determinó en 5 mg/kg de peso corporal al día, y para los niños menores de dos años, la ingesta diaria estimada (IDE) fue establecido en 1.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal. Tras la prohibición mencionada, el consumo de BPA se considera seguro en relación con los usos permitidos en envases y recipientes alimentarios (US FDA, 2014). Por otro lado, en Canadá y para proteger a los lactantes y niños pequeños frente al BPA se ha propuesto que el BPA se utilice en concentraciones mínimas en los envases de alimentos para recién nacidos y

lactantes, especialmente en las fórmulas infantiles. Al mismo tiempo, se prohíbe la fabricación, importación y venta de biberones de policarbonato con BPA (Health Canada, 2012).

El Reglamento (CE) 1333/2008 regula los aditivos alimentarios en toda la Unión Europea (Unión Europea, 2008), siendo modificado en 2011 en el Reglamento (UE) 1129/2011 (Unión Europea, 2011b), donde viene recogido los aditivos que se pueden utilizar en el territorio de la Unión Europea, los parabenos autorizados son el metilparabeno y el etilparabeno, están utilizados para utilizarse en patés, recubrimientos de frutos secos, productos de confitería y aperitivos a base de patata y almidón.

Varias organizaciones internacionales como la Agencia Internacional para la Investigación y el Cáncer (IARC) y la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos y el Codex Alimentarius han propuesto una lista de 16 PAHs prioritarios. Además, el IARC, ha clasificado los diferentes PAHs en cuatro grupos: grupo 1 (cancerígenos), grupo 2A (alta probabilidad cancerígena), grupo 2B (baja probabilidad cancerígena) y grupo 3 (no clasificado respecto a la carcinogenicidad) (Tabla 14).

Tabla 14. Lista de PAHs clasificada según su toxicidad (IARC, 2023)

Contaminante	Toxicidad (IARC)	Contaminante	Toxicidad (IARC)
Naftaleno	2B	Benzo(a)antraceno	2B
Acenaftileno	3	Criseno	2B
Acenafteno	3	Benzo(b)fluoranteno	2B
Fluoreno	3	Benzo(k)fluoranteno	2B
Fenantreno	3	Benzo(a)pireno	1
Antraceno	3	Dibenzo[a,h]antraceno	2A
Fluoranteno	3	Benzo[g,h,i]perileno	3
Pireno	3	Indeno[1.2.3-cd]pireno	2B

Actualmente, existen dos legislaciones sobre PAHs. La primera se engloba dentro del Marco Europeo sobre el Agua (European Water Framework, 2023) y la segunda es el

Reglamento (UE) N°835/2011 (Unión Europea, 2011a), en el que fija los contenidos máximos de hidrocarburos policíclicos aromáticos en los productos alimenticios. La fijación de límites máximos en la legislación constituye la medida de gestión del riesgo más eficaz para proteger a la población general de los riesgos alimentarios. En la Tabla 15 se muestran los niveles fijados por el Reglamento de la Unión Europea en lo que respecta a los productos lácteos.

Tabla 15. Contenido máximo permitido de hidrocarburos policíclicos aromáticos en productos lácteos propuesto en el Reglamento (CE) 835/2011.

Producto	Contenido máximo (µg/Kg)	
	Benzo(a)pireno	Suma de benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno y criseno
Preparados para lactantes y preparados de continuación, incluida la leche para lactantes y leche de continuación.	1.0	1.0

Por otro lado, la EFSA ha realizado una evaluación de riesgos relacionada con el consumo de alimentos que contienen parabenos y ha fijado la ingesta diaria admisible (IDA) en 10 mg/kg de peso corporal para el metilparabeno y etilparabeno, y sus sales. El Comité no recomendó una IDA para el propilparabeno debido a la falta de datos sobre efectos adversos (EFSA, 2004). Posteriormente, la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) determinó la IDA del propilparabeno en 1.25 mg/kg de peso corporal (EMA, 2015). Se espera que la presencia de parabenos debida al uso de productos veterinarios sea muy baja en los alimentos procesados industrialmente, por lo que no se ha fijado ningún límite máximo de residuos (Unión Europea, 2015).

1.3 Metodologías analíticas para la determinación de disruptores endocrinos en alimentos

En el apartado anterior queda bien definida la importancia de la detección de los disruptores endocrinos en muestras alimentarias. Los dos problemas que presenta la determinación de estos contaminantes es su concentración a nivel de trazas ($\mu\text{g}/\text{kg}$ – ng/kg) y la complejidad de las muestras de alimentos. Por este motivo, se requiere la combinación de diversas etapas de tratamiento de muestra con el fin de la preconcentración de estos compuestos y eliminar la matriz compleja de los alimentos. En la Figura 9, se incluyen los resultados del estudio bibliográfico sobre las técnicas de extracción más utilizadas para disruptores endocrinos y PAHs en muestras de leche y productos lácteos. Se puede observar que la técnica más aplicada es la extracción en fase sólida (SPE), seguida por el método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe por sus siglas en inglés), las técnicas de extracción líquido-líquido (LLE) y microextracción en fase sólida (SPME).

A continuación, se describen los aspectos más importantes de las técnicas de tratamiento de alimentos.

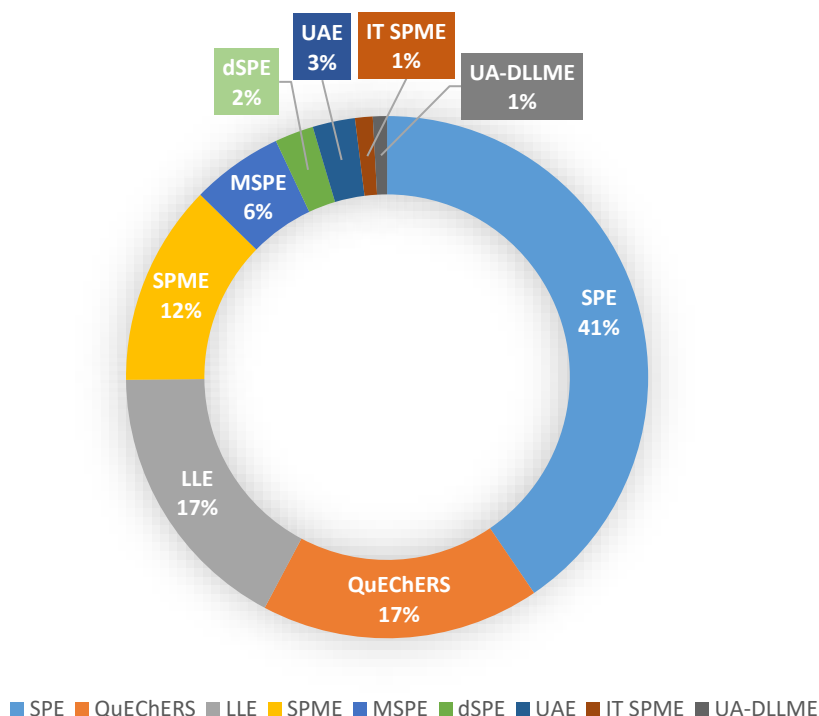


Figura 9. Porcentaje de aplicación de las distintas técnicas extractivas para la extracción de disruptores endocrinos en muestras leche y productos lácteos en las publicaciones aparecidas en el periodo 2012-Presente.

[Fuente Scopus; palabras clave: “pesticides”, “aromatic polycyclic hydrocarbons”, “phenols”, “parabens”, “milk”, “dairy products”, “solid-phase extraction” (SPE), “solid-phase microextraction” (SPME), “liquid-liquid extraction” (LLE), “ultrasonic assisted extraction” (UAE), “in tube solid phase microextraction”(IT SPME), “magnetic solid-phase” (MSPE), “matrix solid-phase dispersion”(dSPE), “QuEChERS”, “ultrasounds-assisted dispersive liquid-liquid microextraction” (UA-DLLME).

1.3.1 Técnicas de tratamiento de muestras de alimentos

El tratamiento de muestra tiene como finalidad aislar los analitos de la manera más eficiente eliminando lo máximo posible el efecto matriz, siendo esta etapa crítica a la hora de obtener unos buenos resultados. Si el procedimiento de extracción no se ha realizado correctamente, parte de los analitos seguirán en la matriz de la muestra cometándose errores en su determinación (Poster et al., 1998). Como se ha comentado en el apartado de

introducción, los EDCs y PAHs se encuentran en alimentos, envases y muestras ambientales a nivel de trazas, lo que indica que existe una necesidad urgente de métodos que sean sensibles, tengan bajos límites de detección y puedan lograr una detección rápida.

Por otro lado, la mayoría de las matrices de alimentos son extremadamente complejas lo que dificulta la determinación de los contaminantes. Por ello, se requieren métodos de tratamiento adaptado y flexible para obtener los datos experimentales más convincentes. Estas técnicas de extracción juegan un papel importante en la purificación de las muestras y la preconcentración de los analitos (Deng et al., 2019). Como se ha comentado en el apartado anterior, la técnica que más se utiliza para estos fines es la SPE. Existen otras técnicas de extracción, como se puede observar en la Figura 9. A continuación, se van a describir las técnicas más utilizadas para el tratamiento de muestras de leche y productos lácteos que se emplean en la determinación de PAHs y EDCs.

1.3.1.1 Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida es una de las técnicas analíticas más utilizadas en la actualidad. SPE ha ganado una amplia aceptación debido a las desventajas que presentan otras técnicas como son la extracción líquido-líquido, tales como que presenta rendimientos reducidos en la extracción de compuestos polares, es laboriosa y lenta, existen la posibilidad de formación de emulsiones que dificulta la separación de las dos fases, la necesidad de evaporación de grandes volúmenes de disolvente y la posterior eliminación de productos químicos tóxicos o inflamables (Płotka-Wasyłka et al., 2015).

La SPE es una técnica ampliamente utilizada para la limpieza de compuestos orgánicos no volátiles en muestras líquidas. Se trata de un procedimiento de retención y preconcentración de los analitos en un solo paso, proporcionando un extracto adecuado para su posterior análisis. Todo esto se fundamenta en la interacción física-química que hay entre la fase sólida y la fase líquida que se ponen en contacto para que la técnica sea efectiva. El proceso completo de esta técnica consiste en 4 etapas (Figura 10). La primera etapa consiste en acondicionar el adsorbente seleccionado; la segunda consiste en cargar la muestra por el adsorbente (los analitos de interés quedan retenidos al adsorbente a medida que pasa el líquido y la matriz es desechada); la tercera es la de lavado (esta etapa puede ser opcional dependiendo

del tipo de matriz de muestra y adsorbente); y la cuarta etapa consiste en la elución y recuperación de los analitos (Elmore, 2015).

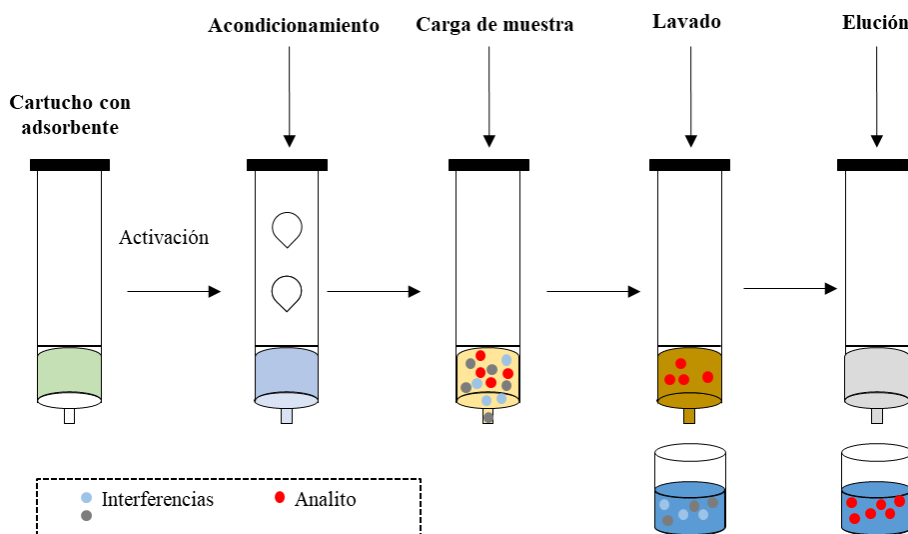


Figura 10. Esquema del proceso de extracción en fase sólida

La interacción entre los analitos objeto de estudio y los materiales adsorbentes pueden estar basadas en diferentes naturalezas (Otero, 2009):

- *Interacciones apolares:* se producen entre los residuos hidrocarbonados de los grupos funcionales del sólido adsorbente y los analitos de la muestra. Dado a su estructura apolar, estos analitos son fácilmente adsorbidos mediante fuerzas de Van der Waals.
- *Interacciones polares:* en estas interacciones se incluyen la formación de puentes de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo e interacciones π - π que pueden ocurrir entre el sólido adsorbente y los grupos funcionales de los analitos, algunas de estas interacciones son posibles entre grupos amino, hidroxilos y carbonilo, al igual que anillos aromáticos, dobles enlaces y grupos de heteroátomos como el nitrógeno, el azufre, el fósforo y el oxígeno.

- *Interacción iónica:* estas se producen entre el analito, con carga positiva o negativa, y un sólido adsorbente con grupo funcional de la carga opuesta, estas retenciones se ven favorecidas si los analitos se encuentran presentes en una matriz de baja fuerza iónica.

La naturaleza y las propiedades del sólido adsorbente son muy importantes para la retención efectiva de los analitos. Los principales requisitos de un sólido adsorbente son: la posibilidad de extraer un gran número de elementos a nivel de traza, poder trabajar a un amplio rango de pH, alta capacidad, regenerabilidad, rápida adsorción y elución cuantitativa de los analitos (Otero, 2009). A continuación, se describen los principales adsorbentes.

- *Adsorbentes inorgánicos:* el más utilizado es la sílica gel, se caracteriza por la presencia de grupos silanol; que son intercambiadores iónicos débiles y permiten la extracción de especies iónicas. La retención cuantitativa de los iones depende en gran medida del pH de la muestra, ya que en condiciones ácidas los grupos silanol se encuentran protonados y su capacidad intercambiadora de iones se ve muy reducida, o incluso, completamente impedida. A pesar de la gran variedad de fases enlazadas disponibles, la C₁₈ es la fase más ampliamente utilizada. Este adsorbente presenta un rango de pH ácidos (por debajo de 4) a pH básicos (por encima de 8). A parte de la sílica en gel, otros adsorbentes inorgánicos empleados son: dióxido de titanio, alúmina, óxido de magnesio y florisil.
- *Adsorbentes orgánicos:* estos adsorbentes se pueden dividir en poliméricos (polímeros naturales y sintéticos) y no poliméricos (carbón y naftaleno). Los adsorbentes orgánicos preconcentran los contaminantes a nivel de traza y pueden ser empleados en todo el rango de pH. La eficiencia de los adsorbentes poliméricos depende de varios factores como el tamaño de partícula, el área superficial, diámetro del poro y el grado de entrecruzamiento. Los adsorbentes orgánicos más empleados son (Otero, 2009):
 - *Amberlitas XAD-1, XAD-2, XAD-4 y XAD-16:* Son resinas macroporosas de poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB). Estas resinas preparadas por impregnación del ligando son difíciles de reutilizar debido a la lixiviación parcial del ligando tras la utilización del polímero).

- *Oasis HBL*. Son polímeros de N-vinilpirrolidona-divinilbenceno (NVP-DVB). Su composición consiste en una proporción equilibrada de N-vinilpirrolidona (permite la humectación de la resina) y divinilbenceno (permite la retención en “fase reversa” de los analitos). Es el adsorbente comercial más utilizado para la extracción de diferentes tipos de compuestos como productos farmacéuticos, proteínas, plaguicidas, edulcorantes, productos químicos, drogas, etc.; partiendo de matrices como alimentos, aguas ambientales, y fluidos biológicos. Oasis HLB no solo extrae los analitos de la matriz, si no que presenta la ventaja de eliminar las interferencias de la matriz de la muestra (Fontanals et al., 2019). Recientemente, se incluye Oasis HLB PRiME (proceso, solidez, mejoras, efecto matriz y facilidad de uso por sus siglas en inglés), diseñado para simplificar los procesos de extracción en fase sólida, además de eliminar más del 95% de las interferencias comunes que se presentan en la matriz como proteínas, sales y fosfolípidos. Este adsorbente presenta la ventaja que no requiere un acondicionamiento para proporcionar excelentes recuperaciones.
- *Lipid (EMR-Lipid)*. El adsorbente “*Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal-Lipid (EMR-Lipid)*” pertenece a un nuevo material adsorbente que elimina de forma selectiva lípidos de la muestra no adsorbiendo los analitos deseados. La eliminación de interferencias de lípidos de matrices complejas es especialmente importante para las técnicas de extracción como QuEChERS (Zhao & Lucas, 2015).

Como puede verse en la Figura 9, la técnica de SPE es la técnica más popular para la determinación de EDCs en productos lácteos, ya sea sola o en combinación con otras técnicas. Autores como Azzouz et al. (2016), Casajuana & Lacorte (2004), Grumetto et al. (2013), Liao & Kannan (2013) y Ye et al. (2008) han determinado EDCs en productos lácteos, usando la técnica de SPE para el tratamiento de las muestras, obteniéndose unos rangos de recuperación de 86-104%, 73-81%, 93-106%, 66-126% y 84-119%, respectivamente. Otros autores han utilizado la técnica de SPE junto a otras técnicas para la extracción de diferentes EDCs. Por ejemplo, Chung et al. (2010) y Shariatifar et al. (2020) aplicaron las técnicas de SPE y LLE

para la extracción de PAHs presentes en muestras de leche, obteniéndose unos valores de recuperación de 80 a 120% y 86-100%, respectivamente. También Gul et al. (2105), Lee et al. (2015), Naccari et al. (2011) y Santonicola et al. (2017) aplicaron las técnicas de SPE y LLE junto a la saponificación en diferentes métodos para la determinación de PAHs en productos lácteos, obteniéndose recuperaciones de 73-93%, 87-103%, 89-94% y 65-89% respectivamente. Gazzotti et al., (2009) aplicaron ambas técnicas de extracción para la extracción de plaguicidas organofosforados en leche, obteniéndose recuperaciones entre el 60 y el 167%. Shamsipur et al. (2016) han propuesto un método para la determinación de plaguicidas en leche, usando para el tratamiento de la muestra las técnicas de SPE y DLLME, obteniéndose unos valores de recuperación de 66-102%. Finalmente, Pluta-Kubica et al. (2020) usaron la técnica de SPE y el método Soxhlet para la extracción de PAHs en queso obteniendo unos valores en el límite de cuantificación de 900-20 000 ng/kg.

1.3.1.2 Microextracción en fase sólida

A principios de la década de 1990, se introdujo por primera vez la técnica microextracción en fase sólida (Arthur & Pawliszyn, 1990). Abordaba la necesidad de una preparación de muestra rápida y sin solventes que combina el muestreo, aislamiento y la preconcentración simultánea para analitos volátiles y no volátiles en muestras complejas en un solo paso (Jalili et al., 2020).

La técnica de SPME se basa en el uso de una fibra recubierta con un adsorbente polimérico para extraer analitos de una variedad de matrices. La extracción se realiza exponiendo el recubrimiento de fibra a una matriz de muestra o extracto, o suspendiéndola en el espacio de cabeza, hasta alcanzar un equilibrio entre el analito y la fibra de recubrimiento. Después del equilibrio los analitos atrapados se determinan colocando la fibra de recubrimiento en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases o vial de desorción para el análisis de cromatografía líquida. El principio de extracción depende del equilibrio de reparto del analito entre la matriz de muestra y la fase de extracción (Huang et al., 2019). En resumen, esta técnica tiene dos etapas fundamentales (Lord & Pawliszyn, 2000):

1. Extracción de los analitos de la muestra hacia la fibra. La aplicación de SPME se puede dar por dos procedimientos:

- a) *Microextracción en fase sólida por inmersión directa (DI-SPME)*. En el procedimiento de DI-SPME, permite que la fibra interactúe directamente con la solución de muestra por inmersión. En esta etapa, los analitos se extraen directamente del medio matriz a la fase estacionaria inmobilizada de la fibra (Figura 11) (Yilmaz & Soylak, 2020).

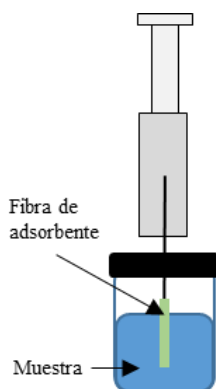


Figura 11. Esquema de microextracción en fase sólida por inmersión directa.

- b) *Microextracción en fase sólida por espacio de cabeza (HS-SPME)*. En el procedimiento de HS-SPME, los analitos no están en contacto directo con la matriz de la muestra. Sirve para la extracción de compuestos volátiles en muestras sólidas y líquidas. El recubrimiento de la fibra no se ve afectado, ni dañado por las impurezas no gaseosas de la matriz de la muestra y de los disolventes (Yilmaz & Soylak, 2020).

