



FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“ESTRATEGIAS ANALÍTICAS VERDES APLICADAS A
LA DETERMINACIÓN DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS EN
MUESTRAS COMPLEJAS”**

PRESENTADA POR ROCÍO BELÉN PELLEGRINO VIDAL

DIRECTORA: DRA. GRACIELA M. ESCANDAR

CO-DIRECTORA: DRA. GABRIELA A. IBAÑEZ

ROSARIO, ARGENTINA

2017

“ESTRATEGIAS ANALÍTICAS VERDES APLICADAS A LA DETERMINACIÓN DE DISRUPTORES ENDÓCRINOS EN MUESTRAS COMPLEJAS”

ROCÍO BELÉN PELLEGRINO VIDAL
LICENCIADA EN QUÍMICA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para optar por el grado académico de Doctora en Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Rosario, y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en ésta, u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Química de Rosario, en el Departamento de Química Analítica, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre abril de 2014 y noviembre de 2017, bajo la dirección de la Dra. Graciela M. Escandar y la co-dirección de la Dra. Gabriela A. Ibañez.

a mamá y papá...

AGRADECIMIENTOS

Mis más profundos agradecimientos a Graciela, por acompañarme y guiarme en estos primeros años de mi vida profesional. Por transmitirme su conocimiento, por dar mucho, y por impulsarme a querer ser mejor todos los días.

A Alejandro, por sus consejos y enseñanzas (y los chistes bobos del almuerzo).

A mi hermana macana, Mai, por volverme loca todo el tiempo, y sin embargo, hacerse indispensable. Por acompañarme siempre y aguantarse todos mis problemas.

A Fran, que si vuelve, lo perdonamos (y si no, lo extrañamos...).

A Gabi, Juan, Ari y Ferri, por el café y las charlas de todos los días. Por ayudarme cuando estuve un poco perdida, y por la linda compañía.

A todos ellos, de nuevo, por hacerme sentir querida, y como en casa...

A Ale Glorio, Vale, y el resto de mis compañeros de laboratorio, por las charlas y los mates compartidos.

A toda mi familia. A mis padres y mis hermanos, que son mi mundo (y a quienes extraño inmensamente, siempre).

A mis amigos erasmusianos. A Juan, mi compañero y mi alegría de todos los días. A Nico, la doc y Caurito, por las risas, las comidas y las (malas) decisiones.

A mis amigos viajeros, Wally, Lucy, Lilian, Jez y Ani, que se hacen extrañar.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Pellegrino Vidal, R.B.; Ibañez, G.A.; Escandar, G.M. (2015). Spectrofluorimetric study of phenolic endocrine disruptors in cyclodextrin media. *RSC Adv.* **5**, 20914–20923.

Pellegrino Vidal, R.B.; Ibañez, G.A.; Escandar, G.M. (2015). Chemometrics-assisted cyclodextrin-enhanced excitation–emission fluorescence spectroscopy for the simultaneous green determination of bisphenol A and nonylphenol in plastics. *Talanta* **143**, 162–168.

Pellegrino Vidal, R.B.; Ibañez, G.A.; Escandar, G.M. (2016). A green method for the quantification of plastics-derived endocrine disruptors in beverages by chemometrics-assisted liquid chromatography with simultaneous diode array and fluorescent detection. *Talanta* **159**, 336–343.

Pellegrino Vidal, R.B.; Ibañez, G.A.; Escandar, G.M. (2017). Advantages of data fusion: first multivariate curve resolution analysis of fused liquid chromatographic second-order data with dual diode array-fluorescent detection. *Anal. Chem.* **89**, 3029–3035.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

Propiedades fluorescentes de disruptores endócrinos derivados del fenol en presencia de medios organizados y sus potenciales aplicaciones analíticas. Pellegrino Vidal, R.B; Ibañez, G.A.; Escandar, G.M. 3er Congreso Uruguayo de Química Analítica. Montevideo, Uruguay, 6-9/10/2014.

Determinación simultánea de bisfenol A y nonilfenol por medio del análisis multivariado de matrices excitación-emisión de fluorescencia. Pellegrino Vidal, R.B; Ibañez, G.A.; Escandar, G.M. 8º Congreso Argentino de Química Analítica. La Plata, Argentina, 2-6/11/2015.

Desarrollo de métodos analíticos verdes: cromatografía líquida asociada a análisis quimiométrico de datos de segundo orden para la determinación de compuestos de interés ambiental. Carabajal, M.D.; Pellegrino Vidal, R.B; Arancibia, J.A.; Ibañez, G.A.; Escandar, G.M. 4º Taller Argentino de Ciencias Ambientales. Capital Federal, Argentina, 18-20/05/2016.

Liquid Chromatography with multivariate detection and chemometrics data processing: a basis for green analytical methods. Pellegrino Vidal, R.B; Carabajal, M.D.; Ibañez, G.A.; Arancibia, J.A.; Escandar, G.M XVI Chemometrics in Analytical Chemistry. Barcelona, España, 6-10/06/2016.

Fusión de datos cromatográficos de segundo orden: ventajas en la cuantificación de analitos con distintas propiedades espectroscópicas.

Pellegrino Vidal, R.B; Ibañez, G.A.; Escandar, G.M. 9º Congreso Argentino de Química Analítica. Río Cuarto, Argentina, 7-10/11/2017.

ÍNDICE

1. Introducción	19
1.1 Química analítica verde	21
1.2 Disruptores endócrinos	23
1.3 DEs estudiados	25
Estrógenos	25
DEs derivados de plásticos	27
Agroquímicos	28
Hidrocarburos policíclicos aromáticos	30
1.4 Metodologías luminiscentes empleadas	31
Fundamentos de la fluorescencia molecular	31
Variables que afectan la señal fluorescente	34
Fluorescencia de DEs	40
1.5 Metodologías cromatográficas empleadas	41
Fundamentos de la cromatografía de líquidos	41
Análisis cromatográfico de DEs	44
1.6 Calibración y tratamiento de los datos	45
PARAFAC	49
U-PLS	52
N-PLS/RBL	57
MCR-ALS	58
1.7 Fusión de datos	60
1.8 Validación y Cifras de Mérito	62
Sensibilidad, Selectividad y Sensibilidad Analítica	62
Límite de Detección y Límite de Cuantificación	64
Error Cuadrático Medio de Predicción y Error Relativo de Predicción	65
Comparación de valores de concentración obtenidos con valores nominales o dados por métodos de referencia	66
2. Objetivos	69
2.1 Objetivos Generales	69
2.2 Objetivos específicos	69

3. Sección Experimental	72
3.1 Equipamiento	72
3.2 Reactivos y soluciones	73
3.3 Software	74
3.4 Estudio espectrofluorimétrico de DEs en presencia de medios organizados	75
Obtención de espectros de fluorescencia	75
Determinación de constantes de inclusión de DE en CDs	75
Efecto del pH	76
Análisis estructural de los complejos de inclusión	77
Construcción de curvas de calibración univariadas	78
3.5 Determinación simultánea de BPA y NP en envases plásticos	78
Muestras de calibración y validación	78
Muestras reales	79
Método de referencia	81
3.6 Determinación de DEs en bebidas	81
Muestras de calibración y validación	81
Muestras reales	84
Método de referencia	85
3.7 Fusión de datos cromatográficos de segundo orden: determinación de DEs en muestras de agua.	87
Análisis cromatográfico	87
Calibración y validación	88
Muestras reales	90
Tratamiento de los datos	91
Análisis de los datos	95
4. Resultados	98
4.1 Estudio espectrofluorimétrico de DEs en presencia de ciclodextrinas	98
Espectros de fluorescencia	99
Complejos de inclusión DE-CD	101
Constantes de acidez de los DE	109
Estructura de los complejos de inclusión	112
Curvas de calibración univariadas	118
Conclusiones parciales	122