2. Desorción de los analitos para su determinación. A pesar de las ventajas que presenta esta técnica, también presenta algunas limitaciones. Algunas de estas limitaciones son la cantidad reducida de adsorbentes, la fragilidad de la fibra, los posibles efectos de memoria a la hora de reutilizarla, su elevado coste y la dificultad del acoplamiento on-line con otras técnicas instrumentales.

La técnica de SPME ha sido utilizada por varios autores en la etapa de preparación de muestra en metodología para la determinación de distintas familias de EDCs en muestras de leche y derivados lácteos, Por ejemplo, Aguinaga et al. (2007) y Lin et al. (2016) determinaron PAHs en productos lácteos, obteniendo unos valores de recuperación de 88-112% y 75-108%, respectivamente. Otro autores como Mei et al. (2015) han aplicado esta técnica para la extracción de compuestos fenólicos en muestras de leche, con porcentajes de recuperación de 76-118%.

1.3.1.3 Microextracción en fase sólida por tubo

Como consecuencia de la gran variedad de muestras y analitos que se han determinado por SPME, en los últimos años, se han desarrollado variantes de esta técnica de extracción para hacerla más rápida y efectiva. “In tube-SPME” (IT-SPME) es una variante que surge principalmente del acoplamiento en línea con un cromatógrafo. Por lo que se combina las ventajas de SPME con la separación y detección en línea de los analitos. La técnica de IT-SPME se basa en el uso de un tubo capilar de sílice fundida empaquetado o recubierto en su superficie interna con una fase extractiva. La muestra pasa a través del capilar, extrayendo los analitos por adsorción. Los analitos extraídos son desorbidos por un disolvente llenado dicho capilar, y este disolvente es recogido en línea con el instrumento analítico, para su detección y cuantificación (Moliner-Martínez et al., 2019).

La técnica de IT-SPME es menos utilizada en los métodos para la determinación de EDCs en productos lácteos. Autores como Pang et al. (2018) han propuesto un método analítico basado en el uso esta técnica en la etapa de tratamiento de muestra con el objeto de determinar 10 PAHs en muestras de leche. Estos autores consiguieron porcentajes de recuperación entre el 76 y el 119%.

1.3.1.4 Extracción en fase sólida magnética

La extracción en fase sólida magnética (MSPE) es un nuevo tipo de SPE basado en el uso de adsorbentes magnéticos. Esta técnica de extracción ha sido estudiada debido a su

potencial aplicación en varios campos de la ciencia de la separación. En general, el material adsorbente no necesita empaquetarse en ningún tipo de dispositivo, como en SPE tradicional (Vasconcelos & Fernandes, 2017). La técnica MSPE implica la adición de un adsorbente magnético en partículas a la solución de la muestra. Los analitos de interés se adsorben sobre el material magnético. Las partículas magnéticas (que absorben los analitos) se separan de la solución de muestra mediante la aplicación de un campo magnético externo. Finalmente, los analitos se recuperan del adsorbente por elución con el disolvente apropiado y posteriormente se analiza (Herrero-Latorre et al., 2015). Un esquema general para el procedimiento MSPE se muestra en la Figura 12.

Algunas de las ventajas que presenta la técnica de MSPE sobre la extracción tradicional en fase sólida son: evita procedimientos de SPE en columna tediosos, proporciona una separación de analitos rápida y simple que evita la necesidad de centrifugación o etapas de filtración. Los adsorbentes magnéticos sintetizados hasta la fecha tienen una alta selectividad, incluso cuando se analizaron matrices complejas de campos ambientales o biológicos, dado que la mayoría de las impurezas de la muestra son diamagnéticas, no interfieren con las partículas magnéticas durante el paso de separación magnética y la automatización de todo el proceso es posible con el análisis de inyección de flujo y otras técnicas relacionadas, que conducen a métodos rápidos, selectivos, sensibles y repetibles para determinaciones de rutina (Herrero-Latorre et al., 2015).

Esta técnica también ha sido empleada en las etapas previas de preparación de muestra para la determinación de EDCs. Así por ejemplo, investigadores como Zhang et al. (2012) la han usado para la determinación de 6 PAHs en muestras de leche. No obstante, estos autores han obtenido unos rendimientos bajos de recuperación (42-62%).

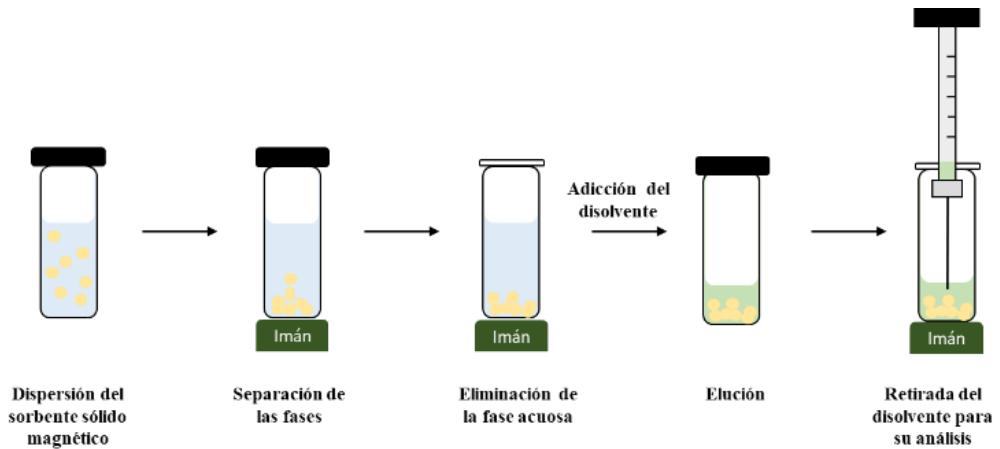


Figura 12. Esquema del procedimiento para llevar a cabo la extracción en fase sólida magnética.

1.3.1.5 Extracción en fase sólida dispersiva–método QuEChERS

La extracción en fase sólida dispersiva (dSPE) es una técnica rápida y sencilla para llevar a cabo la limpieza de muestras. Tras su desarrollo alcanzó un gran número de publicaciones en el análisis de plaguicidas, especialmente para el análisis de frutas y verduras, ya que demostró una mayor recuperación y reproducibilidad. Basado en este tipo de extracción Anastassiades et al. (2003) publicaron un método nombrado QuEChERS que es un acrónimo creado de las palabras en inglés de Quick (rápido), Easy (sencillo), Cheap (barato), Effective (eficaz), Rugged (robusto) y Safe (seguro) (Varela-Martínez et al., 2019). Este método se hizo popular debido a su procedimiento de extracción a micro-escala, siendo más simple, más rápido y utilizando menos solventes orgánicos que otros métodos (Narendran et al., 2020). Al mismo tiempo y como resultado de la especificidad de cada analito y matriz de muestra, aparecieron algunas modificaciones, como el uso de tampones para evitar la degradación del pH de cierto analitos (Varela-Martínez et al., 2019).

El método QuEChERS fue adoptado como método oficial de AOAC (Asociación de Comunidades Analíticas) y otro método estándar del Comité Europeo de Normalización (Varela-Martínez et al., 2019). El procedimiento comúnmente usado implica un paso inicial

de extracción con acetonitrilo debido a su alta recuperación seguida de un fenómeno de repartición líquido-líquido por adición de sulfato de magnésico anhidro (MgSO_4) y cloruro de sodio (NaCl). El MgSO_4 ayuda en el proceso de extracción a mejorar la recuperación y favorecer el reparto en la fase orgánica, por otro lado, el NaCl ayuda a controlar la polaridad. El acetato sódico y otras sales actúan controlando el pH. El segundo paso implica la eliminación del agua residual y la limpieza mediante la adición de una mezcla basada en MgSO_4 y un adsorbente, como una amina primaria y secundaria (PSA). Por último, se lleva a cabo una centrifugación y el extracto está listo para ser directamente analizado o sometido a evaporación y recomposición en el disolvente apropiado para su análisis.

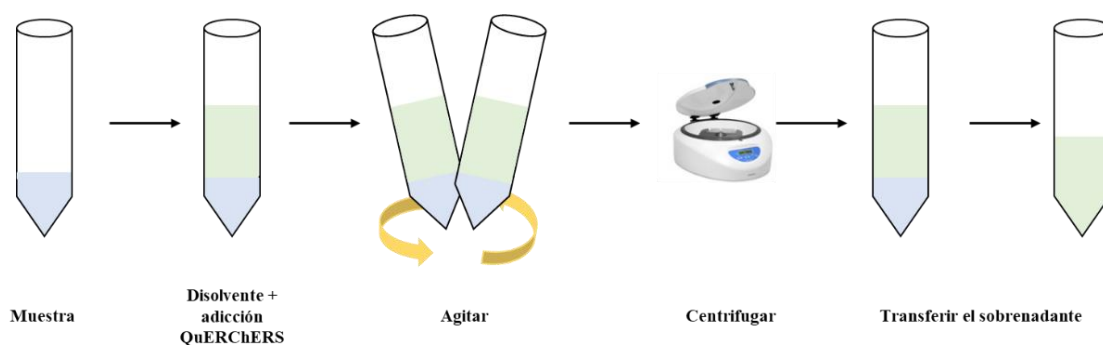


Figura 13. Esquema del procedimiento para llevar a cabo la extracción método QuERChERS

Como se puede observar en la Figura 9, el método QuERChERS es muy aplicado para la determinación de EDCs. Investigadores como Al-Julaifi et al. (2015), Chung et al. (2010) y Manav et al. (2019) determinaron plaguicidas organofosforados por el método QuERChERS en productos lácteos, con unos porcentajes de recuperación entre 70-130%. Dualde et al. (2019), Tuzimski & Szubartowski (2019) y Xiong et al. (2018) analizaron bisfenoles y parabenos en leche, con porcentajes de recuperaciones de 83-115%, 57-88% y 76-94%, respectivamente. Por último, autores como Sun et al. (2020) determinaron 16 PAHs en muestras de leche con recuperaciones entre 63-105%.

1.3.1.6 Extracción líquido-líquido

La técnica de extracción líquido-líquido (LLE) se basa en la transferencia de una sustancia de un líquido A a un líquido B, inmiscibles entre ambos. El fundamento principal de esta técnica se basa en la relación entre los coeficientes de reparto y distribución de los analitos entre las dos fases en contacto. La selección adecuada del disolvente de extracción es la clave para el funcionamiento de la extracción. Algunas de las propiedades a tener en cuenta son (Cela et al., 2003):

- a) *Relación de distribución del soluto*: indica la solubilidad del soluto en el disolvente, cuando la relación de distribución es mayor, el volumen de disolvente será mínimo.
- b) *Selectividad*: diferencia en la solubilidad entre soluto y diluyente. Hay un menor número de etapas de contacto a mayor selectividad.
- c) *Gravedad específica*: una considerable diferencia entre las densidades de los disolventes logra una mejor separación de los componentes.
- d) *Viscosidad*: una baja viscosidad favorece la transferencia de las moléculas del soluto hacia el disolvente.
- e) *Tensión interfacial*: se requiere alta ya que requiere una alta coalescencia de las gotas de la emulsión favoreciendo la separación.
- f) *Volatilidad*: la volatilidad del solvente tiene que ser muy distinta a la del soluto, la separación se puede hacer por evaporación instantánea o destilación, debido a eso se busca solventes con alta volatilidad.
- g) *Reactividad*: la reactividad del disolvente debe ser estable e inerte químicamente, respecto al analito y al material de trabajo.

Esta técnica permite llevar a cabo extracciones de manera relativamente rápidas a niveles traza, normalmente esta técnica se aplica en combinación con una etapa de *clean-up* para eliminar compuestos coextraídos junto a los analitos y que pueden interferir en la determinación cromatográfica. En esta técnica se pone en contacto la muestra líquida que contienen los analitos junto a un volumen determinado de otro disolvente no miscible con el

disolvente original de la muestra, se agita vigorosamente y se deja decantar hasta observar una separación entre ambas fases. La extracción líquido-líquido no requiere un equipamiento especial y es fácil de operar, lo que se hace adaptable para el pretratamiento de muestra. Sin embargo, el uso excesivo de solventes orgánicos, la pérdida de analitos y las bajas eficiencias de extracciones hace que se aplique con más frecuencia la microextracción líquido-líquido (Valcárcel & Cárdenas, 2000).

El uso de la técnica de LLE está muy extendido junto a otras técnicas de extracción o de limpieza de muestra; entre ellas se encuentra extracción en fase sólida. Varias familias de ECDs han sido analizadas por estas técnicas como por ejemplo: Chung et al. (2010) y Shariatifar et al. (2020) aplicaron las técnicas de LLE y a SPE para la determinación de PAHs en muestras de leche, obteniéndose unos valores de recuperación de 80-120% y 86-100%, respectivamente. Battisti et al., (2015), Iwegbue & Bassey. (2013) y Kacmaz. (2019) realizaron una saponificación junto a la aplicación de la técnica de LLE para la determinación de PAHs, obteniéndose unas recuperaciones entre 84-106%, 79-99% y 84-106%, respectivamente. Gul et al. (2105), Lee et al. (2015), Naccari et al. (2011) y Santonicola et al. (2017) aplicaron la técnica de LLE junto a SPE y saponificación para la determinación de PAHs en productos lácteos, obteniéndose recuperaciones entre 73-93%, 87-103%, 89-94% y 65-89% respectivamente. Finalmente, Gazzotti et al., (2009) usaron las técnicas de LLE y SPE en un método para la determinación de pesticidas organofosforados en leche. Estos autores consiguieron recuperaciones entre 60 y 167%.

1.3.1.7 Microextracción dispersiva líquido-líquido

En los últimos años, existe un creciente interés en la simplificación y miniaturización de los sistemas de tratamiento de muestra, introduciendo disolventes menos contaminantes y disminuyendo considerablemente las cantidades de disolventes orgánicos. La microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) fue introducida por Assadi y sus colaboradores en 2006 y consta principalmente de dos etapas (Rezaee et al., 2010):

- Inyección de una mezcla apropiada de disolvente de extracción y un disolvente dispersivo en una muestra acuosa que contiene los analitos: En este paso, el disolvente de extracción se dispersa en la muestra acuosa como gotas muy finas y los analitos se enriquecen con él. Debido a la gran área superficial entre el solvente de extracción y la muestra acuosa, el estado de equilibrio se logra rápidamente y la extracción es independiente del tiempo.
- Centrifugación de la disolución turbia: Después de la centrifugación, los analitos en la fase sedimentada pueden determinarse mediante instrumentos analíticos.

La técnica de DLLME se ha convertido en una técnica de preparación de muestras muy popular, sus principales ventajas son: el consumo insignificante de disolvente de extracción, corto tiempo de extracción y el alto factor de enriquecimiento debido a la alta relación de fase del donante (muestra acuosa) y receptor (disolvente de extracción) (Yan & Wang, 2013). En consecuencia, la técnica DLLME es simple, rápida, económica y fácil de operar. Este método llama la atención debido a la amplia gama de aplicaciones tanto para analitos orgánicos como inorgánicos en diferentes muestras. En la Figura 14, se presenta un esquema general para el procedimiento DLLME.

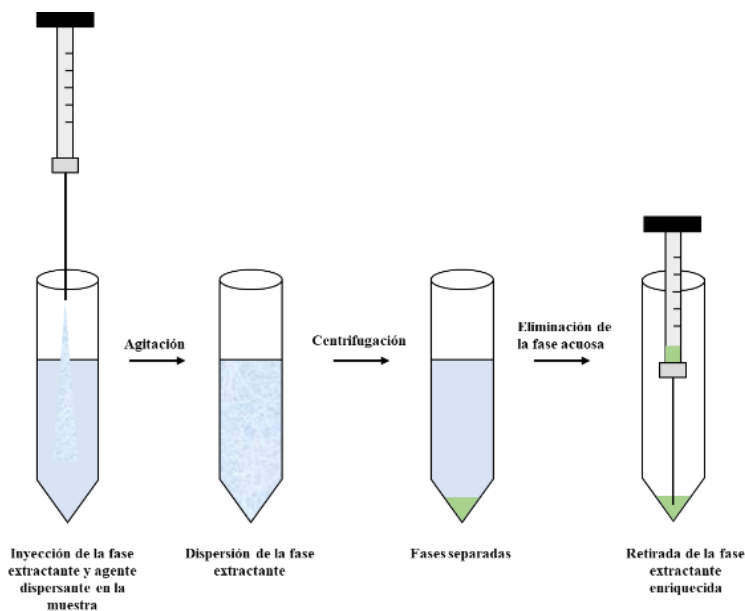


Figura 14. Esquema de microextracción dispersiva líquido-líquido

A partir de esta técnica se han desarrollado nuevas variantes como la microextracción líquida-líquida dispersiva asistida por ultrasonidos (UA-DLLME). En esta variante se utiliza la energía ultrasonidos para generar la dispersión de la fase extractante, obviando el agente dispersante; en la últimas publicaciones se ha incluido un disolvente orgánico con el fin de favorecer la formación de la emulsión. Esta variante de DLLME presenta algunas ventajas como por ejemplo la eliminación del agente dispersante, mejoras en la eficacia y velocidad de la extracción (Fernández, 2017).

Varios investigadores han utilizado esta técnica junto a otras técnicas para la extracción de plaguicidas y compuestos fenólicos. Por ejemplo, Shamsipur et al. (2016) ha propuesto un método para la determinación de diclorvos y diazinon que empleaba las técnicas de SPE y DLLME en la etapa de tratamiento de muestra, obteniendo porcentajes de recuperación de 66-102%. Investigadores como Qiao et al. (2022) y Lv et al. (2014) determinaron bisfenoles, 4-clorofenol, nonilfenol y octilfenol en productos lácteos, usando la

técnica UA-DLLME para la extracción de los analitos. Estos autores consiguieron unos porcentajes de recuperación de 83-119%.

1.3.1.8 Extracción asistida por microondas

La extracción asistida por microondas (MAE) es una técnica de extracción verde automatizada y bien establecida. La técnica MAE es un proceso que consiste en poner una matriz que contiene analitos de interés con un disolvente adecuado, el cual se calienta por la energía de las ondas electromagnéticas, la extracción depende de la temperatura aplicada y de la naturaleza del solvente (Llompart et al., 2019). La energía de microondas es una radiación no ionizante (frecuencia 300-300000 MHz), que puede penetrar en ciertos materiales e interactuar con el componente polar para generar calor. Para que se genere este calor en el proceso de extracción es necesario que el disolvente posea propiedades dieléctricas. El calentamiento de la energía de microondas actúa directamente sobre las moléculas por conducción iónica y rotación de dipolos (Wang et al., 2016). En la mayoría de los casos estos dos mecanismos de interacción se producen simultáneamente (Vinatoru et al., 2017):

- La conducción iónica: se refiere a la migración electroforética de los portadores de carga (por ejemplo, iones y electrones) bajo la influencia del campo eléctrico producido por microondas.
- La rotación dipolo: se relaciona con el movimiento alternativo de moléculas polares que intentan alinearse con el campo eléctrico. Las colisiones múltiples de esta agitación de moléculas generan liberación de energía, lo que resulta en un calentamiento rápido.

Las principales ventajas de la técnica de MAE es la reducción del tiempo de extracción, que se puede atribuir principalmente a la diferencia en el rendimiento de calentamiento del microondas y el calentamiento convencional. MAE pertenece más a la química verde que otros métodos clásicos y ofrece ventajas como; acortamiento significativo del tiempo para muchos procesos con ahorros posteriores de energía; uso de menos

disolventes, lo que reduce la generación de residuos y evita la contaminación; método de bajo costo con mayor productividad; y brinda la posibilidad de acoplamiento en línea a otros pasos analíticos (Wang et al., 2016).

Autores como Fang et al. (2012) realizaron una extracción asistida por microondas en fase sólida para la determinación de plaguicidas en leche infantil, obteniéndose porcentajes de recuperación de 72-111 %.

1.3.1.9 Extracción asistida por ultrasonidos

La extracción asistida por ultrasonidos (UAE) consiste en utilizar ondas de ultrasonidos para agitar la muestra en contacto con un disolvente orgánico (Cela et al., 2003). Los ultrasonidos son ondas mecánicas que presentan una frecuencia igual o superior a los 20 kHz, y se propagan en un medio elástico generando zonas que alternan la compresión y la expansión, en estas regiones se produce el fenómeno de cavitación, basado en la formación de microburbujas de gas que se expanden o contraen hasta alcanzar un punto crítico, generando zonas de alta presión y temperatura (Fernández, 2017). Esta técnica acorta el tiempo de extracción por el incremento de presión que se produce en el interior de la muestra, favoreciendo la penetración del disolvente en la matriz, y un aumento en la solubilidad debido al incremento de la temperatura (Cela et al., 2003). Normalmente, la UAE se realiza en un baño de ultrasonidos, en la cual la muestra recibe desde el exterior la radiación, o mediante una sonda que pone en contacto directo el binomio muestra-extractante.

Autores como Quiao et al. (2022), determinaron bisfenoles y 4-clorofenol en leche, donde utilizaron una combinación de microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonidos, obteniendo unos porcentajes de recuperación de 83-119%.

1.3.2 Técnicas para la determinación de contaminantes orgánicos en alimentos

Del estudio bibliográfico realizado se desprende que los métodos de separación cromatográficas son las técnicas analíticas más empleadas para la separación y detección de

contaminantes y residuos en alimentos objeto de estudio en esta Memoria. Tanto la cromatografía de gases (CG) como cromatografía líquida en columna (HPLC) se usan ampliamente en este campo con distintas modalidades de detección, otras técnicas analíticas empleadas con son electroforesis, espectroscopia y sensores, sin embargo, estas técnicas se emplean entre 1 a un 2 %. La cromatografía de gases se emplea en un 66%, seguido de HPLC en un 29% (Figura 15). En este apartado de la Memoria se incluyen los aspectos más relevantes las técnicas cromatografías.

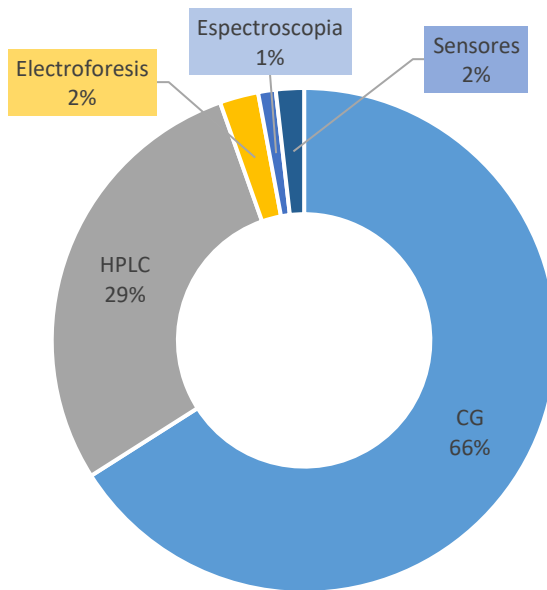


Figura 15. Porcentaje de los principales métodos analíticos para la determinación y cuantificación de disruptores endocrinos en muestras leche y productos lácteos en las publicaciones aparecidas en el periodo 2012-Presente.

[Fuente Scopus; palabras clave: “pesticides”, “aromatic polycyclic hydrocarbons”, “phenols”, “bisphenols”, “nonyphenol”, “parabens”, “milk”, “dairy products”, “chromatographic liquid” (HPLC), “chromatographic gas” (CG) “sensors” “electrophoresis” “spectroscopy” “spectrofluorescence” .

1.3.2.1 Cromatografía de gases

En la Figura 16 se incluyen las partes básicas de las que se compone un cromatógrafo de gases. En primer lugar, la muestra se introduce en en el inyector del cromatógrafo, ya sea mediante inyección de líquidos o por desorción térmica desde un sólido. El inyector debe de

estar a una temperatura mayor a la del punto de ebullición del disolvente de la muestra y la de los analitos. La muestra es diluida por el gas portador y una fracción de este gas portador es la que entra en la columna, si se utiliza la modalidad de división de flujo. Posteriormente, en la columna se realiza la separación de los analitos dependiendo de la temperatura y la afinidad de los analitos por la fase estacionaria. La columna se encuentra dentro de un horno. Tras atravesar la columna, los analitos llegan a un detector, donde se produce una señal eléctrica que es amplificada y enviada a un sistema de almacenamiento de datos para ser analizada (Sogorb & Vilanova, 2004).

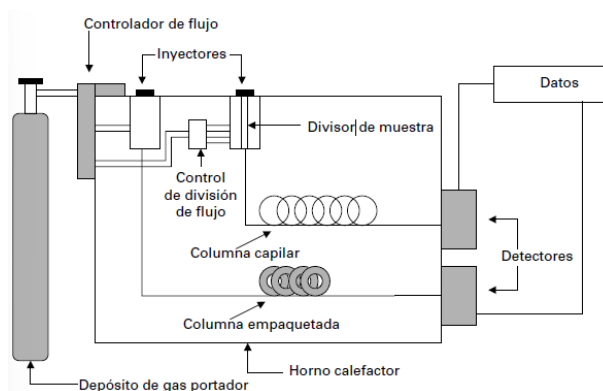


Figura 16. Esquema de un cromatógrafo de gases (Sogorb & Vilanova, 2004).

Un sistema de cromatografía de gases comprende dos fases: una fase móvil y una fase estacionaria. La fase móvil es un gas inerte también conocido como gas portador (normalmente helio, hidrógeno o nitrógeno), su función es la de transportar el analito a través de la columna y transportar una matriz adecuada al detector. Se recomienda el helio para lograr separaciones más rápidas. Los analitos se distribuyen entre las fases móvil y estacionaria dependiendo de su afinidad relativa por ambos. Por lo tanto, los compuestos con mayor afinidad por la fase estacionaria se retienen más tiempo y se eluyen más tarde que otros.

1.3.2.1.1 Clasificación de CG según la fase estacionaria

La separación cromatografía en CG se lleva a cabo por dos principios: cromatografía de gas-sólido (CGS) (cromatografía de adsorción) y cromatografía de gas-líquido (CGL)

(cromatografía de partición). La modalidad CGS es limitada a moléculas polares, la fase estacionaria es un sólido sobre el que se retienen los analitos por adsorción física. La retención de los analitos depende de la fase estacionaria en función de la solubilidad en el líquido. Su aplicación es limitada debido a la retención semipermanente de las moléculas activas o polares y en la obtención de picos de elución con colas muy notables (Sogorb & Vilanova, 2004). La modalidad de CGL, es de gran aplicación en todos los campos de la ciencia. Su denominación se suele abreviar como cromatografía de gases (CG). En CGL, la fase estacionaria es un líquido inmovilizado sobre un soporte inerte de alto punto de ebullición, esta fase debe ser estable y no volátil a las temperaturas empleadas en el análisis, y de temperatura similar a las muestras que se desea separar en ella (Skoog et al., 2018).

1.3.2.1.2 Fases estacionarias de las columnas cromatográficas

Las propiedades deseables de una fase estacionaria en cromatografía gas-líquido son: baja volatilidad, estabilidad térmica y químicamente inerte. La elección apropiada es decisiva para obtener una buena separación. Para que un analito tenga un tiempo de retención razonable en la columna, debe presentar cierto grado de compatibilidad (solubilidad) con la fase estacionaria (Skoog et al., 2018). Las fases estacionarias se pueden clasificar en polares, no polares y semipolares. En la Tabla 16, se muestra las fases estacionarias más ampliamente utilizadas para la CGL.

Tabla 16. Fases estacionarias para cromatografía gas-líquido (Sogorb & Vilanova, 2004)

Fase estacionaria	Límite de temperatura
No polares	
Escualeno	150
100% metilpolisiloxano	300
5% fenil/95% metipolisiloxano	300
Moderadamente polares	
14% cianopropilfenil/86% metilpolisiloxano	300
50% fenil/50% metipolisiloxanofenilsiloxano carborano	225
Polares	
50% cianopropil/50% metipolisiloxano	275
50% trifluoropropil/50/ metipolisiloxano	250
Polietilenglicol	225
Muy polares	
70% cianopropilpolisilfenilenosiloxano	250
Poli (dietilenglicol succinato)	200

1.3.2.1.3 Control de temperatura

La temperatura es el factor clave en cromatografía de gases. Existen tres zonas del CG donde esta variable debe de ser controlada; el inyector, el horno y el detector (Valcárcel & Cárdenas, 2000). Sin embargo, el factor más determinante para que se produzca una separación analítica, está determinada por la temperatura del horno. El aumento de la temperatura de la columna acelera la elución de los analitos, ya que aumenta su volatilidad y por lo tanto la velocidad con que se desplazan en la fase móvil.

En cromatografía se puede trabajar en dos modos: en condiciones isotermas, donde la temperatura es constante y en gradiente, donde la temperatura varía a lo largo de cromatograma. El uso de gradientes de temperatura mejora la resolución cromatográfica disminuyendo el ancho de los picos y evitando o disminuyendo la formación de colas en los picos. También con el uso de gradientes de temperatura se reduce el tiempo para llevar a cabo la separación cromatográfica y se incrementa la sensibilidad. Por lo cual la modalidad de gradiente es la más usada (Skoog et al., 2018).

1.3.2.1.4 Detectores

La misión del detector es poner de manifiesto el paso de los analitos originando una señal eléctrica, siendo registrada y enviada a un microprocesador (Valcárcel & Cárdenas, 2000). Existe una gran variedad de detectores que indican los cambios de composición del gas que eluye de la columna. Un detector universal será aquel que responda a todos los compuestos, mientras que resultará tanto más selectivo cuantas menos familias de componentes o solutos sean detectadas (Cela et al., 2003). En la Tabla 17, se presenta los detectores más comunes, utilizados en CG, junto a las características generales. Los detectores más sensibles han permitido el desarrollo de métodos de análisis de componentes al nivel de trazas o ultratrazas (Sogorb & Vilanova, 2004).

Tabla 17. Características generales de los detectores para cromatografía de gases (Cela et al., 2003).

Detector	Acrónimo	Tipo	Selectivo para
Conductividad térmica	TCD	Universal	Cualquier soluto con conductividad térmica diferente de la del portador
Ionización de llama	FID	Selectivo	Solutos que se ioniza en una llama de aire/hidrógeno
Ionización termoiónica	NPD	Selectivo	Solutos con nitrógeno, fósforo y heteroátomos
Captura electrónica	ECD	Selectivo	Solutos capaces de capturar electrones térmicos
Fotoionización	PID	Selectivo	Solutos ionizables por la radiación UV
Conductividad electrolítica	ELCD (HALL)	Selectivo	Solutos con halógenos, nitrógeno o azufre
Fotométrico por llama	FPD	Específico	Solutos con fosforo y azufre
Espectrometría de masas	MSD	Universal/ específico	Ajustable para cada especie
Espectrometría infrarroja	FTIR	Universal	Registra vibraciones moleculares
Emisión atómica	AED	Universal/ selectivo	Ajustable a los diferentes elementos y selectivo para heteroátomos

En la Tabla 18, se recogen algunos de los métodos más recientes para la determinación de EDCs en productos lácteos basados en el uso de la GC. Estos analitos y muestras serán objeto de estudio en esta Memoria. En esta Tabla además se incluyen las técnicas de preparación de muestra, el detector utilizado, así como las principales características analíticas de los métodos seleccionados. Como se puede observar en la Tabla 18, el detector más utilizado para la determinación de EDCs en productos lácteos es el de espectrometría de masas. Este detector se describirá con más profundidad en el Apartado 1.3.2.1.4 de esta Memoria.

Tabla 18. Métodos para la determinación de EDCs en muestras de productos lácteos basados en la cromatografía de gases.

Analitos	Muestras	Tratamientos de muestras	Técnicas	Características analíticas	Referencias
BPA y nonilfenol	Leche	SPE	GC-MS	LOD: 150 000-180 000 ng/L RSD: 5 % R: 73 - 81 %	(Casajuana & Lacorte, 2004)
16 PAHs	Productos lácteos	DI-SPME	GC-MS	LOD: 30-1560 ng/L RSD: 4.9-19.6% R: 88-112 %	(Aguinaga et al., 2007)
Diazinón, metidatión, paratiión etil y paratiión-metil	Leche	LLE, SPE	GC-NPD	LOD: 1 000-5 000 ng/kg R:60-167%	(Gazzotti et al., 2009)
16 PAHs	Leche	LLE + SPE	GC-MS	R: 80-120 %	(Chung et al., 2010)
16 PAHs	Leche	Saponificación + LLE	GC-FID	LOD: 50-450 ng/kg RSD <7.8% R: 79-99%	(Iwegbue & Bassey, 2013)
16 PAHs	Productos lácteos	Soxhlet + GPC	GC-MS/MS	-	(Luzardo et al., 2013)
BPA	Productos lácteos	SPE, derivatización	GC-MS/MS	LOD: 90-210 ng/kg	(Bemrah et al., 2014)
Diazinón, metidatión, malatiión, clorpirifós y bromofos-metil	Queso	QuEChERS, DSPE	GC-MS/MS	LOD: 5 000-50 000 ng/kg R: 79-130%	(Al-Julaifi et al., 2015)
8 PAHs	Productos lácteos	Saponificación + LLE + SPE	GC-MS	LOD: 40-200 ng/kg RSD: 6.8-13.3 % R: 87-103 %	(Lee et al., 2015)
Parabenos, triclosán, BPA, nonilfenol y octilfenol	Leche humana	SPE, derivatización	GC-MS	LOD: 1-9 ng /L RSD: 4.4.-7.0% R: 86-104%	(Azzouz et al., 2016)
6 PAHs	Leche	SPME	GC-MS	LOD: 100 - 800 ng/kg R: 75-108 %	(Lin et al., 2016)
Diclorvos y diazinón	Leche	SPE/DLLME	GC-MS	LOD: 0.5-1 ng /kg RSD: 0.1-11.8% R: 66-102%	(Shamsipur et al., 2016)
Fetiión y paratiión metil	Productos lácteos	QuEChERS	GC-MS	LOD: 260-2 990 ng/kg RSD: 0.9-17.9% R: 72-120%	(Manav et al., 2019)
Bisfenoles	Yogur	QuEChERS	GC-MS	-	(Gonzalez et al.,2020)
16 PAHs	Queso ahumado	Soxhlet + SPE	GC-MS	LOQ: 900-20 000 ng/kg	(Pluta-Kubica et al., 2020)
16 PAHs	Leche	LLE + SPE	GC-MS	LOD: 40-75 ng/kg RSD: 3.2-10.1% R: 86-100%	(Shariatifar et al., 2020)
16 PAHs	Leche	QuEChERS	GC-MS/MS	LOD: 80-150 ng/kg RSD < 6% R: 63-105%	(Sun et al., 2020)

4-Clorofenol, 4- <i>tert</i> - Butilfenol y 4- <i>tert</i> - Octilfenol	Leche	EA-SPME	GC-FID	LOD: 1-30 ng/L RSD: 3.8-12.4 % R: 89-119%	(Zhang et al.,2021)
---	-------	---------	--------	---	---------------------

BPA: bisfenol A, BPB: bisfenol B, BPF: bisfenol F, BPZ: bisfenol Z, GC: cromatografía de gases, FID: detector de ionización de llama, QuEChERS: método QuEChERS (rápido, fácil, económico, eficaz, resistente y seguro), LLE: extracción líquido-líquido, LOD: límite de detección, LOQ: límite de cuantificación, MSPD: extracción en fase sólida dispersiva, MS: espectrometría de masas, MS/MS: espectrometría de masa en tandem, NPD: detector de nitrógeno y fósforo, PAHs: hidrocarburos policíclicos aromáticos, R: recuperación, RSD: desviación estándar relativa, SPE: extracción en fase sólida, SPME: microextracción en fase sólida, UA-DLLME: microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonido.

1.3.2.1.5 Espectrometría de masas

Como se ha comentado en el apartado anterior, la técnica de detección más utilizada por los investigadores es la espectrometría de masas (MS). La espectrometría de masas es uno de los sistemas de detección más importantes en cromatografía, su función principal es obtener iones a partir de moléculas en estado gaseoso, dichos iones son separados en función de su masa/carga (m/z). La espectrometría de masas nos ofrece información estructural, ayudando a identificar los compuestos para su cuantificación. Un espectrómetro de masas se compone principalmente de tres bloques (Lundanes et al., 2014).

- *Fuente de ionización*: zona donde se introduce la muestra, se evapora y las moléculas se ionizan y se aceleran.
- *Analizador de masas*: zona donde se separa los iones de distintas masas de modo que los iones de diferentes m/z llegan al detector.
- *Detector de iones*: se genera una corriente eléctrica que se amplifica en un multiplicador de electrones, se produce una señal.

La introducción de la muestra se puede realizar de modo directo mediante desorción por láser, que actúa como fuente de ionización, o acoplado a cromatografía de gases o líquidos, en este caso los analitos son previamente fraccionados y arrastrados por un eluyente. El acoplamiento a un cromatógrafo es el más utilizado en la actualidad. Una vez introducida la muestra se ioniza en la fuente de ionización (Skoog, et al., 2007). Existen cinco modos de ionizar la muestra:

- *Impacto electrónico (EI)*: electrones bombardean las moléculas de los analitos.
- *Ionización química*: un reactivo ionizante interacciona con los analitos.
- *Electrospray a presión atmosférica (API-ES)*: creación de un aerosol y evaporización por corriente de gas secante.
- *Ionización química a presión atmosférica (APCI)*: creación de un aerosol similar a API-ES y evaporación en una cámara a 400°C.
- *Desorción por láser*: la muestra sólida bombardeada por un láser.

Una vez ionizada la muestra se producen un número elevado de iones que se deben separar adecuadamente para identificar a los analitos. Este proceso se lleva a cabo en el analizador de iones. Actualmente, los analizadores de iones más utilizados son (Sogorb & Vilanova, 2004):

- *Sector magnético*: los iones se mueven circularmente en un campo magnético
- *Doble sector*: los iones se mueven circularmente primero en un campo magnético y luego en un campo eléctrico
- *Tiempo de vuelo (ToF)*: se calcula las masas por diferencia de tiempo de llegada al detector
- *Cuadrupolo (Q)*: los iones se mueven dentro de cuatro barras metálicas paralelas orientadas en un campo magnético.

Una vez analizados los iones pasan a un detector donde se transforma la energía de los iones en corriente eléctrica. Actualmente, los detectores más utilizados son los fotomultiplicadores de electrones y la copa de Faraday (Sogorb & Vilanova, 2004).

1.3.2.1.6 Cromatografía de gases-espectrometría de masas

Como se puede observar en la Tabla 17, la técnica más utilizada para la determinación de EDCs en productos lácteos es cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-MS). Con esta combinación se puede conseguir que los analitos de una mezcla sean separados y analizados de una manera individual.

El mayor problema de conexión entre ambos instrumentos se centra en las diferentes condiciones de flujo. El CG trabaja a presiones superiores a la atmosférica, mientras que el MS requiere presiones muchos menores. Por lo tanto, la interfase del acoplamiento debe cumplir la función de reducir drásticamente la presión. Además, la interfase debe de estar termostaticada por una manta calefactora necesaria para que los analitos recién salidos del CG continúen en estado gaseoso (requisito para ser ionizado) (Sogorb & Vilanova, 2004).

El acoplamiento entre CG y MS ofrece muchas ventajas, por ejemplo: la capacidad de trabajar con pequeñas cantidades de muestra que se inyecta en el CG para separar los analitos. Además, con la combinación de CG-MS se consigue la identificación de los analitos teniendo en cuenta relación m/z de los diferentes iones que se han producido en el MS.

La técnica de MS puede operar en dos modos: en modo barrido (full-scan) donde se detectan todas las señales en un rango de masa/carga determinado; y en modo de selección de iones (SIM) permite filtrar las relaciones de m/z de los iones que nos interesa identificar y cuantificar, monitorizando algunas de ellas. Gracias a esta operación, la sensibilidad aumenta notablemente y disminuye de una manera significativa el ruido de fondo (Skoog et al., 2018).

Otras de las ventajas que presenta la combinación CG-MS es que permite la identificación de los analitos sin la necesidad de comparación de resultados con patrones analíticos. Para ello se recurre al uso de librerías de los espectros de los diferentes compuestos y que se comparan con los espectros obtenidos del análisis CG-MS.

Gracias a esto, la CG-MS es una de las técnicas más utilizadas para la determinación y cuantificación de EDCs en muestras de leche y productos lácteos. Como se puede observar en la Tabla 18, autores como Manav et al. (2019) usaron la técnica de CG-MS para la

determinación de dichos analitos y consiguieron límites de detección (LOD) entre 0.26-2.99 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en la determinación de plaguicidas en leche. También Shamsipur et al. (2016) obtuvieron LOD de 0.0005-0.001 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para plaguicidas presentes en leche. Por otro lado, Shariatifar et al., (2020) consiguieron con la combinación CG-MS unos LOD entre 0.04 y 0.075 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en un método desarrollado para la determinación de 16 hidrocarburos policíclicos aromáticos en muestras de leche.

1.3.2.1.7 Cromatografía de gases-espectrometría de masas en tándem

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS), es una técnica que facilita la obtención de un espectro de masas de iones preseleccionados y fragmentados. En la Figura 17, se ilustra la idea básica de espectrómetro de masas en tándem. En primer lugar, la fuente de ionización produce iones y algunos fragmentos que entran al primer analizador de masas, el cual selecciona un ion en particular, denominado ion precursor, que es enviado a la celda de interacción, donde mediante descomposición, reacción o interacción se genera fragmentos, denominado iones productos. El analizador de tiempo de vuelo (ToF) determina la masa en una región a alto vacío mediante una medida de tiempo desde la aceleración de los iones en la fuente (source) hasta que impacta con el detector.