4.2	Determinación simultánea de BPA y NP en envases plásticos	123
	Comportamiento fluorescente de BPA y NP	124
	Análisis cuantitativo	126
	Muestras reales	130
	Conclusiones parciales	136
4.3	Determinación de DEs en bebidas	137
	Datos cromatográficos de segundo orden	138
	Calibración y validación	141
	Muestras reales	146
	Conclusiones parciales	153
4.4	Fusión de datos cromatográficos de segundo orden: determinación de DEs en muestras de agua.	154
	Datos cromatográficos de segundo orden	155
	Sistema I	159
	Sistema II	165
	Sistema III	170
	Muestras reales	176
	Conclusiones Parciales	179
5.	Conclusiones	182
	Resumen	187
	Referencias	194

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Disruptores endócrinos estudiados	24
Tabla 2: Composición de las muestras utilizadas en la calibración y la validación	79
Tabla 3: Concentraciones de las muestras de calibración y validación	82
Tabla 4: Concentraciones de las muestras de calibrado del SI	88
Tabla 5: Concentraciones de las muestras de calibrado del SII	89
Tabla 6: Concentraciones para las muestras de calibrado del SIII	90
Tabla 7: Constantes de inclusión para los complejos DE-CD obtenidas mediante el ajuste no lineal y la ecuación de Benesi-Hildebrand	104
Tabla 8: Cocientes de los rendimientos cuánticos de los complejos y DEs libres	108
Tabla 9: Porcentaje de inclusión de los analitos en las diferentes CDs.	108
Tabla 10: Constantes de acidez (pKa) de los DE libres y formando complejos con las diferentes β -CDs	111
Tabla 11: Desplazamientos químicos en ppm de los protones de BPA libre y en la presencia de diferentes β -CDs, en DMSO	115
Tabla 12: Desplazamientos químicos (δ_H) en ppm de los protones de OP y NP libres y en la presencia de diferentes β -CDs, en DMSO	117
Tabla 13: ΔH_f de los complejos de inclusión de OP y NP en sus dos posibles modos, obtenidos a partir de cálculos semiempíricos	118
Tabla 14: Cifras de mérito para las calibraciones univariadas de BPA, OP, y NP, en ausencia y presencia de M- β -CD	120
Tabla 15: Cifras de mérito para la determinación de BPA y NP en muestras de validación mediante los algoritmos descritos	129
Tabla 16: Recuperación porcentual de BPA y NP en una muestra de plástico a diferentes niveles de concentración	131
Tabla 17: Concentraciones determinadas de BPA y NP en muestras de plásticos, mediante MEEFs-U-PLS/RBL y el método de referencia	134
Tabla 18: Cifras de mérito para la determinación de BPA y NP en muestras reales, mediante MEEFs-U-PLS/RBL	135
Tabla 19: Intervalos temporales y espectrales utilizados en el procesamiento de datos por MCR-ALS	143
Tabla 20: Cifras de mérito de los DEs estudiados en las muestras de validación	146

Tabla 21: Concentraciones de DEs en bebidas, utilizando CLAE/MCR-ALS y CG-EM	151
Tabla 22: Cifras de mérito de los DEs estudiados en las muestras reales	153
Tabla 23: Número de componentes estimados, residuos de ajuste y porcentaje de varianza explicada en los modelos obtenidos por MCR-ALS para los tres sistemas estudiados	159
Tabla 24: Concentraciones nominales y predichas por MCR-ALS de los analitos del SI en las muestras de validación	162
Tabla 25: Cifras de mérito para los analitos no fluorescentes y fluorescentes del SI , determinados por MCR-ALS a partir de los distintos datos de segundo orden, originales y fusionados	163
Tabla 26: Concentraciones nominales y predichas por MCR-ALS de los analitos del SII en las muestras de validación	168
Tabla 27: Cifras de mérito para los analitos del SII , determinados por MCR-ALS a partir de los distintos datos de segundo orden, originales y fusionados	169
Tabla 28: Concentraciones nominales y predichas por MCR-ALS de los analitos del SIII en las muestras de validación	173
Tabla 29: Cifras de mérito para los analitos no fluorescentes y fluorescentes del SIII , determinados por MCR-ALS a partir de los distintos datos de segundo orden, originales y fusionados	174
Tabla 30: Concentraciones nominales y predichas por MCR-ALS de las muestras reales (MR) adicionadas con los analitos del SIII	177

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Diagrama de Jablonski	32
Fig. 2: Vista superior y lateral de la estructura molecular de β -CD	36
Fig. 3: Estructura química de las diferentes β -CDs derivatizadas empleadas	36
Fig. 4: Tipos de arreglos de datos que se utilizan para diferentes calibraciones	47
Fig. 5: Arreglo tridimensional de datos para la aplicación de PARAFAC	50
Fig. 6: Desdoblamiento de la matriz de datos y obtención de un vector de datos sobre el que luego se aplica el modelo PLS	53
Fig. 7: Conformación de arreglos tridimensionales analizados por N-PLS	57
Fig. 8: Desdoblamiento de un arreglo tridimensional de datos en una matriz	58
Fig. 9: Reacción de silanización empleada para derivatizar a los analitos de baja volatilidad	86
Fig. 10: Metodología de pre-tratamiento y análisis de los datos de segundo orden obtenidos	94
Fig. 11: Espectros de excitación y emisión de BPA, OP, NP y blancos, en ausencia y en presencia de diferentes CDs y BRIJ 35	100
Fig. 12: Efecto de la concentración de CDs en la intensidad de la emisión fluorescente de BPA, OP y NP	102
Fig. 13: Gráficos de Benesi-Hildebrand para los complejos NP-HP- β -CD, BPA-HP- β -CD y OP-M- β -CD	103
Fig. 14: Gráficos experimentales y estimados de intensidad de fluorescencia en función del pH y λ_{em} , distribución de especies vs pH de BPA en solución acuosa y en presencia de HP- β -CD	109
Fig. 15: Gráficos experimentales y estimados de intensidad de fluorescencia en función del pH y λ_{em} , distribución de especies vs pH de OP en solución acuosa, y en presencia de M- β -CD	110
Fig. 16: Gráficos experimentales y estimados de intensidad de fluorescencia en función del pH y λ_{em} , distribución de especies vs pH de NP en solución acuosa, y en presencia de DM- β -CD	110
Fig. 17: Numeración de los protones para el estudio de ^1H -RMN	113
Fig. 18: Espectros de ^1H -RMN de los analitos en DMSO, y asignaciones de las señales presentes	114