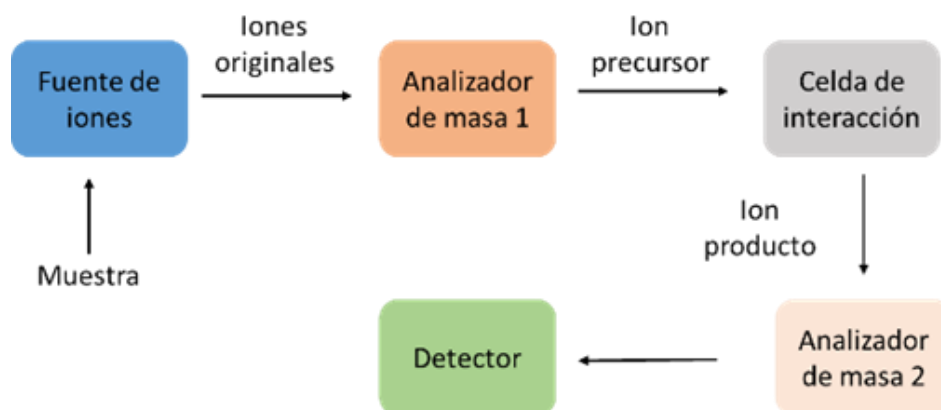


Figura 17. Diagrama de bloque de un espectrómetro de masas en tándem (Skoog et al., 2007).

En el analizador ToF los iones son acelerados aplicándoles una misma diferencia de potencial, al ser la misma diferencia de potencial para todos los iones, la velocidad al detector

va a depender de su relación m/z . Durante el proceso de aceleración o “tiempo de vuelo” a través del tubo, se da un proceso de descomposición metastable denominado PSD (“Post Source Decay”), proporcionando una información estructural de la molécula, siendo necesario la separación de los fragmentos. El principio básico del funcionamiento de un ToF es “Cuando mayor es el ion, menor es su velocidad y por lo tanto mayor es el tiempo necesario para atravesar la zona de deriva libre de campo” (Sogorb & Vilanova, 2004). En la Figura 18, se representa un esquema de un TOF. Este analizador presenta una desventaja, es la poca distancia que hay entre la fuente de ionización y el detector, por lo que si se desea aumentar la resolución se tiene que hacer uso de reflectrones.

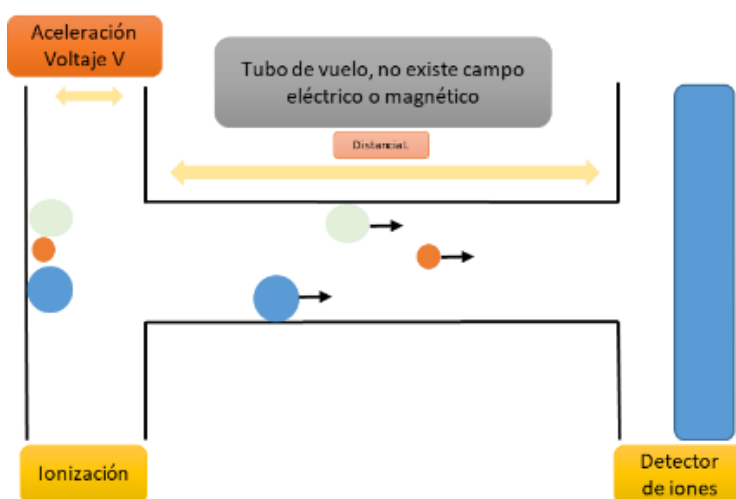


Figura 18. Esquema de un analizador de tiempo de vuelo.

Como se puede observar en la Tabla 18, diversos investigadores han utilizado la combinación CG-MS/MS para la determinación de los analitos objeto de estudio en esta Memoria. Por ejemplo, Luzardo et al. (2013) determinaron PAHs en alimentos por CG-MS/MS y en este trabajo se proporcionan datos sobre la ingesta estimada por población. Sun et al., 2020 cuantificaron los 16 PAHs prioritarios en leche con límites de detección de 80-150 ng/kg. Por otro lado, Bemrah et al. (2014) cuantificaron BPA en productos lácteos con límites de detección de 90-120 ng/kg. Finalmente, Al-Julaifi et al. (2015) han propuesto un método

para la determinación de un número elevado de plaguicidas organofosforados en muestras de queso con límites de detección de 5 000-50 000 ng/kg.

1.3.2.2 Cromatografía líquida en columna

La cromatografía líquida en columna es una de las técnicas analíticas de separación más ampliamente utilizada debido a su sensibilidad, su idoneidad para automatizarla y su alta capacidad para separar especies no volátiles o termolábiles (Skoog et al., 2018). En la Figura 19, se muestra los componentes básicos de cromatógrafo de líquidos. Un equipo de HPLC se compone de una bomba impulsora de disolvente; un sistema de inyección de muestra; la columna y un sistema de registro (ordenador).

En la técnica de HPLC se usa una fase móvil líquida. La interacción fase móvil-soluto juega un papel muy importante para la separación cromatográfica, siendo posible el cambio de composición de la fase móvil en el proceso cromatográfico. Por otro lado la fase estacionaria se encuentra dentro de la columna. La fase estacionaria puede ser diferente según el tipo de cromatografía líquida en columna, así nos podemos encontrar varios tipos: cromatografía de partición (fase estacionaria líquida soportada sobre un sólido soporte), cromatografía de adsorción (fase estacionaria sólida con propiedades de adsorción), cromatografía de cambio iónico (fase estacionaria sólida con propiedades de cambiadora de iones), cromatografía de exclusión (fase estacionaria sólida con porosidad controlada) y cromatografía de afinidad (fase estacionaria sólida con propiedades de retención bioespecífica) (Skoog et al., 2018). De estos tipos de cromatografía, la que más se utiliza en la determinación de EDCs en alimentos es la cromatografía de partición. Este tipo de HPLC puede ser de dos tipos: en fase normal (fase estacionaria polar-fase móvil apolar) y en fase reversa (fase estacionaria apolar-fase móvil polar). De ellas la más usada es la última, empleando como fase estacionaria un líquido de un hidrocarburo de 18 carbonos (RP-C18) enlazado químicamente al soporte. En este caso la fase móvil usada es polar (metanol, propanol o acetonitrilo mezclados con agua).

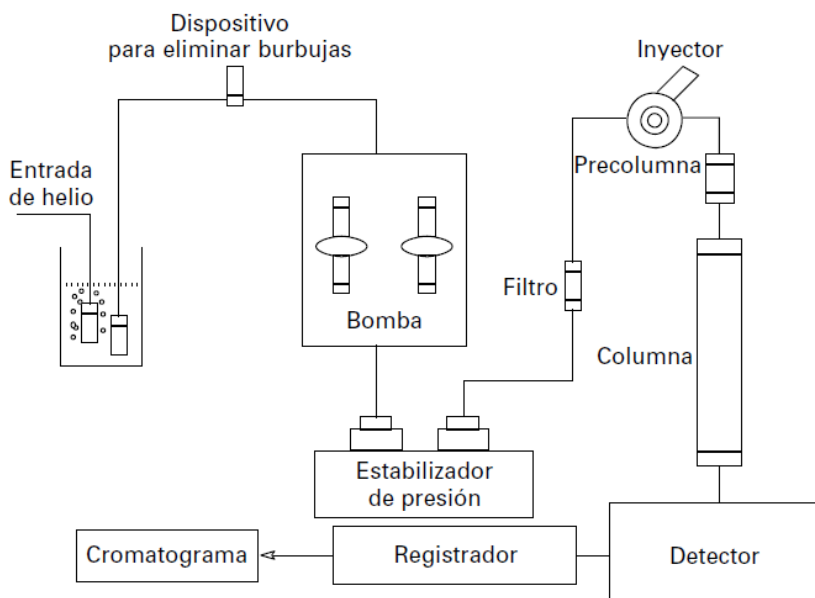


Figura 19. Componentes básicos de un cromatógrafo líquidos (Sogorb & Vilanova, 2004).

1.3.2.2.1 Detectores

Los principales sistemas de detección en HPLC se incluyen en la Tabla 19. Las características que deben de cumplir los detectores son: alta sensibilidad (10^{-12} - 10^{-11} g/ml) con bajo ruido de fondo, amplio rango lineal de concentración (5-6 órdenes de magnitud), respuesta universal a todos los solutos, pequeño volumen interno de célula de flujo (baja dilución), insensible a cambios ambientales, respuesta rápida, no destructivo y fácil de manejo. La elección del detector depende de los analitos a determinar (Valcárcel & Cárdenas, 2000). Actualmente, el detector más utilizado por los investigadores es el de espectrometría de masas. En el Apartado anterior 1.3.2.2.2 se describirán los aspectos más importantes de la combinación de la cromatografía líquida en columna con la técnica de espectrometría de masas.

Tabla 19. Detectores más utilizados en HPLC (Valcárcel & Cárdenas, 2000).

Detectores	Especificidad	Limitaciones
Absorción molecular UV-Visible	Selectivo	Disolventes que absorben en zona de medida
Fluorescencia molecular	Selectivo	Rango limitado Impureza disolvente
Electroquímico	Selectivo	Sensible al caudal Adsorción electrodos
Índice de refracción	Universal	Baja sensibilidad Control estricto de temperatura
Conductividad	Selectivo	Sensible temperatura Poco sensible
Espectrometría de masas	Selectivo	Alto costo Destructiva

En la Tabla 20, se recogen algunos de los métodos más recientes para la determinación de EDCs en productos lácteos y que están basados en el uso de la técnica de HPLC. En esta Tabla se incluyen las técnicas de preparación de muestra, el detector utilizado, así como las principales características analíticas de los métodos seleccionados.

Tabla 20. Métodos para la determinación de EDCs en productos lácteos basados en el uso de la técnica de HPLC.

Analitos	Muestras	Tratamiento de muestra	Técnicas	Características analíticas	Referencias
BPA, nonilfenol y octilfenol	Leche	MSPD	HPLC-MS/MS	LOD: 50 – 100 ng/kg R: 82 – 102 %	(Shao et al., 2007)
Parabenos, triclosan, BPA y 2-fenilfenol	Leche humana	SPE	HPLC-MS/MS	LOD: 100–400 ng/L RSD: 3.5–16.3% R: 84–119%	(Ye et al., 2008)
Diazinón, clorpirifos, dimetoate, fetión sulfóxide, malatión y paratión metil	Queso	QuEChERS	HPLC-MS/MS	LOD: 2 000 ng/kg RSD: <20% R: 70–120%	(Chung & Chan, 2010)
8 PAHs	Leche	Saponificación + LLE + SPE	HPLC-FLD HPLC-MS	LOQ: 12 – 201 ng/kg RSD: 0.8–10.4% R: 89–94%	(Naccari et al., 2011)
6 PAHs	Leche desnatada	MSPE	HPLC-FLD	LOD: 0.2–0.6 ng/L RSD: 1–9% R: 42–62%	(Zhang et al., 2012)
BPA, BPB y BPF	Leche	SPE	HPLC-FLD	LOD: 300 – 300 ng/L RSD: 2.03 – 2.68% R: 93 – 106%	(Grumetto et al., 2013)
BPA y BPF	Productos lácteos	VASUSME	HPLC-DAD	LOD: 210 ng/L RSD: 4.21% R: 102 %	(Li et al., 2013)
BPA, BPB, BPF, BPS y BPZ	Productos lácteos	SPE	HPLC-MS/MS	LOQ: 10 – 50 ng/kg RSD: < 15 % R: 66 – 126 %	(Liao & Kannan, 2013)
BPA, nonilfenol y octilfenol	Productos lácteos	UA-DLLME	HPLC-FLD	LOD: 10 – 40 ng/kg RSD: 2.76 – 8.79 % R: 82.7 – 112.5 %	(Lv et al., 2014)
13 PAHs	Yogur	Saponificación + LLE	HPLC-FLD	RSD: 2–20% R: 33–130 %	(Battisti et al., 2015)
9 PAHs	Queso	Saponificación + LLE + SPE	HPLC-FLD	LOD: 40–90 ng/kg RSD: 6.5–12.5% R: 73–93%	(Gul et al., 2015)
BPA, nonilfenol, 4- <i>t</i> -octilfenol	Leche	SPME	HPLC-DAD	LOD: 91 – 230 ng/L RSD: < 10 % R: 76 – 118 %	(Mei et al. (2015)
BPA	Leche	DMSPE	HPLC-UV	LOD: 3 050 ng/L RSD: 9.1 – 16 % R: 86 – 99 %	(Reyes-Gallardo et al. 2016)
14 PAHs	Leche	Saponificación + LLE + SPE	HPLC-FLD	LOD: 5–110 ng/kg RSD < 9 % R: 65–89%	(Santonicola et al., 2017)
10 PAHs	Leche	IT-SPME	HPLC-FLD	LOD: 0.10–2.36 ng/L RSD < 11% R: 76–119%	(Pang et al., 2018)
3 PAHs	Leche	IL-HF-LPME	HPLC-DAD	LOD: 140 – 710 ng/L RSD 1.2–3.3% R: 94–103%	(Wang et al., 2018)

BPA y BPB	Leche	QuEChERS	HPLC-FLD	LOD: 1 000 – 3 100 ng/L RSD: 2.6 – 13.0% R: 76 – 94 %	(Xiong et al., 2018)
BPA, BPF, BPS y parabenos	Leche	QuEChERS	HPLC-MS	LOQ: 100 –250 ng/L RSD: 5–16 % R: 83–115 %	(Dualde et al., 2019)
4 PAHs	Yogur	Saponificación + LLE	HPLC-FLD	LOD: 50–70 ng/kg RSD: 5.9–16.9% R: 84–106%	(Kacmaz, 2019)
BPA	Leche	MSPD	HPLC-QqQ	LOQ: 0.91 – 4.4 ng/kg RSD: < 14%	(Herrero et al., 2021)
BPF	Leche	SPE	HPLC/FLD	LOD: 30 ng/L RSD: 1.01 – 14.83 % R: 97.60 – 107.1 %	(Santonicola et al., (2021)
BPA, BPB, BPF y BPS	Leche	QuEChERS	HPLC/FLD	LOD: 56 720-77 590 ng/L RSD<9.4% R: 57-88 %	(Tuzimski & Szubartowski, 2021)
BPA, BPF, BPAF y 4-clorofenol	Leche	UA-DLLME	HPLC-UV	LOD: 250 – 500 ng/L RSD: 0.67 – 13.67% R: 82.77 – 118.92 %	(Qiao et al., 2022)

BPA: bisfenol A; BPB: bisfenol B; BPF: bisfenol F; BPZ: bisfenol Z; HPLC-DAD: cromatografía líquida en columna-detector de diodos en fila; HPLC-FLD: cromatografía líquida en columna-detección de fluorescencia; HPLC-MS/MS: cromatografía líquida en columna-espectrometría de masas en tándem; HPLC-QqQ: cromatografía líquida en columna-espectrometría de masas de triple cuadrupolo; HPLC-UV: cromatografía líquida en columna-con detección ultravioleta; IT-SPME: microextracción en fase sólida en tubo; IL-HF-LPME: microextracción en fase líquida de líquido iónico; LLE: extracción líquido-líquido; LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación; MSPD: extracción en fase sólida dispersiva; PAHs: hidrocarburos policíclicos aromáticos; QuEChERS: método QuEChERS (rápido, fácil, económico, eficaz, resistente y seguro; R: recuperación; RSD: desviación estándar relativa; SPE: extracción en fase sólida; SPME: microextracción en fase sólida; UA-DLLME: microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonido; VASUSME: microextracción con solvente supramolecular asistida por vortex.

1.3.2.2.2 Acoplamiento de la técnica de cromatografía líquida en columna con la espectrometría de masas

1.3.2.2.2.1 Cromatografía líquida-espectrometría de masas

El acoplamiento de la técnica de cromatografía de líquida en columna con la espectrometría de masas (HPLC-MS) es una combinación muy usada para la determinación de contaminantes en alimentos. Sin embargo, el acoplamiento del MS con HPLC es más complejo que el de CG-MS, ya que hay que volatilizar la corriente líquida (fase móvil) de una manera eficaz y rápida antes de que se introduzcan los analitos procedentes del cromatógrafo en el espectrómetro de masas (Sogorb & Vilanova, 2004). Para ello se debe de utilizar una interfase adecuada. Las interfaces comúnmente usada para este fin son la ionización a presión atmosférica electrospray (API-ES), ionización química a presión atmosférica (APCI), ionización por plasma de acoplamiento inductivo (ICP), ionización por dessorción asistida por láser (MALDI) y fotoionización a presión atmosférica (APPI). De ellas, las más utilizadas para la determinación de contaminantes orgánicos son la ionización a presión atmosférica electrospray, la ionización química a presión atmosférica y la ionización por dessorción asistida por láser. A continuación, se describirán estos tres tipos de interfases.

Ionización a presión atmosférica electrospray

En la ionización por API-ES se da un proceso de ionización seguido de un proceso de evaporación. El proceso consta principalmente de tres etapas (Skoog et al., 2018):

- *Nebulización y carga*: la muestra pasa a través de un capilar de acero, este capilar está situado dentro de una cámara de ionización, donde se aplica un campo eléctrico, por lo que la muestra es dispersada en un aerosol de gotas fuertemente cargadas.
- *Desolvatación*: una corriente de gas caliente se encarga de evaporar las pequeñas gotas del aerosol.
- *Evaporación*: las gotas reducen el tamaño debido a las fuerzas de repulsión electrostáticas que son superiores a las fuerzas de cohesión. Finalmente, este

proceso se repite hasta que el analito queda en fase gaseosa y entra al analizador.

Ionización química a presión atmosférica

La ionización por APCI es muy similar a API-ES, ya que la interfase APCI también se trata de un proceso de evaporación seguido de ionización. La diferencia radica en la cámara de ionización que se calienta entre un rango de temperatura entre (250-400°C), donde el calor evapora las gotas generando disolvente y analitos en fase gaseosa. El disolvente es ionizado por una descarga eléctrica, transfiriendo cargas a las moléculas de analitos, estos analitos son transportados hacia el detector (Sogorb & Vilanova, 2004).

Ionización por desorción asistida por láser

La ionización por MALDI se fundamenta en el bombardeo de moléculas mediante un láser para producir los iones. Esta ionización se utiliza para analitos de alto peso molecular. El mecanismo de ionización se puede resumir en tres etapas (Martín Gómez & Ballesteros González, 2010):

- 1. Mezcla de la muestra con una matriz sólida.* Las moléculas de analito se distribuyen en una matriz sólida, para aislar las moléculas. Es imprescindible que la mezcla entre la matriz y la muestra sean homogéneas.
- 2. Excitación de la matriz.* Parte de la energía del láser es adsorbida por la matriz, por lo que se produce la evaporación de ésta. La evaporación forma unos agregados de las moléculas de analito rodeadas de moléculas de la matriz.
- 3. Ionización del analito.* Las moléculas de analito evaporadas reaccionan con las de matriz captando cationes, dando lugar a iones $[A+X]^+$, donde A es el analito, y X puede ser H, Li, Na, K, etc. Los iones negativos se forman por reacciones que implican la desprotonación del analito y protonación de la matriz, con formación de los iones $[A-H]^-$, o bien la interacción del analito con electrones de la matriz excitados por el láser. Esta última modalidad de excitación da lugar a la formación de radicales $[A]^\cdot$ de analito.

Como se puede observar en la Tabla 20, autores como Dualde et al. (2019) emplean esta técnica para la cuantificación de bisfenoles y parabenos en leche, llegando a unos límites de cuantificación de 100-250 ng/L, con una precisión (expresada como desviación estándar relativa, RSD) de 5-16%. Otros autores como Naccari et al. (2011) cuantificaron 8 PAHs en leche por HPLC-FLD; sin embargo, utilizaron la técnica HPLC/MS para la confirmación de los compuestos en muestras de leche, obteniendo unos límites de cuantificación de 12-201 ng/kg.

1.3.2.2.2.2 Cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem

El fundamento, las principales características y los analizadores empleados para la espectrometría de masas en tándem, se describen en el Apartado 1.3.2.1.7 de la presente Memoria de Tesis Doctoral.

La combinación de cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS) es una técnica muy empleada para la determinación y cuantificación de EDCs en alimentos. Como se puede observar en la Tabla 20, autores como Shao et al. (2007) emplea esta técnica para la determinación de BPA, nonilfenol y octilfenol en muestras de leche, cosiguiendo unos límites de detección de 50-100 ng/kg. Por otro lado, Ye et al. (2008) determinaron parabenos, triclosan, 2-fenilfenol y BPA en leche materna con unos límites de detección de 100-400 ng/L y una RSD entre 3.5 y 16%. Chung & Chan (2010) analizaron plaguicidas organofosforados en muestras de queso con límites de detección de 2 000 ng/kg. Liao & Kannan (2013) cuantificaron bisfenoles en productos lácteos con unos buenos límites de detección de 10-50 ng/kg. Finalmente, Herrero et al. (2021) han desarrollado un método para la determinación de BPA en leche mediante HPLC en combinación de un triple cuadrupolo con unos límites de detección bajos (0.91-4.4 ng/kg).