Fig. 19: Estructura optimizada mediante cálculos AM1 para el complejo BPA-M- β -CD _____	116
Fig. 20: Estructuras optimizadas mediante cálculos AM1 para los complejos de inclusión OP-M- β -CD y NP- β -CD _____	116
Fig. 21: Curvas de calibración univariadas de los DEs en presencia y ausencia de M- β -CD _____	119
Fig. 22: Espectros de excitación-emisión de BPA, NP y señal del blanco, a 25 °C y 5 °C _____	125
Fig. 23: Espectros de excitación y emisión de fluorescencia normalizados de BPA y NP _____	125
Fig. 24: Gráfico tridimensional y de contorno de una MEEF para una muestra de calibrado _____	126
Fig. 25: Curvas de concentración nominal de los analitos vs concentración predicha para los diferentes algoritmos y sus correspondientes pruebas de la elipse _____	128
Fig. 26: Gráficos tridimensionales excitación-emisión y de contorno de las matrices de fluorescencia para una muestra de calibración y una muestra de PET _____	132
Fig. 27: Cromatogramas de DAD y DFL de una muestra sintética. Espectros normalizados de absorbancia de BPA y DEP _____	141
Fig. 28: Cromatogramas de DAD y DFL de una muestra sintética _____	143
Fig. 29: Gráficos de concentración predicha vs nominal para BPA, OP, NP, DEP, DBP y DEHP. Regiones elípticas E)CR _____	145
Fig. 30: Gráficos de contorno de DAD y DFL para una muestra de validación y dos muestras reales. _____	148
Fig. 31: Perfiles espectrales y temporales aumentados de una muestra incógnita (bebida gaseosa) y 9 muestras de calibrado de BPA, OP y NP estimados por MCR-ALS _____	149
Fig. 32: Perfiles espectrales y temporales aumentados de una muestra incógnita (bebida gaseosa) y 9 muestras de calibrado de DEP, DBP y DEHP estimados por MCR-ALS _____	150
Fig. 33: Cromatogramas DAD y DFL para el SI , y sus superficies de contorno _____	157
Fig. 34: Cromatogramas DAD y DFL para el SII , y sus superficies de contorno _____	158
Fig. 35: Cromatogramas DAD y DFL para el SIII , y respectivas superficies de contorno _____	158

Fig. 36: Cromatogramas de DAD y DFL para el SI , espectros normalizados de absorbancia y emisión de fluorescencia, y sus correspondientes superficies de contorno	160
Fig. 37: Perfiles espectrales y temporales modelados por MCR-ALS correspondientes a los datos fusionados del SI	161
Fig. 38: Elipses obtenidas utilizando CL-DAD y datos fusionados, y utilizando CL-DFL y datos fusionados en el SI	165
Fig. 39: Cromatogramas de DAD y DFL para el SII , espectros normalizados de absorbancia y emisión de fluorescencia, y sus correspondientes superficies de contorno	166
Fig. 40: Perfiles espectrales y temporales modelados por MCR-ALS para los datos fusionados del SII	167
Fig. 41: Elipses obtenidas utilizando DAD y datos fusionados, y utilizando DFL y datos fusionados en el SII	170
Fig. 42: Cromatogramas de DAD y DFL para el SIII , espectros normalizados de absorbancia y emisión de fluorescencia, y sus correspondientes superficies de contorno	171
Fig. 43: Perfiles espectrales y temporales modelados por MCR-ALS para los datos fusionados del SIII	172
Fig. 44: Elipses obtenidas utilizando DAD y datos fusionados, y utilizando DFL y datos fusionados para el SIII	176
Fig. 45: Superficies de contorno fusionadas para una muestra de calibrado y una muestra de agua de red	178
Fig. 46: Gráfica de valores predichos vs nominales para las muestras reales, obtenidos a partir de los datos de segundo orden fusionados	178
Fig. 47: Elipses obtenidas para las muestras reales, utilizando DAD y datos fusionados, y utilizando DFL y datos fusionados.	179

ABREVIATURAS

Abreviaturas	Significado
ϕ	Rendimiento cuántico de fluorescencia
β -CD	β -ciclodextrina
γ	Sensibilidad analítica
$\Delta_f H$	Entalpía de formación
λ_{abs}	Longitud de onda de absorbancia
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación
AA	Aguardiente
ACN	Acetonitrilo
AM	Agua mineral
AT	Agua tónica
BaA	Benzo[<i>a</i>]antraceno
BaP	Benzo[<i>a</i>]pireno
BbF	Benzo[<i>b</i>]fluoranteno
BghiP	Benzo[<i>ghi</i>]perileno
BPA	Bisfenol A
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
Caç	Cachaça
CBL	Carbaril
CD	Ciclodextrina
CG	Cromatografía de gases
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia

CL-DAD	Datos de segundo orden tiempo de elución-longitud de onda de absorbancia
CL-DAD-DFL	Datos de segundo orden tiempo de elución-longitud de onda de absorbancia/emisión de fluorescencia fusionados.
CL-DFL	Datos de segundo orden tiempo de elución-longitud de onda de emisión de fluorescencia
CR	Cerveza rubia
CS	Cerveza Stout
DAD	Detector de arreglo de diodos
DBA	Dibenz[<i>a,h</i>]antraceno
DBP	Dibutilftalato
DEHP	Dietilhexilftalato
DEP	Dietilftalato
DEs	Disruptores endócrinos
DFL	Detector de fluorescencia
DMP	Dimetilftalato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DM- β -CD	Dimetil- β -ciclodextrina
DTAB	Bromuro de dodeciltrimetilamonio
E2	17 β -estradiol
EAFs	Ésteres del ácido ftálico
EFS	Extracción en fase sólida
EJCR	<i>Test</i> de la región elíptica de confianza conjunta (siglas en inglés)

EM	Espectrometría de masas
FE	Fase estacionaria
FLT	Fluoranteno
FM	Fase móvil
GL	Gaseosa de lima
GRAM	Método generalizado de anulación de rango (siglas en inglés)
HE- β -CD	Hidroxietil- β -ciclodextrina
HPAs	Hidrocarburos policíclicos aromáticos
HP- β -CD	Hidroxipropil- β -ciclodextrina
HTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
HTAC	Cloruro de hexadeciltrimetilamonio
JM	Jugo de manzana
K _{ow}	Constante de reparto octanol/agua
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
MCR-ALS	Resolución multivariada de curvas acoplada a cuadrados mínimos alternantes (siglas en inglés)
MEEFs	Matrices de excitación-emisión de fluorescencia
MeOH	Metanol
MR	Método de referencia
M- β -CD	Metil- β -ciclodextrina
NAP	Naftol
NIR	Espectroscopía de infrarrojo cercano (siglas en inglés)

NOAEL	Nivel sin efecto adverso observable (siglas en inglés)
NOR	Norfluorazon
NP	4-nonilfenol
N-PLS	Cuadrados mínimos parciales multidimensionales (siglas en inglés)
OP	4-octilfenol
PARAFAC	Análisis de factores paralelos (siglas en inglés)
PCA	Análisis de componentes principales (siglas en inglés)
PE	Poliestireno
PET	Tereftalato de polietileno
PIR	Pireno
pK_a	Constante de disociación ácida
PLS	Cuadrados mínimos parciales (siglas en inglés)
PP	Polipropileno
PRESS	Suma de cuadrados del error de predicción (siglas en inglés)
PVC	Cloruro de polivinilo
QAV	Química analítica verde
RBL	Bilinealización residual (siglas en inglés)
REP	Error relativo de predicción (siglas en inglés)
RMSEP	Error cuadrático medio de predicción (siglas en inglés)
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SEL	Selectividad
SEN	Sensibilidad

SI	Sistema I
SII	Sistema II
SIII	Sistema III
SIM	Monitoreo selectivo de iones (siglas en inglés)
SML	Límite de migración específico (siglas en inglés)
SVD	Descomposición en valores singulares (siglas en inglés)
TDI	Ingesta diaria tolerable (siglas en inglés)
TMCS	Trimetilclorosilano
U-PLS	Cuadrados mínimos parciales desdoblados (siglas en inglés)
VB	Vino blanco
VT	Vino tinto



INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

Se denomina contaminante químico a una sustancia que no integra naturalmente los ecosistemas, y que al encontrarse biodisponible es capaz de producir efectos adversos en los seres vivos expuestos.¹ Son de especial interés los llamados “contaminantes emergentes”, compuestos orgánicos con posibles efectos nocivos hacia los humanos y el ambiente, cuyo vertido presenta un problema sanitario y ambiental, y que poseen una regulación legal incompleta.²

Recientemente, se han identificado en aguas residuales, ríos, e incluso en aguas potables de consumo numerosos contaminantes emergentes con actividades endócrinas u hormono-miméticas, conocidos como disruptores endócrinos (DEs).³ También se ha informado la presencia de DEs en diferentes tipos de alimentos,^{4,5} envases plásticos⁶ y muestras de orina humana,⁷ demostrando el alto grado de exposición del hombre a dichas sustancias y la fuerte necesidad de desarrollar métodos analíticos para la detección y cuantificación de DEs a niveles de vestigios en una gran variedad de matrices.⁸

Por tal motivo, en este trabajo se propusieron nuevos métodos analíticos basados en el análisis de datos multivariados de origen espectroscópico y/o cromatográfico, para la cuantificación de DEs en muestras complejas de origen ambiental, bebidas y embalajes plásticos empleados en la industria alimenticia. Los métodos propuestos se

desarrollaron respetando los principios de la química analítica verde, es decir minimizando el uso o generación de productos o reactivos peligrosos para la salud humana o el ambiente, y buscando al mismo tiempo mejorar sus propiedades analíticas básicas (exactitud, precisión, sensibilidad y selectividad).

La química verde puede aplicarse a las diferentes etapas del proceso analítico: recolección y pre-tratamiento de la muestra, adquisición de la señal analítica, y procesamiento de los datos. Sin embargo, se considera que el pre-tratamiento de las muestras es la etapa más contaminante debido al uso de solventes orgánicos para extraer y concentrar a los analitos. En particular, el análisis de muestras complejas suele requerir la aplicación de minuciosas técnicas de limpieza y eliminación de interferentes, incurriendo nuevamente en el uso de sustancias tóxicas y/o contaminantes.

En este sentido, el uso de calibración multivariada permitió plantear métodos que minimizan significativamente el tratamiento previo de las muestras, debido a una propiedad inherente de este tipo de calibraciones llamada *ventaja de segundo orden*.⁹ Esta ventaja implica la capacidad de cuantificar a los analitos de una muestra aún en presencia de sustancias interferentes no modeladas en la etapa de calibrado.

Por otro lado, y teniendo en cuenta que los principios de la química verde deben estar presentes en todas las etapas del análisis, se plantearon

diferentes estrategias asociadas a la etapa de adquisición de datos, y que serán discutidas a lo largo del presente trabajo.

1.1 Química analítica verde

El término “química verde” surgió a partir de la Ley de Prevención de Contaminación (*Pollution Prevention Act*) sancionada en 1990 en Estados Unidos con el objeto de controlar y prevenir la contaminación.¹⁰ Esta ley se enfocó en disminuir la polución generada por industrias, organismos gubernamentales y públicos, aplicando cambios en la producción, manejo y empleo de materiales tóxicos. En los primeros años, la química verde se orientó a la correcta planificación de procesos vinculados a la síntesis orgánica de nuevos productos químicos y farmacéuticos.

Con la finalidad de disminuir la contaminación del ambiente, la aplicación de los principios de la química verde se extendió a otras áreas, como la química analítica. La química analítica verde (QAV) propone como objetivo el desarrollo de métodos ecológicamente amigables, sin afectar su precisión, sensibilidad, reproducibilidad, robustez y sencillez.

En el año 1998, Anastas y Warner propusieron los doce principios de la química verde.¹⁰ A partir de ellos, en el año 2013, Gałuszka y col. postularon los doce principios de la QAV como guía para el desarrollo de métodos amigables con el ambiente.¹¹

Estos principios son:

1. Aplicar técnicas directas de análisis, siempre que sea posible, para evitar pre-tratamientos de la muestra.

2. Analizar el menor número de muestras y de menor volumen posible.
3. Realizar medidas *in-situ*.
4. Implementar métodos analíticos integrados que permitan reducir el consumo de energía y reactivos.
5. Seleccionar métodos miniaturizados y automatizados.
6. Evitar el uso de reacciones de derivatización.
7. Evitar generar grandes volúmenes de desechos, y aplicar un manejo apropiado de los desechos generados.
8. Priorizar el desarrollo de técnicas multi-analito frente a técnicas que permiten determinar un analito a la vez.
9. Minimizar el consumo de energía.
10. Priorizar el uso de reactivos de fuentes renovables.
11. Eliminar el uso de reactivos y solventes altamente tóxicos.
12. Incrementar la seguridad del operario.

En conclusión, los principales objetivos al proponer un método analítico verde son: la reducción del uso de sustancias químicas tóxicas, la minimización del consumo energético y un manejo adecuado de los desechos generados.

En la actualidad se proponen una gran variedad de estrategias para reducir la contaminación ambiental originada en las diferentes etapas del proceso analítico. Como se mencionó previamente, estas estrategias pueden focalizarse en las distintas etapas del análisis, desde la toma y

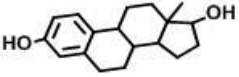
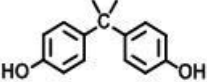
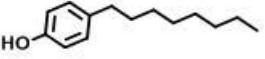
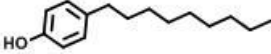
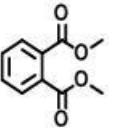
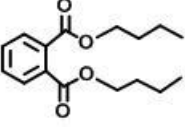
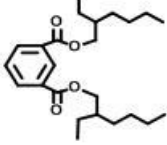
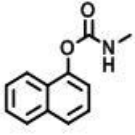
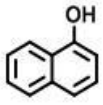
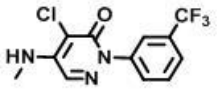
preparación de las muestras, hasta la adquisición y tratamiento de las señales analíticas.¹²

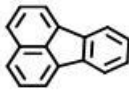
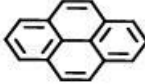
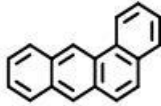
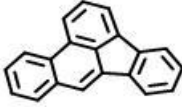
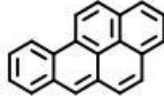
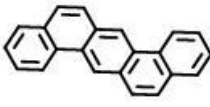

1.2 Disruptores endócrinos

Los DEs son moléculas de origen natural o artificial que afectan el funcionamiento normal del sistema endócrino de los organismos vivos, produciendo problemas neurológicos y/o reproductivos en peces y en la vida silvestre, y que también pueden afectar la fertilidad humana.¹³ Estos compuestos pueden generar efectos dañinos a muy bajas dosis, interfiriendo con la síntesis, almacenaje, transporte, acción y excreción de hormonas naturales. En general los DEs no inducen efectos tóxicos directos, sino pequeñas perturbaciones que pueden ser difíciles de detectar.¹⁴ Por este motivo, han sido designados como prioritarios por distintas agencias ambientales a nivel mundial.¹⁵

Los DEs presentes en el ambiente provienen de diferentes fuentes tales como productos farmacéuticos, productos de cuidado e higiene personal, compuestos sintéticos derivados de polímeros y plastificantes, pesticidas y otros agroquímicos, compuestos naturalmente presentes en plantas, compuestos organometálicos, productos de la combustión incompleta de materia orgánica, entre otros.¹⁶ Estos disruptores pueden clasificarse en esteroideos y no-esteroideos. En la **Tabla 1** se presentan los disruptores endocrinos investigados en este trabajo de tesis, y se detallan sus usos, fuentes, naturaleza química y estructura.