1.4 Referencias

- Acir, I. H., & Guenther, K. (2018). Endocrine-disrupting metabolites of alkylphenol ethoxylates – A critical review of analytical methods, environmental occurrences, toxicity, and regulation. *Science of the Total Environment*, 635, 1530–1546. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.079>
- AECOSAN. (2023). Agencia Española de Seguridad y Nutrición. Seguridad Alimentaria. Disponible: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/detalle/contaminantes.htm
- Aguinaga, N., Campillo, N., Viñas, P., & Hernández-Córdoba, M. (2007). Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in milk and related products using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 596, 285–290. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.06.005>
- Al-Jaal, B., Salama, S., Al-Qasmi, N., & Jaganjac, M. (2019). Mycotoxin contamination of food and feed in the Gulf Cooperation Council countries and its detection. *Toxicon*, 171, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.10.003>
- Al-Julaifi, M. Z., Bazalou, M. S., Ibrahim, A. A. M., & Ghamry, S. T. (2015). Quantitative determination of organophosphorus compounds in hard cheese using gas chromatography coupled with ion trap-tandem spectrometry. *Egyptian Journal of Chemistry and Environmental Health*, 1, 113–133. <https://doi.org/10.21608/EJCEH.2015.232331>
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F., J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86, 412–431. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>
- Argemi, F., Cianni, N., & Porta, A. (2005). Disrupción endocrina: Perspectivas ambientales y salud pública. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 39, 291–300.
- Arthur, C. L., Pawliszyn, J. (1990). Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, 62, 2145–2148.
- Azzouz, A., Rascón, A. J., & Ballesteros, E. (2016). Simultaneous determination of parabens, alkylphenols, phenylphenols, bisphenol A and triclosan in human urine, blood and breast milk by continuous solid-phase extraction and gas chromatography-mass

- spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 119, 16–26. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.11.024>
- Badanthadka, M., & Mehendale, H.M. (2014). Chlorophenols. Reference Module in Biomedical Sciences, Editor(s): Philip Wexler, *Encyclopedia of Toxicology*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, (pp. 896–899). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00281-5>
- Balaguer, P., Delfosse, V., & Bourguet, W. (2019). Mechanisms of endocrine disruption through nuclear receptors and related pathways. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 7, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.04.008>
- Baró, L., Jimenéz, J., Martínez-férez, A., & Bounza, J. (2001). Péptidos y proteínas de la leche con propiedades funcionales bioactive milk peptides and proteins. *Ars Pharmaceutica*, 42, 3–4.
- Battisti, C., Girelli, A. M., & Tarola, A. M. (2015). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in yogurt samples. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 8, 50–55. <https://doi.org/10.1080/19393210.2014.968880>
- Bemrah, N., Jean, J., Rivière, G., Sanaa, M., Leconte, S., Bachelot, M., Deceuninck, Y., Bizec, B. Le, Dauchy, X., Roudot, A. C., Camel, V., Grob, K., Feidt, C., Picard-Hagen, N., Badot, P. M., Foures, F., & Leblanc, J. C. (2014). Assessment of dietary exposure to bisphenol A in the French population with a special focus on risk characterisation for pregnant French women. *Food and Chemical Toxicology*, 72, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.07.005>
- Błędzka, D., Gromadzińska, J., & Wasowicz, W. (2014). Parabens. From environmental studies to human health. *Environment International*, 67, 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.02.007>
- Bolden, A. L., Rochester, J. R., Schultz, K., & Kwiatkowski, C. F. (2017). Polycyclic aromatic hydrocarbons and female reproductive health: A scoping review. *Reproductive Toxicology*, 73, 61–74. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.07.012>
- Caballero-Casero, N., Lunar, L., & Rubio, S. (2016). Analytical methods for the determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids. A review. *Analytica Chimica Acta*, 908, 22–53. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.12.034>
- Casajuana, N., & Lacorte, S. (2004). New methodology for the determination of phthalate esters, bisphenol A, bisphenol A diglycidyl ether, and nonylphenol in commercial

- whole milk samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3702–3707. <https://doi.org/10.1021/jf040027s>
- Cela, L. R., Lorenzo, R. A., & Casais, M. A. (2003). *Técnicas de Separación en Química Analítica*. Madrid, Ed. Síntesis.
- Chen, J., Ahn, K. C., Gee, N. A., Gee, S. J., Hammock, B. D., & Lasley, B. L. (2007). Antiandrogenic properties of parabens and other phenolic containing small molecules in personal care products. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 221, 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2007.03.015>
- Chung, S. W. C., & Chan, B. T. P. (2010). Validation and use of a fast sample preparation method and liquid chromatography-tandem mass spectrometry in analysis of ultra-trace levels of 98 organophosphorus pesticide and carbamate residues in a total diet study involving diversified food types. *Journal of Chromatography A*, 1217, 4815–4824. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.05.043>
- Chung, T. L., Liao, C. J., & Chen, M. F. (2010). Comparison of liquid-liquid extraction and solid-phase extraction for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the milk of Taiwan. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 41, 178–183. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2009.07.003>
- Codex Alimentarius. (2023). Normas internacionales de los alimentos. Disponible: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/es/>
- CPRAC. (2023). Regional Activity Centre for Sustainable Consumption and Production. Stockholm Convention. Disponible: <http://www.cprac.org/es/quimicos/convencion-de-estocolmo/convencion>
- Dar, M. A., Kaushik, G., & Villareal Chiu, J. F. (2019). Pollution status and biodegradation of organophosphate pesticides in the environment. In *Abatement of Environmental Pollutants: Trends and Strategies* Editor(s): Pardeep Singh, Ajay Kumar, Anwesha Borthakur, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, (pp. 25-66). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818095-2.00002-3>
- Darbre, P. D. (2019). The history of endocrine-disrupting chemicals. *Current Opinion in Endocrine and Metabolic Research*, 7, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.coemr.2019.06.007>
- Dardiotis, E., Skouras, P., Varvarelis, O. P., Aloizou, A. M., Hernández, A. F., Liampas, I., & Hadjigeorgiou, G. M. (2023). Pesticides and tremor: An overview of association, mechanisms and confounders. *Environmental research*, 229, 115442. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.115442>

- Deng, Z. H., Li, N., Jiang, H. L., Lin, J. M., & Zhao, R. S. (2019). Pretreatment techniques and analytical methods for phenolic endocrine disrupting chemicals in food and environmental samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 119, 115592. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.07.003>
- Djordjevic, A. B., Antonijevic, E., Curcic, M., Milovanovic, V., & Antonijevic, B. (2020). Endocrine-disrupting mechanisms of polychlorinated biphenyls. *Current Opinion in Toxicology*, 19, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2019.10.006>
- Dong, C. Di, Chen, C. W., & Chen, C. F. (2015). Seasonal and spatial distribution of 4-nonylphenol and 4-tert-octylphenol in the sediment of Kaohsiung Harbor, Taiwan. *Chemosphere*, 134, 588–597. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.082>
- Drwal, E., Rak, A., & Gregoraszczyk, E. L. (2019). Review: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)—Action on placental function and health risks in future life of newborns. *Toxicology*, 411, 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.10.003>
- Dualde, P., Pardo, O., F. Fernández, S., Pastor, A., & Yusà, V. (2019). Determination of four parabens and bisphenols A, F and S in human breast milk using QuEChERS and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 1114-1115, 154-166. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2019.03.004>
- Duedahl-Olesen, L. (2013). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in foods. Woodhead Publishing Limited. *Persistent Organic Pollutants and Toxic Metals in Foods*. Editor(s): Martin Rose, Alwyn Fernandes, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, (pp. 308-333). <https://doi.org/10.1533/9780857098917.2.308>
- EFSA. (2004). EFSA Advises on the Safety of Paraben Usage in Food. European Union. 2004. <https://www.efsa.europa.eu/en/news/efsa-advises-safety-paraben-usage-food>.
- EFSA. (2006). Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, 824 Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a Request from the Commission 825 Related to 2,2-Bis(4-Hydroxyphenyl)Propane (Bisphenol A). *EFSA J.* 2006, 428, 1–75. Disponible: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2007.428>
- EFSA. (2015). Scientific Opinion on the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. *EFSA Journal*, 3, 3978. Disponible: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2015.3978>
- EFSA. (2023). Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Web oficial de la Unión Europea. Disponible: <https://www.efsa.europa.eu/es>

- Elmore, J. S. (2015). Extraction techniques for analysis of aroma compounds. In *Flavour Development, Analysis and Perception in Food and Beverages*. Elsevier Ltd. Amsterdam, Netherlands, (pp. 31-35). <https://doi.org/10.1016/b978-1-78242-103-0.00002-3>
- EMA. (2015). European Public MRL Assessment Report (EPMAR) Propyl 4-Hydroxybenzoate and Its Sodium Salt (All Food Producing Species). Disponible: https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/propyl-4-hydroxybenzoate-its-sodium-salt-all-food-producing-species-european-public-mrl-assessment_en.pdf
- European Water Framework, (2023). Water Framework Directive. Disponible: <https://water.europa.eu/freshwater/europe-freshwater/water-framework-directive>
- Eurostat. (2023). Unión Europea Eurostat. 346 000 tonnes of pesticides sold in 2020 in the EU. Disponible: <https://ec.europa.eu/eurostat>
- Fang, G., Lau, H. F., Law, W. S., & Li, S. F. Y. (2012). Systematic optimisation of coupled microwave-assisted extraction-solid phase extraction for the determination of pesticides in infant milk formula via LC-MS/MS. *Food Chemistry*, 134, 2473–2480. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.076>
- Fernández, E. M. (2017). Nuevos avances en metodologías analíticas basadas en técnicas miniaturizadas de extracción en fase sólida y en fase líquida. Universidad de Alicante.
- Fontanals, N., Marcé, R. M., & Borrull, F. (2019). Porous polymer sorbents. *Solid-Phase Extraction*, Editor(s): Colin F. Poole, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, (pp. 55–82). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816906-3.00003-0>
- Frederiksen, H., Aksglaede, L., Sorensen, K., Nielsen, O., Main, K. M., Skakkebaek, N. E., Juul, A., & Andersson, A. M. (2013). Bisphenol A and other phenols in urine from Danish children and adolescents analyzed by isotope diluted TurboFlow-LC-MS/MS. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 216, 710–720. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2013.01.007>
- García, C. A., Montiel, R. L. A., & Borderas, T. (2014). Grasa y proteína de la leche de vaca: componentes, síntesis y modificación. *Arch. Zootec.*, 63, 85–105.
- García-Mayor, R. V., Larrañaga Vidal, A., Docet Caamaño, M. F., & Lafuente Giménez, A. (2012). Endocrine disruptors and obesity: Obesogens. *Endocrinología y Nutrición*, 59, 261–267. <https://doi.org/10.1016/j.endoen.2012.05.001>
- Gazzotti, T., Sticca, P., Zironi, E., Lugoboni, B., Serraino, A., & Pagliuca, G. (2009). Determination of 15 organophosphorus pesticides in Italian raw milk. *Bulletin of*

- Environmental Contamination and Toxicology, 82, 251–254. <https://doi.org/10.1007/s00128-008-9609-0>
- Giulivo, M., Lopez de Alda, M., Capri, E., & Barceló, D. (2016). Human exposure to endocrine disrupting compounds: Their role in reproductive systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environmental Research*, 151, 251–264. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.07.011>
- González, N., Cunha, S. C., Ferreira, R., Fernandes, J. O., Marquès, M., Nadal, M., & Domingo, J. L. (2020). Concentrations of nine bisphenol analogues in food purchased from Catalonia (Spain): Comparison of canned and non-canned foodstuffs. *Food and Chemical Toxicology*, 136, 110992. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110992>
- Gramec Skledar, D., & Peterlin Masic, L. (2016). Bisphenol A and its analogs: Do their metabolites have endocrine activity? *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 47, 182–199. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.09.014>
- Grumetto, L., Gennari, O., Montesano, D., Ferracane, R., Ritieni, A., Albrizio, S., & Barbato, F. (2013). Determination of five bisphenols in commercial milk samples by liquid chromatography coupled to fluorescence detection. *Journal of Food Protection*, 76, 1590–1596. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-054>
- Gu, J., Yuan, T., Ni, N., Ma, Y., Shen, Z., Yu, X., Shi, R., Tian, Y., Zhou, W., & Zhang, J. (2019). Urinary concentration of personal care products and polycystic ovary syndrome: A case-control study. *Environmental Research*, 168, 48–53. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.09.014>
- Gul, O., Dervisoglu, M., Mortas, M., Aydemir, O., Ilhan, E., & Aksehir, K. (2015). Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons in Circassian cheese by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Food Composition and Analysis*, 37, 82–86. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2014.07.004>
- Guo, J., Wu, C., Zhang, J., Xiao, H., Lv, S., Lu, D., Qi, X., Feng, C., Liang, W., Chang, X., Zhang, Y., Xu, H., Cao, Y., Wang, G., & Zhou, Z. (2020). Early life triclosan exposure and neurodevelopment of children at 3 years in a prospective birth cohort. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 224, 113427. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.113427>
- Haman, C., Dauchy, X., Rosin, C., & Munoz, J. F. (2015). Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: A review. *Water Research*, 68, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.09.030>

- Hawliczek, A., Nota, B., Cenijn, P., Kamstra, J., Pieterse, B., Winter, R., Winkens, K., Hollert, H., Segner, H., & Legler, J. (2012). Developmental toxicity and endocrine disrupting potency of 4-azapyrene, benzo[b]fluorene and retene in the zebrafish *Danio rerio*. *Reproductive Toxicology*, 33, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.11.001>
- Health Canada. (2012). Update on the Food Directorate's Directorate's Risk Management Commitments for Bisphenol A as Part of Canada's Canada's Chemicals Management Plan. Disponible: <https://www.canada.ca/en/healthcanada/services/food-nutrition/food-safety/packaging-materials/bisphenol/update-food-directorate-risk-managementcommitments-bisphenol-part-canada-chemicals-management-plan-food-safety.html>
- Herrero, L., Quintanilla-López, J. E., Fernández, M. A., & Gómara, B. (2021). Plasticisers and preservatives in commercial milk products: A comprehensive study on packages used in the Spanish market. *Food Chemistry*, 338, 128031. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128031>
- Herrero-Latorre, C., Barciela-García, J., García-Martín, S., Peña-Crecente, R. M., & Otárola-Jiménez, J. (2015). Magnetic solid-phase extraction using carbon nanotubes as sorbents: A review. *Analytica Chimica Acta*, 892, 10–26. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.07.046>
- Huang, S., Chen, G., Ye, N., Kou, X., Zhu, F., Shen, J., & Ouyang, G. (2019). Solid-phase microextraction: An appealing alternative for the determination of endogenous substances - A review. *Analytica Chimica Acta*, 1077, 67–86. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.05.054>
- Industrias Lácteas Mensual (2023). Principales Resultados Edita: © Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. NIPO: 003201040 Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado: <https://cpage.mpr.gob.es/>
- Intelligence, M. (2023). Mordor Intelligence. Bisphenol-A (BPA) Market- Growth, Trends, COVID-19 Impact, and Forecasts (2023-2028). <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/bisphenol-a-bpa-market>
- INSHT. (2023). Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo. Plaguicidas: riesgos en las aplicaciones en interior de locales. Disponible: https://www.insst.es/documents/94886/327064/ntp_595.pdf/54d86a4f-5530-4085-8184-5f77cc41561e

- Iwegbue, C. M. A., & Bassey, F. I. (2013). Concentrations and health hazards of polycyclic aromatic hydrocarbons in selected commercial brands of milk. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 7, 177–184. <https://doi.org/10.1007/s11694-013-9153-4>
- Jackson, L. S., & Al-Taher, F. (2010). Processing Issues: Acrylamide, Furan and Trans Fatty Acids. In *Ensuring Global Food Safety (First Edit)*, Editor(s): Christine E. Boisrobert, Aleksandra Stjepanovic, Sangsuk Oh, Huub L.M. Lelieveld, Elsevier Inc., Amsterdam, Netherlands, (pp. 383-410). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374845-4.00023-0>
- Jain, A. V. (2006). Analysis of organophosphate and carbamate pesticides and anticholinesterase therapeutic agents. *Toxicology of Organophosphate & Carbamate Compounds*. Editor: Ramesh C. Gupta, Elsevier Inc., Amsterdam, Netherlands, (pp. 681–701). <https://doi.org/10.1016/B978-012088523-7/50048-X>
- Jalili, V., Barkhordari, A., & Ghiasvand, A. (2020). Solid-phase microextraction technique for sampling and preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons: A review. *Microchemical Journal*, 157, 104967. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104967>
- Jensen, C. F. S., Joensen, U. N., Nagras, Z. G., Ohl, D. A., & Sønksen, J. (2019). Endocrine disruptors and men's health. In *Effects of Lifestyle on Men's Health*. Editor(s): Faysal A. Yafi, Natalie R. Yafi, Elsevier Inc., Amsterdam, Netherlands, (pp. 403-412). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816665-9.00021-4>
- Kacmaz, S. (2019). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Flour, Bread, and Breakfast Cereals. In *Flour and Breads and their Fortification in Health and Disease Prevention*. Editor(s): Victor R. Preedy, Ronald Ross Watson, Elsevier Inc., Amsterdam, Netherlands, (pp. 13-20). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814639-2.00002-2>
- Kebede, H., Liu, X., Jin, J., & Xing, F. (2020). Current status of major mycotoxins contamination in food and feed in Africa. *Food Control*, 110, 106975. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106975>
- Kodavanti, P. R. S., & Loganathan, B. G. (2019). Polychlorinated Biphenyls, Polybrominated Biphenyls, and Brominated Flame Retardants. In *Biomarkers in Toxicology*. Editor(s): Ramesh C. Gupta, Elsevier Inc., Amsterdam, Netherlands, (pp. 501-518). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814655-2.00028-1>
- Lee, S. Y., Lee, J. Y., & Shin, H. S. (2015). Evaluation of chemical analysis method and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons content from seafood and dairy

- products. *Toxicological Research*, 31, 265–271. <https://doi.org/10.5487/TR.2015.31.3.265>
- Li, Y., Jiao, Y., Guo, Y., & Yang, Y. (2013). Determination of bisphenol-A, 2,4-dichlorophenol, bisphenol-AF and tetrabromobisphenol-A in liquid foods and their packaging materials by vortex-assisted supramolecular solvent microextraction/high-performance liquid chromatography. *Analytical Methods*, 5, 5037–5043. <https://doi.org/10.1039/c3ay40586a>
- Liao, C., & Kannan, K. (2013). Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 4655–4662. <https://doi.org/10.1021/jf400445n>
- Lin, W., Wei, S., Jiang, R., Zhu, F., & Ouyang, G. (2016). Calibration of the complex matrix effects on the sampling of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples using solid phase microextraction. *Analytica Chimica Acta*, 933, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.05.045>
- Llompart, M., Celeiro, M., & Dagnac, T. (2019). Microwave-assisted extraction of pharmaceuticals, personal care products and industrial contaminants in the environment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 116, 136–150. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.04.029>
- Lord, H., & Pawliszyn, J. (2000). Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of chromatography A*, 885, 153-193. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(00\)00535-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(00)00535-5)
- Lu, J., Zhang, C., Wu, J., Zhang, Y., & Lin, Y. (2020). Seasonal distribution, risks, and sources of endocrine disrupting chemicals in coastal waters: Will these emerging contaminants pose potential risks in marine environment at continental-scale? *Chemosphere*, 247, 125907. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.125907>
- Lundberg, J. O., Carlström, M., & Weitzberg, E. (2018). Metabolic effects of dietary nitrate in health and disease. *Cell Metabolism*, 28, 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.06.007>
- Lundanes E. Reubsaet L., & Greibrokk T. (2014). *Chromatography: Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods*. New York: Wiley VCH.
- Luzardo, O. P., Zumbado, M., & Boada, L. D. (2013). Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and organohalogenated contaminants in selected foodstuffs from Spanish

- market basket: Estimated intake by the population from Spain. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 11, 437–443.
- Lv, T., Zhao, X. E., Zhu, S., Qu, F., Song, C., You, J., & Suo, Y. (2014). Determination of bisphenol A, 4-octylphenol, and 4-nonylphenol in soft drinks and dairy products by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with derivatization and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Separation Science*, 37, 2757–2763. <https://doi.org/10.1002/jssc.201400612>
- Ma, Y., Liu, H., Wu, J., Yuan, L., Wang, Y., Du, X., Wang, R., Marwa, P. W., Petlulu, P., Chen, X., & Zhang, H. (2019). The adverse health effects of bisphenol A and related toxicity mechanisms. *Environmental Research*, 176, 108575. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108575>
- Manav, Ö. G., Dinç-Zor, Ş., & Alpdoğan, G. (2019). Optimization of a modified QuEChERS method by means of experimental design for multiresidue determination of pesticides in milk and dairy products by GC–MS. *Microchemical Journal*, 144, 124–129. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.08.056>
- Maqbool, F., Mostafalou, S., Bahadar, H., & Abdollahi, M. (2016). Review of endocrine disorders associated with environmental toxicants and possible involved mechanisms. *Life Sciences*, 145, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2015.10.022>
- Martín Gómez, M. C., & Ballesteros González, M. (2010). Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. *Monografías de La Real, España*, (pp.113-168). <http://analesranf.com/index.php/mono/article/view/1066>
- Mei, M., Yu, J., Huang, X., Li, H., Lin, L., & Yuan, D. (2015). Monitoring of selected estrogen mimics in complicated samples using polymeric ionic liquid-based multiple monolithic fiber solid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1385, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.01.072>
- Mencin, M., Abramovič, H., Vidrih, R., & Schreiner, M. (2020). Acrylamide levels in food products on the Slovenian market. *Food Control*, 114, 501-518. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107267>
- Méndez, J. P., Ramírez, C. A. G., Gutiérrez, A. D. R., & García, F. P. (2009). Contaminación y fitotoxicidad en plantas por metales pesados provenientes de suelos y agua. *Tropical and subtropical Agroecosystems*, 10, 29-44.