Tabla 1: Disruptores endócrinos estudiados.

Compuesto	Abreviatura	Uso/naturaleza	Estructura
<i>Estrógenos</i>			
17 β -estradiol	E2	estrógeno natural	
<i>Derivados de plásticos</i>			
Bisfenol A	BPA	aditivo fenólico	
4-Octilfenol	OP	alquilfenol	
4-Nonilfenol	NP	alquilfenol	
Di-metilftalato	DMP	éster ftálico	
Di-butilftalato	DBP	éster ftálico	
Di-etilhexilftalato	DEHP	éster ftálico	
<i>Agroquímicos</i>			
Carbaril	CBL	insecticida carbamato	
1-Naftol	NAP	activador del crecimiento vegetal	
Norfluorazon	NOR	herbicida	

Compuesto	Abreviatura	Uso/naturaleza	Estructura
<i>Hidrocarburos policíclicos aromáticos</i>			
Fluoranteno	FLT	contaminante	
Pireno	PIR	contaminante	
Benzo[<i>a</i>]antraceno	BaA	contaminante	
Benzo[<i>b</i>]fluoranteno	BbF	contaminante	
Benzo[<i>a</i>]pireno	BaP	contaminante	
Dibenz[<i>a,h</i>]antraceno	DBA	contaminante	
Benzo[<i>g,h,i</i>]perileno	BghiP	contaminante	

1.3 DEs estudiados

Estrógenos

Los estrógenos son hormonas esteroideas producidas principalmente por la mujer y sintetizadas en ovarios, cuerpo lúteo de la placenta, córtex adrenal, cerebro, testículos, hígado y tejido adiposo.¹⁷ Los estrógenos naturales (17 β -estradiol, estriol y estrona) tienen la función de regular el desarrollo, mantenimiento y actividad del sistema reproductor en ambos géneros. En las mujeres prepararan el útero para aceptar el huevo

fertilizado, y ayudar con el embarazo y la lactancia, mientras que en el sistema reproductor masculino regulan la espermatogénesis.¹⁷

El principal y más potente estrógeno presente en los seres vivos es el E2, producido primordialmente a partir de estrona. Por otra parte, existen estrógenos sintéticos que se utilizan en terapias de reemplazo hormonal, de regulación del ciclo menstrual, y en métodos anticonceptivos.¹⁸

La presencia de los estrógenos en el ambiente es de origen natural (excreción diaria humana) y antropogénica (masa manufacturada prescrita para terapias hormonales en seres humanos, ganado y animales domésticos), y representa un riesgo debido al alto potencial de persistencia en los ecosistemas, produciendo acumulación y toxicidad para una gran variedad de especies acuáticas y seres humanos.¹⁸ Efectivamente, aunque los estrógenos están presentes de forma natural en vertebrados e invertebrados, se ha identificado que cuando los seres vivos están expuestos a concentraciones de estrógenos mayores a las que un organismo produce de manera normal, se generan efectos adversos en su sistema endocrino.¹⁷ Es por ello que, en años recientes, la detección de estas hormonas en muestras ambientales en general y de aguas en particular ha recibido gran atención por parte de la comunidad científica.

Si bien en diferentes cuerpos de aguas se han registrado concentraciones de E2 relativamente altas (100–451 ng L⁻¹) generalmente se lo detecta a niveles de vestigios (concentraciones menores a 20 ng L⁻¹) requiriéndose de métodos extremadamente sensibles para su detección.¹⁸

DEs derivados de plásticos

Algunos de los analitos estudiados en el presente trabajo se encuentran dentro del grupo de los disruptores no-esteroides: BPA, OP, NP, DMP, DEP, DBP y DEHP. Estos compuestos son derivados de plásticos y sus usos se detallan a continuación. BPA es un derivado químico muy utilizado en la manufactura de polímeros policarbonatos y resinas epoxy.¹⁹ En la industria alimenticia se lo emplea en la fabricación de empaques, botellas plásticas y cubiertas internas protectoras en envases de lata. Por otro lado, NP y OP son importantes precursores en la fabricación de surfactantes no iónicos, detergentes hogareños y pesticidas. Además, el NP es uno de los principales productos de degradación de los alquilfenol etoxilatos empleados en la producción de plásticos.²⁰

Por otro lado, los ésteres del ácido ftálico o EAFs, entre ellos DMP, DEP, DBP y DEHP, se utilizan en general como plastificantes en la producción de polietileno, cloruro de polivinilo y otros materiales sintéticos.²¹ Debido a que no se encuentran covalentemente unidos a estas matrices plásticas, pueden transferirse al ambiente, o migrar desde envases a alimentos o bebidas.⁴

Estos DEs se caracterizan por mostrar propiedades hidrofóbicas y una baja solubilidad en agua debido a que poseen anillos aromáticos y cadenas alquílicas en sus estructuras.

En los últimos años se han realizado numerosos estudios sobre exposición de la población humana a DEs derivados de plásticos,

encontrándose una alarmante y creciente presencia de estos compuestos en el ambiente y en matrices biológicas de origen humano.^{22,23} Si bien las vías de exposición son variadas, se considera que la ingesta de alimentos contaminados es una de las rutas predominantes.²⁴ Por otro lado, se conoce que la presencia de estas sustancias en bebidas y alimentos no sólo representa un riesgo a la salud, sino que también impacta en la calidad de los productos, debido a que son una fuente de carbono para microorganismos que pueden afectar el sabor y olor de los alimentos.²⁵ Es por esto que es importante desarrollar métodos analíticos para la cuantificación de DEs, principalmente en alimentos y bebidas.

Agroquímicos

Se denomina agroquímico a toda sustancia química utilizada en agricultura, ya sean pesticidas o fertilizantes. Un pesticida o plaguicida es un compuesto o mezcla de compuestos, naturales o sintéticos, formulados para prevenir, destruir, o mitigar cualquier tipo de plaga. Por otro lado, los fertilizantes son sustancias de origen animal, mineral, vegetal o sintético, utilizados para enriquecer y mejorar características físicas, químicas y biológicas del suelo y los cultivos.²⁶

Los agroquímicos pueden clasificarse de acuerdo a su acción, su naturaleza química, o su toxicidad. Es decir, se los puede clasificar de acuerdo al tipo de organismo que controlan, en: herbicidas (destruyen

malezas y otras plantas no deseadas), insecticidas (eliminan insectos y otros artrópodos), fungicidas (accionan contra hongos), etc.

También es frecuente clasificarlos de acuerdo a sus estructuras y a la familia química a la que pertenecen (ej: insecticidas organoclorados, organofosforados, herbicidas derivados de la urea, etc.)