- Mojiri, A., Zhou, J. L., Ohashi, A., Ozaki, N., & Kindaichi, T. (2019). Comprehensive review of polycyclic aromatic hydrocarbons in water sources, their effects and treatments. *Science of the Total Environment*, 696, 133971. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133971>
- Moliner-Martínez, Y., Ballester-Caudet, A., Verdú-Andrés, J., Herráez-Hernández, R., Molins-Legua, C., & Campíns-Falcó, P. (2019). In-tube solid-phase microextraction. In *solid-phase extraction*, (pp. 387-427). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816906-3.00014-5>
- Moreno Navarro, I., Rubio Armendáriz, C., Gutiérrez Fernández, A., Cameán Fenández, A., & Hardisson de la Torre, A. (2007). La acrilamida, contaminante químico de procesado: Revisión. *Revista de Toxicología*, 24, 1-9.
- Naccari, C., Cristani, M., Giofrè, F., Ferrante, M., Siracusa, L., & Trombetta, D. (2011). PAHs concentration in heat-treated milk samples. *Food Research International*, 44, 716–724. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.12.029>
- Narendaran, S. T., Meyyanathan, S. N., & Babu, B. (2020). Review of pesticide residue analysis in fruits and vegetables. Pre-treatment, extraction and detection techniques. *Food Research International*, 133, 109141. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109141>
- Nollet, L. M. ., & Toldrá, F. (2010). *Hanbook of Dairy Foods Analysis*, CRC Press, New York.
- Nowak, K., Ratajczak-Wrona, W., Górska, M., & Jabłońska, E. (2018). Parabens and their effects on the endocrine system. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 474, 238–251. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.03.014>
- Ohore, O. E., & Zhang, S. (2019). Endocrine disrupting effects of bisphenol A exposure and recent advances on its removal by water treatment systems. A review. *Scientific African*, 5, 00135. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00135>
- OMS, (2023). Organización Mundial de la Salud. Contaminantes orgánicos persistentes. Disponible: <https://www.who.int/es/news/item/19-02-2013-effects-of-human-exposure-to-hormone-disrupting-chemicals-examined-in-landmark-un-report>
- Otero, J. R. (2009). Tesis Doctoral. Desarrollo de nuevos métodos de extracción en fase sólida para la preconcentración de metales traza en el agua de mar: evaluación de un soporte de C-18 y de polímeros de impronta iónica. Aplicación al estudio de la Ría de Arousa. Universidad de Santiago de Compostela.

- Pang, J., Yuan, D., & Huang, X. (2018). On-line combining monolith-based in-tube solid phase microextraction and high-performance liquid chromatography- fluorescence detection for the sensitive monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in complex samples. *Journal of Chromatography A*, 1571, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.07.077>
- Pelch, K., Wignall, J. A., Goldstone, A. E., Ross, P. K., Blain, R. B., Shapiro, A. J., Holmgren, S. D., Hsieh, J. H., Svoboda, D., Auerbach, S. S., Parham, F. M., Masten, S. A., Walker, V., Rooney, A., & Thayer, K. A. (2019). A scoping review of the health and toxicological activity of bisphenol A (BPA) structural analogues and functional alternatives. *Toxicology*, 424, 152235. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2019.06.006>
- Płotka-Wasyłka, J., Szczepańska, N., de la Guardia, M., & Namieśnik, J. (2015). Miniaturized solid-phase extraction techniques. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 73, 19–38. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.026>
- Pluta-Kubica, A., Filipczak-Fiutak, M., Domagała, J., Duda, I., & Migdał, W. (2020). Contamination of traditionally smoked cheeses with polycyclic aromatic hydrocarbons and biogenic amines. *Food Control*, 112, 107115. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107115>
- Poster D.L., Sander L. C., & Wise S. A. (1998). Chromatographic methods of analysis for the determination of PAHs in environmental samples. "PAHs and related compounds". Editor(s) Neilson, A.H. Springer, Berlin, Heidelberg, (pp. 77–137). https://doi.org/10.1007/978-3-540-49697-7_3
- Pratap, U. A., Mahapatra, S., Divya, Chandra, P., Srivastava, A., & Shetti, N. P. (2022). Electrochemical biosensors for monitoring of bioorganic and inorganic chemical pollutants in biological and environmental matrices. In *Microbial Biodegradation and Bioremediation: Techniques and Case Studies for Environmental Pollution*. Editor(s): Surajit Das, Hirak Ranjan DashElsevier Inc., Amsterdam, Netherlands, (pp. 509-531).
- PubMed (2023). National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information. Disponible: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>(Acceso: 15 de Junio de 2023)
- Qiao, L., Sun, R., Tao, Y., & Yan, Y. (2022). New low viscous hydrophobic deep eutectic solvents for the ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of endocrine-disrupting phenols in water, milk and beverage. *Journal of Chromatography A*, 1662, 462728. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462728>

- Rajabnejad, S. H., Badibostan, H., Verdian, A., Karimi, G. R., Fooladi, E., & Feizy, J. (2020). Aptasensors as promising new tools in bisphenol A detection - An invisible pollution in food and environment. *Microchemical Journal*, 155, 104722. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104722>
- Reyes-Gallardo, E. M., Lucena, R., Cárdenas, S., & Valcárcel, M. (2016). Dispersive micro-solid phase extraction of bisphenol A from milk using magnetic nylon 6 composite and its final determination by HPLC-UV. *Microchemical Journal*, 124, 751–756. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2015.10.025>
- Rezaee, M., Yamini, Y., & Faraji, M. (2010). Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2342–2357. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.088>
- Rodríguez Gómez, R. (2014). Tesis doctoral. Desarrollo de métodos de análisis para la cuantificación de disruptores endocrinos químicos en muestras biológicas. Universidad de Granada.
- Rodríguez, J.M., Aranceta, J., Blay, G., Echevarría F.J., Gil, I., Hernández, M., Iglesias, J.R., López, M.L. (2023). Guía de Buena Práctica Clínica en Alimentos Funcionales. Ministerio de Sanidad, Política, Social e Igualdad. Disponible: https://www.cgcom.es/sites/main/files/mig/gbpc_alimentos_funcionales.pdf
- Russo, G., Barbato, F., Mita, D. G., & Grumetto, L. (2019). Occurrence of Bisphenol A and its analogues in some foodstuff marketed in Europe. *Food and Chemical Toxicology*, 131, 110575. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110575>
- Sabarwal, A., Kumar, K., & Singh, R. P. (2018). Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 63, 103–114. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.08.018>
- Sánchez-Santed, F., Colomina, M. T., & Herrero Hernández, E. (2016). Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. *Cortex*, 74, 417–426. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2015.10.003>
- Santonicola, S., Albrizio, S., Ferrante, M. C., & Mercogliano, R. (2021). Study on bisphenol F, a bisphenol A analogue, at a dairy company: Health hazard and risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, 154, 112334. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112334>
- Santonicola, S., Albrizio, S., Murru, N., Ferrante, M. C., & Mercogliano, R. (2017). Study on the occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk and meat/fish based baby

food available in Italy. *Chemosphere*, 184, 467–472.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.06.017>

Schrenk, D., & Chopra, M. (2013). Dioxins and polychlorinated biphenyls (PCBs) in foods. In *Persistent Organic Pollutants and Toxic Metals in Foods*. Editor(s): Martin Rose, Alwyn Fernandes, Woodhead Publishing Limited, Sawston, United Kingdom, (pp. 191-214). <https://doi.org/10.1533/9780857098917.2.191>

Shamsipur, M., Yazdanfar, N., & Ghambarian, M. (2016). Combination of solid-phase extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by GC-MS for determination of pesticide residues from water, milk, honey and fruit juice. *Food Chemistry*, 204, 289–297. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.02.090>

Shao, B., Han, H., Tu, X., & Huang, L. (2007). Analysis of alkylphenol and bisphenol A in eggs and milk by matrix solid phase dispersion extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 850, 412–416. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.12.033>

Shariatifar, N., Dadgar, M., Fakhri, Y., Shahsavari, S., Moazzen, M., Ahmadloo, M., Kiani, A., Aeenehvand, S., Nazmara, S., & Mousavi Khanegah, A. (2020). Levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk and milk powder samples and their likely risk assessment in Iranian population. *Journal of Food Composition and Analysis*, 85, 103331. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2019.103331>

Singh, P., Singh, M. K., Beg, Y. R., & Nishad, G. R. (2019). A review on spectroscopic methods for determination of nitrite and nitrate in environmental samples. *Talanta*, 191, 364–381. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.08.028>

Skoog, D. A., Holler, J. G., & Crouch, S. R. (2018). *Principios de Análisis Instrumental*. Bostón (USA): Cengage learning.

Sogorb, M. A. S., & Vilanova, E. G. (2004). *Técnicas Analíticas de Contaminantes Químicos*. Madrid (España): Diaz de Santos.

Solá-Gutiérrez, C., Schröder, S., San-Román, M. F., & Ortiz, I. (2020). Critical review on the mechanistic photolytic and photocatalytic degradation of triclosan. *Journal of Environmental Management*, 260, 110101. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.110101>

Stadler, R. H., & Theurillat, V. (2017). Heat-generated toxicants in foods (acrylamide, MCPD esters and furan). *Chemical Contaminants and Residues in Food*. Editor(s): D. Schrenk, Woodhead Publishing Limited, Sawston, United Kingdom, (pp. 171–195). <https://doi.org/10.1533/9780857095794.2.201>

- Stallings-Smith, S., Mease, A., Johnson, T. M., & Arikawa, A. Y. (2018). Exploring the association between polycyclic aromatic hydrocarbons and diabetes among adults in the United States. *Environmental Research*, 166, 588–594. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.06.041>
- Stallones, L., & Beseler, C. L. (2016). Assessing the connection between organophosphate pesticide poisoning and mental health: A comparison of neuropsychological symptoms from clinical observations, animal models and epidemiological studies. *Cortex*, 74, 405–416. <https://doi.org/10.1016/j.cortex.2015.10.002>
- Sun, Y., Yan, K., Wu, S., & Gong, G. (2020). Occurrence, spatial distribution and impact factors of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in milks from nine countries. *Food Control*, 113, 107197. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107197>
- Tang, W., Chen, J., Yin, Z., Sheng, W., Lin, F., Xu, H., & Cao, S. (2021). Complete removal of phenolic contaminants from bismuth-modified TiO₂ single-crystal photocatalysts. *Chinese Journal of Catalysis*, 42, 347–355. [https://doi.org/10.1016/S1872-2067\(20\)63668-3](https://doi.org/10.1016/S1872-2067(20)63668-3)
- Tavares, R. S., Martins, F. C., Oliveira, P. J., Ramalho-Santos, J., & Peixoto, F. P. (2009). Parabens in male infertility-Is there a mitochondrial connection? *Reproductive Toxicology*, 27, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.10.002>
- Tfouni, S. A. V., & Camargo, M. C. R. (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbons. *Food Analysis by HPLC, Third Edition*. Editor(s) L.M.L. Nollet, F. Toldra, CRC Press, Boca Raton, Florida, (pp. 1003–1021). <https://doi.org/10.1201/b13024>
- Tuzimski, T., & Szubartowski, S. (2019). Method development for selected bisphenols analysis in sweetened condensed milk from a can and breast milk samples by HPLC–DAD and HPLC–QQQ–MS: Comparison of sorbents (Z-Sep, Z-Sep plus, PSa, C18, chitin and Emr-lipid) for clean-up of QuEChERS extract. *Molecules*, 24, 4930. <https://doi.org/10.3390/molecules24112093>
- Unión Europea. (2002). Reglamento (CE) n° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L31, 1–24
- Unión Europea. (2005). Reglamento (CE) n° 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005 relativo a los límites máximos de residuos de plaguicidas en

alimentos y piensos de origen vegetal y animal y que modifica la Directiva 91/414/CEE del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea, L70, 1–16.

Unión Europea. (2006). Reglamento (CE) n° 1907/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 18 de diciembre de 2006, relativo al registro, la evaluación, la autorización y la restricción de las sustancias y preparados químicos (REACH), por el que se crea la Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos, se modifica la Directiva 1999/45/CE y se derogan el Reglamento (CEE) n° 793/93 del Consejo y el Reglamento (CE) n° 1488/94 de la Comisión así como la Directiva 76/769/CEE del Consejo y las Directivas 91/155/CEE, 93/67/CEE, 93/105/CE y 2000/21/CE de la Comisión. Diario Oficial de la Unión Europea, L396, 1–852.

Unión Europea. (2008). Reglamento (CE) n° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios. Diario Oficial de la Unión Europea, L354, 16–33

Unión Europea. (2009). Reglamento (CE) n° 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 21 de octubre de 2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios y por el que se derogan las Directivas 79/117/CEE y 91/414/CEE del Consejo. Diario Oficial de la Unión Europea, L309, 1–50.

Unión Europea. (2011a). REGLAMENTO (UE) N ° 835/2011 DE LA COMISIÓN, de 19 de agosto de 2011, que modifica el Reglamento (CE) n ° 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea, L215, 4–8

Unión Europea. (2011b). Reglamento (UE) n° 1129/2011 de la Comisión, de 11 de noviembre de 2011, por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) n° 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo para establecer una lista de aditivos alimentarios de la Unión. Diario Oficial de la Unión Europea, L295, 1–177.

Unión Europea. (2013). Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de agosto de 2013, por la que se modifican las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. Diario Oficial de la Unión Europea, L226, 1–43

Unión Europea. (2015). REGLAMENTO DE EJECUCIÓN (UE) 2015/1080 DE LA COMISIÓN de 3 de julio de 2015 que modifica el Reglamento (UE) no 37/2010 por lo que respecta a la sustancia «parahidroxibenzoato de propilo y su sal sódica». Diario Oficial de la Unión Europea, L175, 11–13.

- Unión Europea. (2018a). Hacia un marco de la Unión Europea más exhaustivo en materia de alteradores endocrinos. Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo, al Consejo, al Comité Económico y Social Europeo y al Comité de las Regiones. COM(2018) 734 final, Bruselas, 7,1, 2018. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:52018DC0773&from=SL>
- Unión Europea. (2018b). Reglamento (UE) 2018/213 de la Comisión, de 12 de febrero de 2018, sobre el uso de bisfenol A en los barnices y revestimientos destinados a entrar en contacto con los alimentos y por el que se modifica el Reglamento (UE) n° 10/2011 por lo que respecta al uso de dicha sustancia en materiales plásticos en contacto con los alimentos. Diario Oficial de la Unión Europea, L41, 6–12.
- US FDA. (2014). Updated Safety Assessment of Bisphenol A (BPA) for Use in Food Contact Applications. <https://www.fda.gov/food/food-additives-petitions/bisphenol-bpa-use-food-contactapplication>
- USEPA. (2022a). Appendix A to 40 CFR, Part 423—126 priority pollutants. Washington, DC, USA: EPA. Disponible: <https://www.ecfr.gov/current/title-40/chapter-I/subchapter-N/part-423/appendiX-AppendiX%20A%20to%20Part%20423>.
- USEPA. (2022b). Contaminant candidate list (CCL) and regulatory determination. Chemical Contaminants - CCL 4. Final CCL 4 Chemical Contaminants. Disponible: <https://www.epa.gov/ccl/chemical-contaminants-ccl-4>.
- USEPA. (2023). Basis Information about Pesticide Ingredients. What is a Pesticide? Disponible: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients>.
- Valcárcel, M., & Cárdenas, M. (2000). Automatización y miniaturización en Química Analítica. Barcelona: Ed Springer.
- Varela-Martínez, D. A., González-Sálamo, J., González-Curbelo, M. Á., & Hernández-Borges, J. (2019). Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (QUECHERS) extraction. In *Liquid-Phase Extraction*. Editor(s): Colin F. Poole, Elsevier Inc., Amsterdam, Netherlands, (pp. 399-437). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00014-1>
- Vasconcelos, I., & Fernandes, C. (2017). Magnetic solid phase extraction for determination of drugs in biological matrices. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 89, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.11.011>

- Vilarinho, F., Sendón, R., van der Kellen, A., Vaz, M. F., & Silva, A. S. (2019). Bisphenol A in food as a result of its migration from food packaging. *Trends in Food Science and Technology*, 91, 33–65. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.012>
- Vinatoru, M., Mason, T. J., & Calinescu, I. (2017). Ultrasonically assisted extraction (UAE) and microwave assisted extraction (MAE) of functional compounds from plant materials. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 97, 159–178. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.002>
- Wang, C. F., & Tian, Y. (2015). Reproductive endocrine-disrupting effects of triclosan: Population exposure, present evidence and potential mechanisms. *Environmental Pollution*, 206, 195–201. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.07.001>
- Wang, H., Ding, J., & Ren, N. (2016). Recent advances in microwave-assisted extraction of trace organic pollutants from food and environmental samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 75, 197–208. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.05.005>
- Wang, M., Cheng, C., Liu, C., & Yang, Y. (2018). Hollow fiber supported ionic liquids liquid-phase micro-extraction followed by high-performance liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in milk samples. *Journal of Chromatographic Science*, 56, 74–80. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmx075>
- Ward, J. B., Casagrande, S. S., & Cowie, C. C. (2020). Urinary phenols and parabens and diabetes among US adults, NHANES 2005–2014. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 30, 768–776. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2020.01.005>
- Warner, G. R., Mourikes, V. E., Neff, A. M., Brehm, E., & Flaws, J. A. (2020). Mechanisms of action of agrochemicals acting as endocrine disrupting chemicals. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 502, 110680. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110680>
- Wikoff, D. S., Thompson, C., Rager, J., Chappell, G., Fitch, S., & Doepker, C. (2018). Benefit-risk analysis for foods (BRAFO): Evaluation of exposure to dietary nitrates. *Food and Chemical Toxicology*, 120, 709–723. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.08.031>
- Xiao, C., Wang, L., Zhou, Q., & Huang, X. (2020). Hazards of bisphenol A (BPA) exposure: A systematic review of plant toxicology studies. *Journal of Hazardous Materials*, 384, 121488. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121488>
- Xie, X., Lu, C., Wu, M., Liang, J., Ying, Y., Liu, K., Huang, X., Zheng, S., Du, X., Liu, D., Wen, Z., Hao, G., Yang, G., Feng, L., & Jing, C. (2020). Association between triclocarban and triclosan exposures and the risks of type 2 diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the National Health and Nutrition Examination Survey

- (NHANES 2013–2014). *Environment International*, 136, 105445. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105445>
- Xiong, L., Yan, P., Chu, M., Gao, Y. Q., Li, W. H., & Yang, X. L. (2018). A rapid and simple HPLC–FLD screening method with QuEChERS as the sample treatment for the simultaneous monitoring of nine bisphenols in milk. *Food Chemistry*, 244, 371–377. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.030>
- Yan, H., & Wang, H. (2013). Recent development and applications of dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1295, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.053>
- Yang, F. W., Zhao, G. P., Ren, F. Z., Pang, G. F., & Li, Y. X. (2020). Assessment of the endocrine-disrupting effects of diethyl phosphate, a nonspecific metabolite of organophosphorus pesticides, by in vivo and in silico approaches. *Environment International*, 135, 105383. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105383>
- Yao, M., Hu, T., Wang, Y., Du, Y., Hu, C., & Wu, R. (2017). Polychlorinated biphenyls and its potential role in endometriosis. *Environmental Pollution*, 229, 837–845. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.06.088>
- Ye, X., Bishop, A. M., Needham, L. L., & Calafat, A. M. (2008). Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for measuring parabens, triclosan, and other environmental phenols in human milk. *Analytica Chimica Acta*, 622, 150–156. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.05.068>
- Yilmaz, E., & Soylak, M. (2020). Type of new generation separation and preconcentration methods. *New Generation Green Solvents for Separation and Preconcentration of Organic and Inorganic Species*. Editor(s): Mustafa Soylak, Erkan Yilmaz, Elsevier, Amsterdam, Netherlands, (pp. 75–48). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818569-8.00003-6>
- Ying, G. G., Williams, B., & Kookana, R. (2002). Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates - A review. *Environment International*, 28, 215–226. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00017-X](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00017-X)
- Zhai, M., Fu, B., Zhai, Y., Wang, W., Maroney, A., Keller, A. A., Wang, H., & Chovelon, J. M. (2023). Simultaneous removal of pharmaceuticals and heavy metals from aqueous phase via adsorptive strategy: A critical review. *Water Research*, 236, 119924. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.119924>

- Zhang, Y., Dong, S., Wang, H., Tao, S., & Kiyama, R. (2016). Biological impact of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (ePAHs) as endocrine disruptors. *Environmental Pollution*, 213, 809–824. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.03.050>
- Zhang, J., Dang, X., Dai, J., Hu, Y., & Chen, H. (2021). Simultaneous detection of eight phenols in food contact materials after electrochemical assistance solid-phase microextraction based on amino functionalized carbon nanotube/polypyrrole composite. *Analytica Chimica Acta*, 1183, 338981. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338981>
- Zhang, S., Niu, H., Zhang, Y., Liu, J., Shi, Y., Zhang, X., & Cai, Y. (2012). Biocompatible phosphatidylcholine bilayer coated on magnetic nanoparticles and their application in the extraction of several polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water and milk samples. *Journal of Chromatography A*, 1238, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.03.056>
- Zhao, L., & Lucas, D. (2015). Multiresidue Analysis of Veterinary Drugs in Bovine Liver by LC/MS/MS Agilent Bond Elut Enhanced Matrix Removal — Lipid. Agilent Technologies. <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-6096EN.pdf>
- Zhou, T., Zhang, Z., Liu, H., Dong, S., Nghiem, L. D., Gao, L., Chaves, A. V., Zamyadi, A., Li, X., & Wang, Q. (2023). A review on microalgae-mediated biotechnology for removing pharmaceutical contaminants in aqueous environments: Occurrence, fate, and removal mechanism. *Journal of Hazardous Materials*, 443, 130213. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.130213>

CAPÍTULO 2

Determinación a nivel de traza de hidrocarburos policíclicos aromáticos en productos lácteos adquiridos en España mediante la extracción en fase sólida en un sistema continuo y la detección por cromatografía de gases-espectrometría de masas

Resumen

Los PAHs han sido clasificados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos, por sus propiedades cancerígenas, mutágenas y teratogénicas. Estos contaminantes orgánicos pueden estar presentes en los productos lácteos por distintas rutas durante la producción animal, transporte y almacenamiento. El Reglamento de la Unión Europea n° 835/2011 estableció un nivel máximo permitido de 1 µg/kg tanto para el benzo(a)pireno, como a la suma de concentraciones de benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno y criseno.

Debido a que los límites fijados por dicho Reglamento, es necesario el desarrollo de métodos de cuantificación sensibles, siendo este el objetivo principal de este Capítulo. Se desarrolló un método capaz de determinar los 16 PAHs prioritarios en muestras de leche y productos lácteos. Como es sabido, las muestras de productos lácteos son complejas con un alto contenido de grasas (0.3 – 82 %) y proteínas (0.6 – 24 %). Por ello, se hace necesario el desarrollo de un procedimiento eficaz para el tratamiento de las muestras que elimine el alto contenido de estos nutrientes y que pueden interferir en la determinación de los analitos objeto de estudio. El tratamiento de muestra consistió en una extracción líquido-líquido (LLE), seguido de una extracción en fase sólida en un sistema continuo.

En primer lugar, se optimizaron las variables que afectaban a la etapa de LLE del tratamiento de muestra para reducir el efecto matriz y aislar los analitos de manera satisfactoria. El trabajo se inició con una saponificación mediante NaOH en metanol en combinación con LLE seguido de SPE. Sin embargo, los resultados no fueron los deseados, por lo que se procedió a un estudio más exhaustivo de la LLE usando diferentes disolventes orgánicos, obteniéndose unos resultados satisfactorios con la mezcla de dimetilformamida y agua (9:1 v/v).

A continuación, se optimizaron las variables que afectaban a la etapa de extracción en fase sólida, etapa crucial para la limpieza del extracto obtenido en la extracción líquido-líquido y preconcentración de los analitos objeto de estudio. Para ello se realizaron estudios preliminares usando distintos adsorbentes, incluyendo sílice en fase inversa con grupos

octadecilo (RP-C18), Amberlitas (XAD-2 y XAD-4), Oasis HLB y LiChrolut EN. Los mejores resultados se obtuvieron con el adsorbente RP-C18.

También se evaluó el efecto matriz para muestras de leche, yogur, mantequilla, queso, natillas, nata, batidos y margarina, obteniéndose valores entre 0 y 20 %. Por lo cual se puede concluir que el procedimiento de limpieza utilizado es suficientemente satisfactorio para eliminar el efecto matriz de las muestras complejas analizadas.

La determinación de los analitos se llevó a cabo mediante un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas. La columna cromatográfica era un HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). El método fue evaluado en términos de recuperación (80–107 %), precisión (RSD < 11.5%) y sensibilidad (límites de detección entre 1 – 200 ng/kg).

El método se aplicó a 30 productos lácteos con distinto contenido de grasa y proteínas. En concreto, se analizaron once muestras de diferentes marcas de leche, entre ellas leche entera (3.6 % de contenido graso), semidesnatada (1.6%) y desnatada (0.3 %) de vaca, cabra (3.9 %) y oveja (6.5 %) y diecisiete muestras de productos lácteos donde se incluían yogur (2.6-5.4 % de contenido graso), batidos (1.0-1.5 %), nata (18 %), natillas (2.4-3.9 %), queso (12.1-13.1 %), mantequilla (81-82 %) y margarina (60 %). Todas las muestras se adquirieron en supermercados españoles. En la Tabla 2.1 se incluyen los intervalos PAHs encontrados en las muestras analizadas. La mayoría de las muestras contenían algún PAH, pero ninguna de las muestras contenía más de cuatro PAHs.

Tabla 2.1. Concentración de PAHs encontrada en varios tipos de leche y productos lácteos.

Contaminantes	Concentración encontrada (ng/kg)
Naftaleno	260 – 1900
Acenafteno	7.1 – 510
Fluoreno	30 – 150
Fenantreno	88

Article

Trace-Level Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Dairy Products Available in Spanish Supermarkets by Semi-Automated Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry Detection

Laura Palacios Colón, Andrés J. Rascón  and Evaristo Ballesteros * 

Department of Physical and Analytical Chemistry, E.P.S of Linares, University of Jaén, 23700 Linares, Spain; lpcolon@ujaen.es (L.P.C.); arascon@ujaen.es (A.J.R.)

* Correspondence: eballes@ujaen.es; Tel.: +34-953-648-560

Abstract: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) have been classified as priority pollutants by the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) and the European Commission on the grounds of their carcinogenic, mutagenic and teratogenic properties. Because of their ubiquity in industrial processes and the environment, PAHs can reach milk and dairy products and, eventually, humans. In this work, a new method was developed to detect and quantify sixteen of the EPA's priority PAHs in commercial milk and dairy products. The method involves liquid–liquid extraction (LLE) followed by semi-automated solid-phase extraction (SPE) to clean up and preconcentrate the analytes prior their detection and quantification by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). The proposed method provided high precision (relative standard deviation < 11.5%), recoveries of 80–107% and low detection limits (1–200 ng/kg). The method was applied to analyze 30 dairy products, the majority of which contained some PAH at concentrations from 7.1 to 1900 ng/kg. The most-detected analytes were the lighter PAHs (naphthalene, acenaphthylene, fluorene and phenanthrene). None of the samples, however, contained more than four PAHs.

Keywords: dairy product composition; priority pollutants; polycyclic aromatic hydrocarbons; health risk; liquid–liquid extraction; continuous solid-phase extraction; gas chromatography-mass spectrometry



Citation: Palacios Colón, L.; Rascón, A.J.; Ballesteros, E. Trace-Level Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Dairy Products Available in Spanish Supermarkets by Semi-Automated Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry Detection. *Foods* **2022**, *11*, 713. <https://doi.org/10.3390/foods11050713>

Received: 11 February 2022

Accepted: 25 February 2022

Published: 28 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Milk and dairy products are among the most nutritionally complete foods available on the market and have historically been essential to the human diet because of their contents of micro- and macronutrients. This has raised increasing concern with their safety [1], which can be compromised by physical, chemical and microbiological contamination during the animal production of milk or, subsequently, during the transport, storage, processing or delivery of milk and dairy products [2]. Especially prominent among the chemical contaminants are polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). These are ubiquitous environmental pollutants that are formed by the incomplete combustion of organic matter that can reach food through fuel combustion, industrial processes, degasification, petroleum derivative tasks and also through food processing operations, such as drying, smoking or cooking [3]. While low-molecular-weight PAHs can have systemic effects on targets such as the kidney, blood and liver, their high-molecular-weight counterparts are typically carcinogenic or genotoxic [4]. PAH exposure can lead to health effects in the short and long term. In patients with asthma, PAHs can cause pulmonary impairment and thrombosis. In the long term, PAHs can cause different types of cancer (digestive tract, skin and lungs) [5].

PAHs are non-polar compounds whose lipophilicity makes them soluble in lipids, leading to bioaccumulation in foods and in fat tissue from living organisms [6]. PAHs absorbed by inhalation, ingestion or—in small amounts—through the skin are metabolized

CAPÍTULO 3

Validación y aplicación de un método exacto y sensible para la preparación de muestras y determinación de disruptores endocrinos en productos lácteos mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas

Resumen

Los disruptores endocrinos (EDCs) son contaminantes de interés para los investigadores ya que son sustancias que interfieren en la síntesis, liberación y transmisión del sistema hormonal del organismo humano. La exposición a estos contaminantes pueden tener graves consecuencias para la salud, pudiendo inducir a enfermedades como cáncer, infertilidad y Parkinson, entre otras. Los EDCs pueden llegar a los alimentos a través de piensos, suelos, agua y aire. Existe legislación vigente para estas sustancias. El Reglamento (UE) 2019/533 exige a los estados miembros de la Unión Europea que analicen combinaciones de plaguicidas en productos lácteos, incluida la leche, durante el periodo de 2020-2022. Además, la Comisión Europea y el Codex Alimentarius han establecido límites máximos de residuos de 10 – 50 µg/kg para plaguicidas en alimentos y productos animales. El Reglamento (UE) 2018/213 ha autorizado el uso de BPA en concentraciones inferiores a límite de migración específica de 0.05 mg/kg en alimentos.

Basándose en lo anterior existe la necesidad de desarrollar y validar un método preciso y sensible para la determinación de diferentes disruptores endocrinos en muestras de leche y sus derivados lácteos, siendo este el principal objetivo de este Capítulo de la Memoria. Las familias de contaminantes orgánicos en estudio fueron parabenos, plaguicidas organofosforados, alquifenoles, fenilfenoles, bisfenol A y triclosán. Para la cuantificación de estos tipos de EDCs en matrices complejas requiere del uso de un procedimiento de extracción eficaz para eliminar las grasas y proteínas de la matriz previa a la determinación de los contaminantes. En primer lugar, se optimizó y puso a punto el tratamiento muestra. Para ello, los productos lácteos fueron sometidos a una extracción líquido-líquido. En esta etapa se realizó un estudio con diferentes disolventes orgánicos (*n*-hexano, metanol, etanol, dimetilformamida y acetonitrilo), seleccionando acetonitrilo con 1% de ácido fórmico. A continuación, la mezcla se centrifugó (5000 rpm) y finalmente, se realizó una limpieza de extracto mediante la técnica de SPE en un sistema continuo. En este sistema se consiguió una elevada preconcentración de los analitos. Se llevó a cabo la optimización de las diferentes variables que puede influir en la etapa de SPE en un sistema continuo (tipo de adsorbente, eluyente, caudal de muestra y pH). Los valores seleccionados como óptimos fueron los siguientes: LiChrolut, como material adsorbente (80 mg), acetonitrilo como eluyente (450

μL), para el caudal de muestra se seleccionó 5 ml/min, finalmente el pH 4.0 fue el elegido para realizar el tratamiento de muestra.

A continuación, los analitos eluidos de la columna de SPE se derivatizaron con una mezcla de reactivos sililantes N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) + 1% trimetilclorosilano (TMCS) mediante el uso de microondas. Los EDCs se cuantificaron mediante cromatografía de gases-espectrometría, usando un equipo Focus de Thermo Electron (Madrid, España) acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo único DSQ II que funcionaba en modo de ionización de electrones (EI). Las muestras se inyectaron mediante un automuestreador AL/AS 3000 de Thermo Scientific. El cromatógrafo estaba provisto de una columna capilar HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) y He a 1.0 mL/min que se utilizó como gas portador.

El efecto matriz debe considerarse siempre que se desarrolla un método analítico para muestras complejas. Para ello, se evaluó el efecto matriz para diferentes muestras obteniéndose valores entre 0 y 20 %, considerándose un efecto matriz bajo o suave por lo que el procedimiento de limpieza utilizado es suficiente para evitar interferencias provenientes de la matriz.

El método fue evaluado en términos de recuperación (80–108%), precisión (desviación estándar relativa (RSD) < 7.6%) y sensibilidad (LOD entre 6 – 40 ng/kg).

Finalmente, y siguiendo los objetivos planteados en este Capítulo de la Memoria, el método fue aplicado par la determinación de 23 EDCs en productos lácteos con diferentes porcentajes de grasas y proteínas (leche de vaca, cabra y oveja; yogur, mantequilla, batidos, queso, natillas y nata). Se analizaron un total de 33 muestras. En la Tabla 2.1 se encuentran los contenidos medio de grasas y proteínas de las muestras objeto de estudio.

Tabla 3.1. Contenido en grasa y proteínas de las muestras analizadas.

	Leche	Yogur	Batidos	Nata	Natillas	Mantequilla	Queso
Grasas (%)	0.3 – 6.5	2.6 – 5.4	1 – 1.5	18.0– 18.1	2.4 – 2.9	81.0 – 82.0	12.1 – 13.1
Proteínas (%)	3.0 – 4.9	3.5 – 4.3	1.6 – 3	2.1 – 2.5	2.3 – 3.4	0.5 – 0.7	10.1– 12.9

Los resultados a destacar en los análisis de las muestras reales demuestran que en la mayoría de los casos estaba presente el bisfenol A a concentraciones entre 180 a 4 800 ng/kg. El Reglamento (UE) 2018/213 especifica no superar el límite de migración específica de 0.05 mg/kg de BPA en alimentos, por lo que no se superan los límites establecidos por la Legislación Europea. Por otro lado, el 2-fenilfenol se detectó en un 53 % de las muestras analizadas a niveles entre 130 y 3 500 ng/kg. En cambio, el 4-fenilfenol solo estaba presente en 3 tipos de muestras a concentraciones inferiores (130-230 ng/kg). Otro EDC que se encontró en la mayoría de las muestras fue el etilparabeno, detectado en la mitad de las muestras analizadas a concentraciones que oscilaban entre 89 y 4 300 ng/kg. En cambio, los alquifenoles, plaguicidas organofosforados y el triclosán no fueron detectados en ninguna de las muestras estudiadas. En ningún caso se superaron los límites establecidos por la legislación europea para ninguno de los analitos estudiados.

Article

Validation and Use of an Accurate, Sensitive Method for Sample Preparation and Gas Chromatography–Mass Spectrometry Determination of Different Endocrine-Disrupting Chemicals in Dairy Products

Laura Palacios Colón ¹, Andrés J. Rascón ¹ , Lamia Hejji ^{1,2}, Abdelmonaim Azzouz ^{1,2} and Evaristo Ballesteros ^{1,*} 

¹ Department of Physical and Analytical Chemistry, E.PS of Linares, University of Jaén, 23700 Linares, Spain; lpcolon@ujaen.es (L.P.C.); ajr10006@red.ujaen.es (A.J.R.); lamiae.hejji@gmail.com (L.H.); aazzouz@uae.ac.ma (A.A.)

² Department of Chemistry, Faculty of Science, University of Abdelmalek Essaadi, B.P. 2121, M'Hannech II, Tétouan 93002, Morocco

* Correspondence: eballes@ujaen.es; Tel.: +34-953-648-560



Citation: Palacios Colón, L.; Rascón, A.J.; Hejji, L.; Azzouz, A.; Ballesteros, E. Validation and Use of an Accurate, Sensitive Method for Sample Preparation and Gas Chromatography–Mass Spectrometry Determination of Different Endocrine-Disrupting Chemicals in Dairy Products. *Foods* **2021**, *10*, 1040. <https://doi.org/10.3390/foods10051040>

Academic Editor: Vincenzo Cunsolo

Received: 25 March 2021

Accepted: 7 May 2021

Published: 10 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Endocrine disrupting chemicals (EDCs) are exogenous substances capable of altering the human hormone system and causing various diseases such as infertility and cancer as a result. In this work, a method for determining twenty-three different EDCs including parabens, alkylphenols, phenylphenols, organophosphorus pesticides, bisphenol A and triclosan in dairy products was developed. Samples are conditioned by addition of acetonitrile containing 1% formic acid, centrifugation and clean-up of the extract by continuous solid-phase extraction. EDCs in the extract are derivatised by heating in a microwave oven and quantified by gas chromatography–mass spectrometry. The proposed method features good limits of detection (6–40 ng/kg) and precision (relative standard deviation < 7.6%); also, it is scarcely subject to matrix effects (1–20%). EDC recoveries from spiked samples ranged from 80 to 108%. The method was used to analyse a total of 33 samples of dairy products including cow, sheep and goat milk, yoghurt, milkshakes, cheese, cream, butter and custard. Bisphenol A was the individual contaminant detected in the greatest number of samples, at concentrations from 180 to 4800 ng/kg. 2-Phenylphenol and ethylparaben were found in more than one-half, at concentrations over the range 130–3500 and 89–4300 ng/kg, respectively. In contrast, alkylphenols, organophosphorus pesticides and triclosan were detected in none.

Keywords: milk; dairy products; endocrine disrupting chemicals; solid-phase extraction; gas chromatography–mass spectrometry

1. Introduction

Compounds with hormonal activity such as endocrine disrupting chemicals (EDCs) have been in the spotlight of food safety research for a while now. EDCs are exogenous substances that interfere with hormone synthesis, release, transmission, binding, excretion, action or clearance in living organisms, where hormones play roles such as maintaining balance, promoting reproduction and development and adjusting various bodily behaviours [1]. The xenoestrogens bisphenol A (BPA), nonylphenol (NP) and 4-tert-octylphenol (4-t-OP), which are industrially produced in high volumes [2], are often present in food packaging plastics and other materials from which they can migrate to food and water [1]. Organophosphorus pesticides, another group of EDCs, are monitored on the grounds of their adverse effects on human health [3]. Finally, parabens are widely used as antimicrobial preservatives against moulds and yeasts, as well as in cosmetics and pharmaceuticals and food and beverage processing [4].

CAPÍTULO 4

Determinación simultánea de contaminantes fenólicos en productos lácteos conservados en varios tipos de envases mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas

Resumen

La Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos (EPA) ha considerado a los compuestos fenólicos como contaminantes orgánicos prioritarios. El Reglamento No. 10/2011 de la Comisión Europea (CE) incluye una lista de sustancias permitidas para el uso como aditivos en plásticos en contacto con alimentos, algunas de las cuales están sujetas a límites de migración específica y restricciones y el Reglamento No. 2018/213 permite el uso de BPA con un límite de migración específica de 50 000 ng/kg en alimentos.

Los compuestos fenólicos se componen de varias familias de contaminantes, donde se incluyen los alquifenoles, bisfenoles y clorofenoles. Estos contaminantes pueden ingresar en la cadena láctea en distintas fases de producción, desde la granja hasta el envasado. La leche y los productos lácteos son alimentos básicos y de amplio consumo en España.

Debido a la importancia de los productos lácteos y la toxicidad que presenta los compuestos fenólicos, es necesario el desarrollo de métodos sensibles, siendo este el principal objetivo de este Capítulo de la Memoria. Para ello, se desarrolló y validó un método para la cuantificación de 21 compuestos fenólicos en muestras de leche y productos lácteos, provenientes de distintos envases (tereftalato de poliestileno (PET), poliestileno (PS), envases multicapa y vidrio). En la Tabla 4.1 se incluyen los compuestos fenólicos objeto de estudio de este Capítulo.