Por otra parte, cuando se considera la toxicidad de un agroquímico, se evalúa el riesgo que implica para la salud humana, ya sea por inhalación, ingestión o penetración cutánea.²⁷ Las denominaciones utilizadas en la clasificación en base a la toxicidad varían con los organismos que la formulan, siendo la más utilizada la realizada por la Organización Mundial de la Salud.²⁸

Si bien el uso de agroquímicos está fuertemente vinculado con avances significativos en los rendimientos de las cosechas, existen una serie de aspectos negativos a tener en cuenta, derivados principalmente del mal uso o falta de regulación en su aplicación, como la gran resistencia que han desarrollado ciertos organismos hacia determinados plaguicidas, y los efectos nocivos a la salud humana y al ambiente. El contacto con estas sustancias activas se considera altamente peligroso dado que mientras que a corto plazo pueden causar daños menores como dolor de cabeza y náuseas, la exposición en períodos prolongados puede ocasionar problemas reproductivos, alteraciones endócrinas y hasta cáncer.²⁷

Hidrocarburos policíclicos aromáticos

Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPAs) son moléculas constituidas por anillos aromáticos fusionados, sin contener heteroátomos ni sustituyentes. Resultan de la combustión incompleta de la materia orgánica, y se encuentran ubicuamente distribuidos en el ambiente. Si bien existen fuentes naturales de HPAs, la actividad humana es el principal origen de estos contaminantes.

Los HPAs se clasifican en livianos y pesados, de acuerdo al número de anillos conjugados que poseen. Se consideran livianos aquellos que poseen como máximo tres anillos fusionados, mostrando una constante de reparto octanol-agua (K_{ow}) de entre 5 y 3, mientras que si en su estructura poseen cuatro o más anillos aromáticos se los denomina HPAs pesados (tienen una K_{ow} y un peso molecular mayores a 5 y 300 Da, respectivamente).²⁹

Los HPAs, y en particular los HPAs pesados, representan un gran riesgo a la salud humana debido a sus efectos carcinogénicos.^{30, 31} Además, recientemente se ha demostrado que algunos de estos compuestos actúan como disruptores endócrinos.³² Es por esto que se considera de extrema importancia mantener un control estricto de la presencia de HPAs pesados en el ambiente. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) incluye a dieciséis HPAs en la lista de contaminantes prioritarios,³³ clasificando a seis de estos compuestos como posibles carcinógenos (entre ellos BaA, BbF y DBA).³⁴ Dentro de este grupo, el BaP se encuentra catalogado como el principal agente cancerígeno y se utiliza

como indicador de la presencia de otros HPAs en diferentes matrices como agua, aire y productos alimenticios.³⁵

1.4 Metodologías luminiscentes empleadas

Fundamentos de la fluorescencia molecular

Cuando una molécula se irradia con un haz de luz de una determinada longitud de onda (λ_{ex}), los electrones de la molécula pueden absorber esa radiación electromagnética y como consecuencia pasar de un nivel electrónico de menor energía (S_0) a un estado de mayor energía (S_1 o S_2).³⁶ Para que se produzca dicha absorción, el fotón debe poseer la misma energía que la diferencia energética que existe entre el estado fundamental S_0 y uno de los estados excitados de la molécula absorbente.

En la **Fig. 1** se representa el diagrama de niveles de energía parcial para una molécula fotoluminiscente (diagrama de Jablonski), donde se muestran los mecanismos por los cuales la molécula excitada regresa a su estado basal.

La línea horizontal más baja representa el nivel de menor energía (S_0), mientras que las líneas superiores, S_1 , S_2 y T_1 , representan el primer y segundo estado excitado singlete y primer estado excitado triplete, respectivamente, siendo la energía del estado triplete (T_1) menor que la del singlete excitado (S_1).

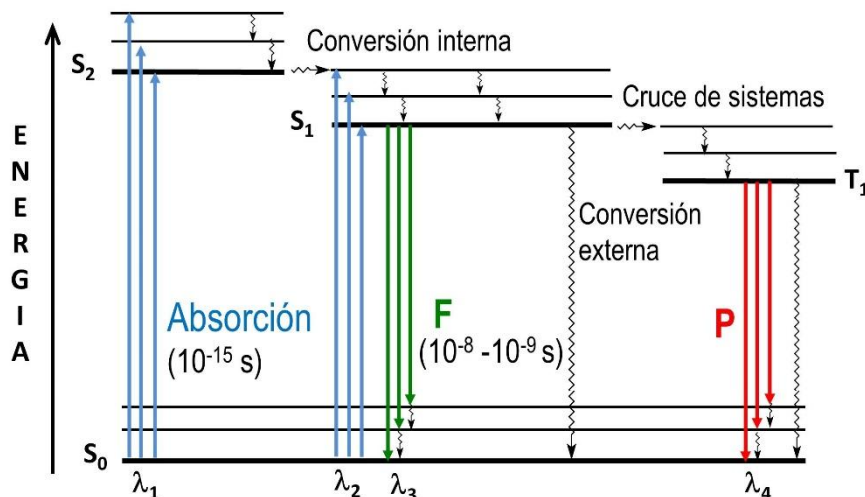


Fig. 1: Diagrama de Jablonski. En verde la emisión correspondiente a la fluorescencia y en rojo la correspondiente a la fosforescencia.

Si bien el proceso de absorción de energía por parte de la molécula es extremadamente rápido (aproximadamente 10^{-15} s), la secuencia de los procesos de desactivación suelen ser más lentos. Los procesos de desactivación se clasifican en radiantes (fluorescencia y fosforescencia) y no radiantes (relajación vibracional, conversión interna y externa y entrecruzamiento de sistemas). El camino más probable hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida media del estado excitado. Por ello, si la desactivación por fotoluminiscencia (fluorescencia o fosforescencia) es más rápida que los procesos no radiantes, se observará tal emisión. Por el contrario, si la desactivación no radiante tiene una constante de velocidad más favorable, el fenómeno fotoluminiscente no se producirá o será poco intenso.

Dado que la fosforescencia es un proceso cuánticamente prohibido por una de las reglas de selección (cambio en la multiplicidad del spin), es menos probable y tiene un tiempo de vida más largo que la fluorescencia.

Teniendo en cuenta que a bajas concentraciones la intensidad de la luminiscencia es, por lo general, proporcional a la concentración del fluoróforo, ambos fenómenos luminiscentes se emplean frecuentemente con fines analíticos. Específicamente, los métodos analíticos basados en fluorescencia resultan altamente sensibles, sencillos y de bajo costo. Existen diferentes modos de adquirir las señales fluorescentes de un sistema, dando lugar a métodos fluorescentes que se aplican en distintas áreas de la ciencia con propósitos variados.

Desde el punto de vista de la química analítica, las señales más utilizadas son las provenientes de fluorescencia directa y sincrónica. Recientemente, con el progreso y difusión de las herramientas quimiométricas, se están utilizando con mayor asiduidad datos de segundo orden originados por matrices de excitación-emisión de fluorescencia (MEEFs). También cobran importancia datos de segundo orden provenientes del análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) acoplada a detección fluorescente, dando lugar a matrices del tipo tiempo de elución-longitud de onda de emisión de fluorescencia, o CL-DFL.

Cabe destacar que la calidad de la señal fluorescente puede afectarse positiva o negativamente con la modificación de diferentes variables. Entre ellas se encuentran: la naturaleza del compuesto a estudiar, el pH, el solvente, la temperatura y la presencia de medios organizados. A continuación se efectuará una breve descripción de dichas variables y su influencia en la señal medida.

Variables que afectan la señal fluorescente

Efecto del pH: Si una molécula posee un grupo ionizable, sus propiedades luminiscentes posiblemente dependan del valor del pH del medio. Algunos de los analitos estudiados poseen grupos hidroxilos capaces de ionizarse, pudiendo presentar variaciones en la fluorescencia según el valor del pH de la solución en el que se encuentran. Por lo tanto, el estudio del comportamiento ácido-base de los compuestos, incluyendo la determinación de los valores de pK_a , permite establecer las condiciones experimentales que brindan las mayores intensidades de fluorescencia.

Es importante tener en cuenta que si la medición experimental del valor de pK_a se realiza a través de una titulación espectrofluorimétrica, el valor determinado corresponderá al pK_a del estado excitado. Sin embargo, si el equilibrio de deprotonación se alcanza rápidamente, el valor de pK_a medido será igual al del estado fundamental.

Efecto de la temperatura: El aumento de la temperatura genera un incremento de la energía cinética, y un mayor movimiento molecular, aumentando la frecuencia de las colisiones y favoreciendo la desactivación del fluoróforo excitado por medio de procesos no radiantes. Es por esto que, para muchas moléculas, la eficacia cuántica de la fluorescencia disminuye con el aumento de la temperatura. Además, al incrementar la temperatura, se produce una disminución en la viscosidad del disolvente,

que también aumenta la probabilidad de conversión externa, generando el mismo resultado.

Fluorescencia en medios organizados: Las ciclodextrinas (CDs) son oligosacáridos cíclicos formados por varias unidades de glucosa, unidas mediante enlaces α -D-(1,4), lo que da lugar a una estructura molecular toroidal, rígida y con una cavidad interior de volumen específico (**Fig. 2**).³⁷ Los grupos hidroxilos primarios en posición seis se localizan en la abertura más estrecha de la cavidad del toroide, mientras que los grupos hidroxilos secundarios forman la abertura más ancha. La sustitución de dichos grupos con diferentes radicales confiere a las CDs diferentes propiedades. La disposición de los restos glucosídicos que forman la estructura de las CDs le otorgan una cierta polaridad externa (solubilidad en agua) y una cavidad interna apolar, con la posibilidad de formar complejos mediante la inclusión de moléculas hidrofóbicas.³⁷

Otra característica importante de las CDs es el número de unidades de glucosa que las conforman, ya que determina el tamaño de su cavidad hidrofóbica y la posibilidad de que un analito de dimensión adecuada ingrese en dicha cavidad. Las CDs nativas más empleadas en la formación de complejos de inclusión son la α -CD, β -CD y γ -CD, constituidas por seis, siete y ocho anillos de glucopiranososa, respectivamente.

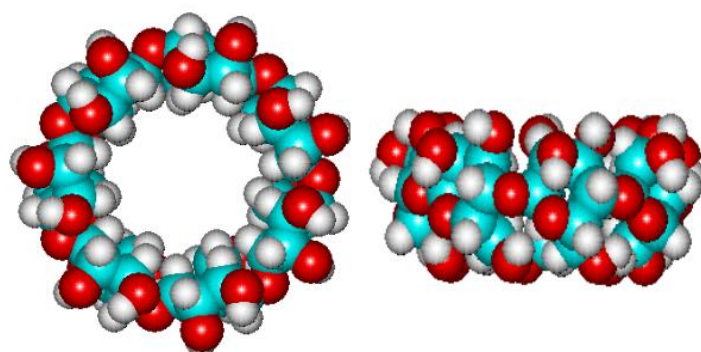
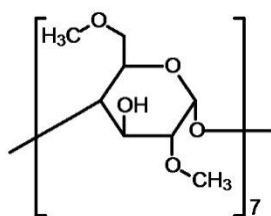
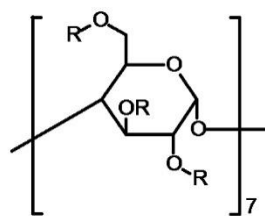


Fig. 2: Vista superior (izq.) y lateral (der.) de la estructura molecular de β -CD.

Por otro lado, actualmente se encuentran disponibles en el mercado CDs derivatizadas con sustituyentes de variada naturaleza. Los diferentes sustituyentes empleados permiten aumentar la solubilidad de una CD, modificar su volumen e hidrofobicidad y mejorar o limitar su capacidad de interaccionar con un analito dado. En la **Fig. 3** se ilustran las CDs derivatizadas estudiadas en el presente trabajo de tesis.



2,6-di-O-metil - β -CD



2-Hidroxi-etil- β -CD (R = H o $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)

2-Hidroxi-propil- β -CD (R = H o $\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$)

Metil- β -CD (R = H o CH_3)

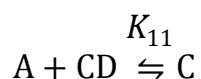
Fig. 3: Estructura química de las diferentes β -CDs derivatizadas empleadas.

La formación de complejos de inclusión con CDs permite en muchos casos mejorar la señal fluorescente de diferentes compuestos.³⁸ Estos complejos favorecen la luminiscencia del analito, ya que, por un lado lo protegen de procesos de desactivación no radiante, y por otro, lo confinan

a un ambiente reducido, confiriéndole rigidez. Una alternativa similar para proteger a los analitos de procesos competitivos con la fluorescencia la formación de medios micelares a partir de surfactantes.³⁹

Las propiedades químicas y estructurales de los DEs (baja polaridad, presencia de anillos aromáticos, tamaño) favorecen su interacción con gran variedad de derivados de CDs, para formar complejos de inclusión.

Para complejos con estequiometría 1:1, la reacción química que describe el equilibrio de formación es:



donde K_{11} es la constante de inclusión del analito A en la CD, para dar el complejo C. Esta constante puede expresarse como:

$$K_{11} = \frac{[C]}{[A]_L[CD]} \quad \text{Ec. 1}$$

siendo [C], [CD] y $[A]_L$ las concentraciones molares de complejo, CD y analito libre, respectivamente.

En ausencia de CD, la fluorescencia inicial del sistema (F_0) está dada por:

$$F_0 = b \phi_A C_A \quad \text{Ec. 2}$$

donde b es una constante de proporcionalidad, ϕ_A es el rendimiento cuántico del analito, y C_A su concentración analítica.

Al formarse el complejo, la intensidad de la fluorescencia se modifica según:

$$F = b (\phi_A [A]_L + \phi_C [C]) \quad \text{Ec. 3}$$

siendo ϕ_C el rendimiento cuántico del complejo de inclusión.

Si bien el balance de masas para el analito es:

$$C_A = [A]_L + [C] \quad \text{Ec. 4}$$

cuando trabajamos con un importante exceso de CD, la expresión anterior puede simplificarse como:

$$C_A \approx [C] \quad \text{Ec. 5}$$

De esta forma, la **Ec. 2** se reduce a:

$$F_0 = b \phi_A ([A]_L + [C]) \quad \text{Ec. 6}$$

Al despejar la concentración de complejo [C] en la **Ec. 1**, y reemplazar en las **Ec. 2** y **6**, se obtiene:

$$F = b[A]_L (\phi_A + \phi_C K_{11} [CD]) \quad \text{Ec. 7}$$

$$F_0 = b\phi_A [A]_L (1 + K_{11} [CD]) \quad \text{Ec. 8}$$

Dividiendo miembro a miembro las **Ec. 7** y **8**, y reordenando la expresión,

$$\frac{F}{F_0} = \frac{\phi_A + \phi_C K_{11} [CD]}{\phi_A (1 + K_{11} [CD])} \quad \text{Ec. 9}$$

Finalmente, al dividir ambos miembros por ϕ_A , se obtiene la siguiente expresión:⁴⁰

$$\frac{F}{F_0} = \frac{1 + \frac{\phi_C}{\phi_A} K_{11} [CD]}{1 + K_{11} [CD]} \quad \text{Ec. 10}$$

El ajuste no lineal de datos experimentales utilizando la **Ec. 10** permite obtener la constante de inclusión y la relación ϕ_C/ϕ_A .