Tabla 4.1. Compuestos fenólicos objeto de estudio

Fenol	4-Fenilfenol	Pentaclorofenol
2,5-Dimetilfenol	2-Fenilfenol	Triclosan
3,4-Dimetilfenol	4-Hexilfenol	Bisfenol A
4-Clorofenol	4-Heptilfenol	Bisfenol F
4-Cloro-3-metilfenol	4- <i>tert</i> -Octilfenol	Bisfenol B
4- <i>tert</i> -Butilfenol	Nonilfenol	Bisfenol Z
2- <i>tert</i> -Butil-4metilfenol	4-Pentilfenol	Bisfenol S

Una etapa importante en la extracción de compuestos fenólicos es la limpieza para aislar eficazmente los analitos de las sustancias interferentes de la matriz de la muestra previa a su introducción en el un sistema de detección y cuantificación (CG-MS). En este trabajo se desarrolló un procedimiento que implicaba la extracción asistida por microondas combinada con la SPE en un sistema continuo. Para ello, se optimizaron las variables que afectaban a la extracción asistida por microondas, como el tiempo, la temperatura y la frecuencia. Por otra parte, se optimizaron las variables que afectaban a SPE. Se examinó la retención de los contaminantes fenólicos en distintos absorbentes como LiChrolut EN, Oasis-HLB, RP-C-18 y Amberlitas (XAD-4, XAD-7 y XAD-16). De estos estudios se concluyó que los mejores resultados en términos de eficacia en retención se obtuvieron con el sorbente Oasis-HLB. Posteriormente, se realizó la optimización de la cantidad de sorbente, el eluyente, el pH y el volumen de ruptura.

A continuación, se realizó el estudio de validación del método, evaluado el efecto matriz para distintas muestras, obteniéndose valores entre 0-20%. Además, se estudió la precisión ($RSD < 11\%$) y la exactitud (porcentajes de recuperación de 85-108%).

La determinación de los analitos se llevo a cabo mediante cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas. La columna cromatografica usada fue de HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm). Los compuestos fenólicos fueron previamente derivatizados con una mezcla de reactivos sililantes de N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) + 1% trimetilclorosilano (TMCS) mediante microondas.

El método fue aplicado a 38 muestras entre las que se encontraban: leche de vaca, cabra y oveja, yogur, natillas, batidos, margarina, queso y mantequilla. Los compuestos fenólicos más detectados fueron bisfenol Z, bisfenol A y el 4-tert-butilfenol, en concentraciones de 96-1100, 30-1400 y 310-2100 ng/kg, respectivamente. Los contaminantes se encontraron principalmente en leche y productos lácteos envasados en PET, PS y envases multicapa. Las muestras envasadas en vidrio contenían niveles muy bajos de contaminantes fenólicos.



Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont

Simultaneous determination of phenolic pollutants in dairy products held in various types of packaging by gas chromatography–mass spectrometry

Laura Palacios Colón, Andrés J. Rascón, Evaristo Ballesteros*

Department of Physical and Analytical Chemistry, E.P.S of Linares, University of Jaén, 23700, Linares, Jaén, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Phenolics
Milk
Dairy products
Ultrasound-assisted extraction
Continuous solid-phase extraction
Gas chromatography–mass spectrometry

ABSTRACT

The U.S. Environmental Protection Agency (EPA) has deemed phenolic compounds priority organic pollutants. These compounds can reach milk and dairy products at different production stages from farm to packaging. In this work, we developed a procedure involving ultrasound-assisted extraction from milk and dairy products, and subsequent clean-up of the extract and preconcentration of the analytes by continuous solid-phase extraction (SPE) for their quantification by gas chromatography–mass spectrometry. The proposed method was used to detect and quantify a total of 21 phenolics including phenols, alkylphenols, bisphenols and chlorophenols in milk and dairy products. The method was validated in terms of recovery (85–106%), linearity, matrix effects (slight, <20%), precision (relative standard deviation < 11%), and limits of detection (6–63 ng/kg). Then, it was used to analyze nineteen milk samples and as many dairy product samples. The most detected analytes were bisphenol Z, bisphenol A and 4-*t*-butylphenol, which were found in the samples at concentrations spanning the ranges 96–1100, 30–1400 and 310–2100 ng/kg, respectively. The contaminants were present mainly in milk and dairy products packed in polystyrene terephthalate (PET), multilayer packaging (carboard/polyethylene/aluminum) or polystyrene (PS) packaging. By contrast, the samples packed in glass containers contained very low levels of the phenolics.

1. Introduction

Because phenolic compounds (alkylphenols, chlorophenols and bisphenols included) are highly toxic, their persistence in the environment is an issue of great concern (Ghaemi & Amiri, 2020). Alkylphenols and chlorophenols are widely used as substrates to obtain agricultural pesticides, and also as preservatives in household detergents, drugs, can packaging materials and intermediates in many industries (Farajzadeh et al., 2022; Mousavi et al., 2021).

Environmental accumulation of phenolic pollutants from different sources increases hazards to living organisms owing to their acute toxicity and endocrine disrupting potential (Tang et al., 2021). These pollutants can in fact have severe, long-lasting deleterious effects on humans and animals. Specifically, phenols can cause liver damage, reproductive abnormalities, cancer and endocrine disruption even in minute amounts (Adjei et al., 2021; Farajzadeh et al., 2022). Their toxicity is mostly the result of their high persistence, easy accumulation in fatty tissues and recalcitrance to degradation (Adjei et al., 2021). Bisphenol A (BPA) is produced in large amounts by the chemical

industry and used mainly as a monomer to produce polycarbonate polymers (~80%) and epoxy resins (~18%). Both types of products are widely used as food contact materials and BPA, specifically, in water bottles, milk and food containers, and water supply pipes (Caballero-Casero et al., 2016; Zhou et al., 2017). Concerns about the adverse effects of BPA on human and aquatic life health have led the industry to increasingly replace it with bisphenol-B (BPB), bisphenol-F (BPF), bisphenol-S (BPS) or bisphenol-Z (BPZ) for some uses on the grounds of their structural similarity. Unfortunately, these alternative compounds are also similarly toxic but less well-known to the scientific community (Banaderakhshan et al., 2022; Caballero-Casero et al., 2016).

The U.S. Environmental Protection Agency (EPA) is aware of the potential hazards of phenols and has added ten of them to the Priority Pollutant List (USEPA, 2022a). Also, European Commission (EC) Regulation No. 10/2011 includes a list of allowed substances for use as additives in food contact plastics some of which are subject to specific migration limits (SMLs) or restrictions. For example, SML for 4-*t*-butylphenol, phenol, 2,6-dimethylphenol and BPS is 50 000 ng/kg (European Commission, 2011). European Commission Regulation (EU

* Corresponding author. Department of Physical and Analytical Chemistry, E.P.S. of Linares, University of Jaén, Avenida de la Universidad, s/n, E-23700, Linares, Jaén, Spain.

E-mail address: eballes@ujaen.es (E. Ballesteros).

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109564>

Received 13 September 2022; Received in revised form 2 December 2022; Accepted 12 December 2022

Available online 16 December 2022

0956-7135/© 2022 Elsevier Ltd. All rights reserved.

CAPÍTULO 5

Determinación de parabenos y compuestos fenólicos en productos lácteos mediante el uso de un sistema SPE en continuo de dos pasos que incluye un sorbente de eliminación de matriz mejorada en combinación con UHPLC-MS/MS.

Resumen

La leche es uno de los alimentos más consumidos en España. El último informe emitido por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación declara que la leche se consume en torno a los 71,27 litros por persona y año. Actualmente, la leche y sus derivados lácteos están expuestos a contaminación, motivo de gran preocupación.

Los parabenos y los compuestos fenólicos son contaminantes que pueden llegar a la leche por diferentes vías: durante el proceso de fabricación, por contaminación del ganado por alimentación y agua, a través de envases, etc. Los parabenos tienen propiedades antimicrobianas y conservantes por lo que son utilizados en productos de cosmética, farmacia, alimentación y bebidas. Los compuestos fenólicos se componen de varias familias de contaminantes, donde se incluyen los alquifenoles, bisfenoles y clorofenoles. Estos contaminantes se utilizan como plaguicidas, como conservantes y también en la industria de envasado e industria farmacéutica y cosmética.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha fijado una Ingesta Diaria Tolerable (TDI) de bisfenol A en 0.04 mg/kg. Además, el Reglamento No 2018/213 fija un límite de migración específica (SML) de 0.05 mg/kg en alimentos. La Agencia de Protección del Medio Ambiente de USA incluye una lista de contaminantes prioritarios donde figuran 11 compuestos fenólicos. El Reglamento No 11/2011 establece un límite de migración específica para el 4-*tert*-butilfenol, fenol y 2,6-dimetilfenol en 0.05 mg/kg en materiales en contacto con alimentos.

Debido a la importancia de la leche y la toxicidad que presentan parabenos y los compuestos fenólicos, es necesario el desarrollo de métodos sensibles para su determinación. El objetivo de este Capítulo de la Memoria ha sido la determinación de siete parabenos y veintiún compuestos fenólicos en productos lácteos. Se ha llevado a cabo la simplificación y unificación del procedimiento de extracción, mejorando la eficiencia y reduciendo el efecto matriz. La determinación se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tandem (UHPLC-MS/MS).

El éxito de un método analítico sensible se debe en gran medida al pretratamiento de muestra. En este trabajo se desarrolló un procedimiento donde se lleva a cabo una extracción líquido-líquido en combinación con extracción en fase sólida en un sistema cerrado y continuo. Para determinar la eficacia de la eliminación de lípidos y otras interferencias de las muestras, el sobrenadante obtenido en la etapa de extracción líquido-líquido fue analizado en diferentes situaciones:

1. Analisis directo del extracto
2. SPE con material adsorbente EMR-lipid
3. SPE combinando los materiales adsorbentes EMR-lipid y OASIS PRiME HLB en serie

El desempeño de los diferente materiales adsorbentes se evaluó comparando la eficacia en terminos de recuperación, obteniéndose los mejores valores de recuperación cuando se realizó la SPE combinando en serie usando dos columnas rellenas con cada de los adsorbentes (EMR-lipid y Oasis PRiME HLB) y colocadas en serie. El adsorbente EMR-lipid es un material diseñado para la eliminación selectiva de los principales lípidos sin retener los analitos de interés. Este material fue introducido por primera vez por Agilent Technology en 2015. En cambio el adsorbente Oasis PRiME HLB es un nuevo sorbente en fase reversa, la muestra pasa directamente por el material, eliminando la mayoría de interferencias de la matriz, como proteínas, sales y fosfolípidos.

Finalmente, se evaluó el método desarrollado evaluando el efecto matriz (0-10%), precisión (RSD <11%) y exactitud (recuperación de 90-105%). La determinación se llevo a cabo mediante UHPLC-MS/MS, donde se realizó la infusión y caracterización de cada analito individualmente previo análisis. La columna utilizada para la separación cromatográfica fue una ZORBAX Eclipse Plus C18 (2,1 mm x 100 mm, tamaño de particular de 1,8 μ m).

El método fue aplicado a 31 muestras; concretamente, 15 muestras de leche y 16 productos lácteos. Los compuestos más detectados fueron el bisfenol A (33-580 ng/kg) y bisfenol Z (24-57 ng/kg), pero los niveles de concentración no superaron los límites establecidos por la Legislación de la Unión Europea. En un 26% de las muestras analizadas se detectó el nonilfenol a niveles de concetraciones bajos. Entre los parabenos, el compuesto

más encontrado en las muestras analizadas fue el etilparabeno a concentraciones entre 33 y 470 ng/kg.

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

Determination of parabens and phenolic compounds in dairy products by use of a two-step continuous SPE system including an enhanced matrix removal sorbent in combination with UHPLC–MS/MS

Journal:	<i>Journal of Agricultural and Food Chemistry</i>
Manuscript ID	jf-2023-03953x
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	12-Jun-2023
Complete List of Authors:	Palacios Colón, Laura; University of Jaén, Department of Physical and Analytical Chemistry Rascón, Andrés J. ; University of Jaén, Department of Physical and Analytical Chemistry Ballesteros, Evaristo; University of Jaén, Dept. of Physical and Analytical Chem.

SCHOLARONE™
Manuscripts

CONCLUSIONES

En la presente Memoria de Tesis Doctoral se han implementado diferentes metodologías para la detección y cuantificación de disruptores endocrinos en muestras de leche y productos lácteos. Los disruptores endocrinos que han sido objeto de estudio pertenecen a las familias de los parabenos, compuestos fenólicos, hidrocarburos policíclicos aromáticos, bisfenoles y plaguicidas. La mayoría de las metodologías aparecidas en la bibliografía para la determinación de estos contaminantes se basan en el uso de técnicas cromatografías (cromatografía de gases o cromatografía líquida en columna) acopladas a la espectrometría de masas. Respecto al tratamiento de muestra, una de las técnicas más empleada es la extracción en fase sólida, ya sea sola o en combinación de otras técnicas. Como resultado a la investigación llevada a cabo en la presente Memoria, se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. Se ha desarrollado un método para la determinación de 16 hidrocarburos policíclicos aromáticos considerados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección del Medio Ambiente estadounidense. Para la preparación de muestras se usó la combinación de las técnicas de extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida. Según la naturaleza de la muestra a tratar se llevaron a cabo dos procedimientos diferentes: 1) para muestras con alto contenido en grasa (mantequilla y margarina) la extracción líquido-líquido se ha usado una mezcla de disolventes de N,N-dimetilformamida:agua y hexano; 2) para el resto de productos lácteos la extracción líquido-líquido se ha llevado a cabo usando una mezcla de disolvente de N,N-dimetilformamida:agua y etanol. La detección y cuantificación se ha realizado mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas, llegando a límites de detección a nivel traza (1– 200 ng/kg). El método fue aplicado con éxito a una gran variedad de productos lácteos. Los valores encontrados de estos contaminantes en las muestras analizadas estaban por debajo de los niveles permitidos en alimentos.
2. Se ha puesto a punto un procedimiento analítico para la determinación simultánea de parabenos, plaguicidas organofosforados, alquifenoles, fenilfenoles, bisfenol A y triclosán en productos lácteos. La etapa de tratamiento de muestra se ha llevado a cabo en un sistema continuo de extracción en fase

sólida para la limpieza de los extractos de la muestra y preconcentración de los analitos. De los adsorbentes estudiados se encontró que el LiChrolut EN era con el que se conseguía un mayor poder de retención de los analitos objeto de estudio. Previamente a la determinación, los analitos han sido derivatizados mediante silylación utilizando un horno de microondas para acelerar la reacción. Finalmente, la cuantificación se ha realizado mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas de simple cuadrupolo. Se han obtenido resultados satisfactorios en términos de sensibilidad, precisión y exactitud. Los resultados obtenidos del análisis de las diferentes muestras revelan que existe una leve contaminación de estos contaminantes en los productos lácteos. Cabe destacar la presencia de bisfenol A, etilparabeno y 2-fenilfenol en las muestras de estudio. La contaminación puede deberse al pienso suministrado a los animales, a la desinfección de los equipos de procesamiento y a los envases de los alimentos.

3. Se ha propuesto un método para la cuantificación de 21 compuestos fenólicos en productos lácteos. En este método, la extracción y limpieza de los extractos se ha realizado mediante extracción asistida por ultrasonidos en combinación con extracción en fase sólida. El adsorbente empleado fue Oasis-HLB. Con esta etapa de tratamiento se ha conseguido la minimización del efecto matriz de las muestras. La detección y cuantificación se ha llevado a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, consiguiendo niveles de sensibilidad muy satisfactorios. Posteriormente, el método se ha usado para el análisis de muestras de leche y productos lácteos envasados en distintos materiales, como tereftalato de poliestireno (PET), poliestireno (PS), envase multicapa (combinación de materiales plásticos, cartón y aluminio) y vidrio. El BPA ha sido el contaminante que más frecuentemente se encontraba en las muestras analizadas que está de acuerdo con otros estudios bibliográficos que concluyen que este contaminante proviene de los envases de plástico que están en contacto con alimentos.
4. Se ha implementado una metodología para determinación de 21 contaminantes fenólicos y 7 parabenos en diferentes tipos de productos lácteos (leche de vaca,

cabra y oveja; yogur, mantequilla, batidos, queso, natillas y nata). En la etapa de preparación de muestra, la extracción de los analitos se ha llevado a cabo mediante extracción en fase sólida, donde se utilizó una combinación de dos adsorbentes colocados en serie en un sistema continuo (EMR-lipid y OASIS PRiME HLB). El adsorbente EMR-lipid es un material que elimina selectivamente las principales clases de lípidos de la muestra mientras que el OASIS PRiME HLB elimina la mayoría de las interferencias de la matriz, como proteínas, sales y fosfolípidos. La utilización de estos adsorbentes reduce el tiempo de tratamiento de muestra, respecto a otras metodologías propuestas además de reducir el efecto matriz. La detección y cuantificación se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas en tándem e ionización por electrospray. Esta técnica es una de las más eficientes debido a su alta sensibilidad y reproducibilidad, no siendo necesaria la derivatización previa de los contaminantes fenólicos y parabenos. Cabe resaltar que la mayoría de las muestras analizadas mediante este método contenían algunos de los analitos objeto de estudio, siendo los más detectados los bisfenoles A y Z, el nonilfenol y el etilparabeno a niveles entre 24 y 580 ng/kg. También se ha advertido que las muestras envasadas en vidrio estaban menos contaminadas con los analitos objeto de estudio. En cambio, las muestras envasadas en los diferentes plásticos estudiados contenían concentraciones superiores de los contaminantes fenólicos y parabenos.

PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DE LA INVESTIGACIÓN

Artículos

Título: Determination of parabens and phenolic compounds in dairy products by use of a two-step continuous SPE system including an enhanced matrix removal sorbent in combination with UHPLC–MS/MS

Revista: Enviada para su publicación a la revista Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2023

Año: 2023

Autores: Laura Palacios Colón, Andrés J. Rascón, Evaristo Ballesteros

Título: Simultaneous determination of phenolic pollutants in dairy products held in various types of packaging by gas chromatography-mass spectrometry

Revista: Food Control

Año: 2023

Volumen: 146

Páginas: 109564

Autores: Laura Palacios Colón, Andrés J. Rascón, Evaristo Ballesteros

Título: Trace-level determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in dairy products available in Spanish supermarkets by semi-automated solid-phase extraction and gas chromatography–mass spectrometry detection

Revista: Foods

Año: 2022

Volumen: 11

Páginas: 713

Autores: Laura Palacios Colón, Andrés J. Rascón and Evaristo Ballesteros

Título: Validation and use of an accurate, sensitive method for sample preparation and gas chromatography–mass spectrometry determination of different endocrine-disrupting chemicals in dairy products

Revista: Foods

Año: 2021

Volumen: 10

Páginas: 1040

Autores: Laura Palacios Colón, Andrés J. Rascón, Lamia Hejji, Abdelmonaim Azzouz and Evaristo Ballesteros

Aportaciones a Congresos

Título de la aportación: Use of continuous solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of parabens, phenols and biphenols in dairy products

Nombre del congreso: XVI Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica

Tipo de evento: Póster en Congreso

Ámbito: Nacional

Año: 2022

Lugar: Sevilla

Autores: Laura Palacios Colón, Andrés J. Rascón, Evaristo Ballesteros

Título de la aportación: Assessing the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons in dairy products by continuous solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry detection.

Nombre del congreso: XVI Reunión del Grupo Regional Andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica

Tipo de evento: Oral en Congreso

Ámbito: Nacional

Año: 2022

Lugar: Sevilla

Autores: Laura Palacios Colón, Andrés J. Rascón, Evaristo Ballesteros

Título de la aportación: Simultaneous detection of phenolic compounds in dairy products by gas chromatography-mass spectrometry.

Nombre del congreso: XXIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica

Tipo de evento: Póster en Congreso

Ámbito: Nacional

Año: 2022

Lugar: Oviedo

Autores: Evaristo Ballesteros, Laura Palacios Colón, Andrés J. Rascón

Título de la aportación: Trace-Level Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Dairy Products Available in Spanish Supermarkets by Semi-Automated Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry Detection.

Nombre del congreso: XXIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica.

Tipo de evento: Póster en Congreso

Ámbito: Nacional

Año: 2022

Lugar: Oviedo

Autores: Laura Palacios Colón, Andrés J. Rascón, Evaristo Ballesteros

Título de la aportación: Implementación de un método sensible y rápido para la determinación de hidrocarburos policíclicos aromáticos en aceites vegetales mediante técnicas cromatográficas.

Nombre del congreso: XX Simposium Científico-Técnico de EXPOLIVA

Tipo de evento: Póster en Congreso

Ámbito: Internacional

Año: 2021

Lugar: Jaén

Autores: Andrés J. Rascón, Laura Palacios Colón, Evaristo Ballesteros

Título de la aportación: An analytical method for the simultaneous determination of different types of endocrine disrupting chemicals in dairy products by gas chromatography-mass spectrometry.

Nombre del congreso: XXII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica

Tipo de evento: Póster en Congreso

Ámbito: Nacional

Año: 2019

Lugar: Valladolid

Autores: Laura Palacios Colón, Abdelmonaim Azzouz, Andrés J. Rascón, Evaristo Ballesteros

Título de la aportación: Continuous solid phase system combined with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils

Nombre del congreso: XVI Reunión del grupo regional andaluz de la Sociedad Española de Química Analítica

Tipo de evento: Póster en Congreso

Ámbito: Nacional

Año: 2018

Lugar: Granada

Autores: Andrés J. Rascón, Laura Palacios Colón, Evaristo Ballesteros