A partir de las mismas expresiones iniciales (**Ec. 3 y 6**), es posible obtener una función lineal que relaciona la fluorescencia con la inversa de la concentración de CD, llamada ecuación de Benesi-Hildebrand:⁴¹

$$\frac{F}{\Delta F} = \frac{\phi_A}{\left(\varepsilon_C/\varepsilon_A\right)\phi_C - \phi_A} + \frac{\phi_A}{\left[\left(\varepsilon_C/\varepsilon_A\right)\phi_C - \phi_A\right]} \frac{1}{K_{11}[\text{CD}]} \quad \text{Ec. 11}$$

donde ε_C y ε_A son las absorptividades molares del complejo y de A libre, respectivamente, y ΔF se calcula como $F_0 - F$.

Cuando se forman los complejos de estequiometría 1:2, ninguna de las ecuaciones formuladas anteriormente permite describir correctamente el sistema.

El equilibrio que detalla la formación de complejos 1:2 de la forma A- CD_2 es el siguiente:



En este caso, es posible obtener una expresión que represente la variación de la fluorescencia, y permita determinar las constantes de equilibrio involucradas:⁴²

$$\frac{F}{F_0} = \frac{1 + (\phi_C/\phi_A)K_{11}[\text{CD}]}{1 + K_{11}[\text{CD}] + K_{12}[\text{CD}]^2} \quad \text{Ec. 12}$$

Para poder aplicar las expresiones obtenidas (**Ec. 10, 11 y 12**) al cálculo de las constantes K_{11} y K_{12} deben cumplirse las siguientes consideraciones:

- La CD debe encontrarse en gran exceso con respecto a la concentración del analito, de manera que la diferencia entre la concentración de CD libre y la analítica sea despreciable.
- La variación en la intensidad de la fluorescencia debe ser proporcional a la concentración de complejo formado.
- A alta concentración de CD, todas las moléculas de analito deben estar complejadas.
- Los coeficientes de extinción molar del analito libre y complejado, a la longitud de onda de excitación utilizada, deben ser iguales.

Fluorescencia de DEs

Los DEs estudiados en esta tesis son de diversa naturaleza química, y entre ellos se encuentran compuestos altamente fluorescentes, como CBL y NAP, otros cuya intensidad de fluorescencia es moderada-alta únicamente en medios orgánicos, como los DEs fenólicos, y compuestos que no presentan fluorescencia nativa, como los EAFs. Una de las estrategias verdes aplicadas en trabajos de la literatura para mejorar las señales fluorescentes de un analito es el uso de medios organizados, como se mencionó en la pág. 35. En este sentido, las CDs se han empleado con esta finalidad en la determinación de HPAs,⁴³ y de xenoestrógenos sintéticos y naturales,⁴⁴ entre otros DEs. En la bibliografía se encuentran algunos

estudios sobre el incremento de la señal fluorescente de BPA en presencia de β -CD y su empleo en el desarrollo de técnicas para la cuantificación de este DE.^{45,46} Sin embargo, los complejos de inclusión de BPA, NP y OP en solución acuosa no han sido investigados exhaustivamente. Teniendo en cuenta la baja señal fluorescente de BPA, OP y NP en medio acuoso, en una primera etapa de esta tesis se realizó un estudio sobre sus propiedades espectrofluorimétricas en presencia de CDs. Posteriormente, la exaltación de la señal fluorescente generada en los medios organizados empleados se combinó con calibración multivariada para la determinación de BPA y NP en muestras de plásticos.

1.5 Metodologías cromatográficas empleadas

Fundamentos de la cromatografía de líquidos

La cromatografía líquida de alta eficiencia es un método separativo ampliamente utilizado en el análisis de muestras complejas. Es una técnica altamente versátil, cuya selectividad y sensibilidad dependen del detector empleado. En esta técnica, un solvente o mezcla de solventes (fase móvil, FM) circula dentro de una columna cromatográfica, en contacto con un sólido u otro líquido inmisible (fase estacionaria, FE). Al inyectar una mezcla de analitos en la columna, cada analito avanzará a lo largo del sistema con una velocidad diferente, que dependerá de su afinidad por cada una de las fases. De esta forma, cada una de las sustancias

introducidas en el sistema eluirá con un tiempo diferente, lográndose su separación.³⁶

Dentro de la cromatografía de líquidos se distinguen diferentes modalidades, caracterizadas principalmente por el mecanismo fisicoquímico en que se basa la separación. En general, la técnica más utilizada es CLAE en fase reversa, siendo el mecanismo retentivo dominante el reparto de los analitos entre un disolvente relativamente polar (usualmente mezclas acetonitrilo:agua, o metanol:agua) y una FE apolar. Una de las FEs más comunes de este tipo de cromatografía son los empaques de siloxano de fase ligada con cadenas carbonadas de 18 u 8 carbonos, llamadas C18 y C8, respectivamente.

Debido a la polaridad de la FM y la FE, las moléculas de naturaleza apolar permanecen más tiempo dentro de la columna, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente. Por este motivo, el tiempo de retención disminuye con el aumento de contenido de solvente orgánico de la FM. En el caso de un analito ionizable, el grado de ionización en que se encuentre determina su tiempo de elución, por lo que en dichos casos la FM suele contener un regulador de pH. Además, las constantes de reparto de los analitos dependen de la temperatura, afectando su tiempo de retención, por lo que normalmente se recomienda el uso de compartimentos termostatizadores de columna.

Cabe destacar que si bien la cromatografía líquida es la técnica separativa de preferencia para el análisis de muestras complejas, presenta

dos grandes desventajas que se contraponen con los principios de la QAV. Por un lado, suele requerir de laboriosas etapas de pre-concentración y limpieza de la muestra, comúnmente llevadas a cabo mediante extracciones líquido-líquido,⁴⁷ o extracciones en fase sólida (EFS).⁴⁸ Es frecuente también que estos pre-tratamientos involucren el uso de grandes volúmenes de solventes orgánicos, resultando en métodos costosos y poco amigables con el ambiente.

Por otro lado, es usual que la resolución completa de los analitos estudiados sólo se logre con largos tiempos de análisis y/o la implementación de gradientes de elución, llevando nuevamente a un elevado consumo de solventes tóxicos. Sin embargo, existen herramientas quimiométricas que, acopladas al análisis cromatográfico, permiten superar estas limitaciones y proponer métodos enmarcados dentro de la QAV. El empleo de calibraciones de segundo orden aplicadas a datos CL-DFL y tiempo de elución-longitud de onda de absorbancia (CL-DAD) posibilita cuantificar analitos parcialmente resueltos, acortando drásticamente los tiempos de análisis instrumental y consumo de solventes durante la adquisición de los datos. A su vez, esta misma estrategia conlleva una significativa reducción del tratamiento previo de las muestras ya que, gracias a la *ventaja de segundo orden* (pág. 47), no es necesario eliminar a los potenciales interferentes presentes en las matrices analizadas.

Análisis cromatográfico de DEs

Si bien existen numerosos métodos analíticos destinados a la determinación de DEs en diferentes matrices, entre ellos: métodos electroquímicos,⁴⁹ espectroscópicos,⁵⁰ colorimétricos⁵¹ y biosensores,⁵² las técnicas más usadas son CLAE con detección por arreglo de diodos (DAD) o espectrometría de masas (EM),^{53,54} o cromatografía de gases (CG), también acoplada a EM.⁵⁵⁻⁵⁸ Cabe notar que la determinación de algunos DEs derivados de plastificantes por CG, entre ellos BPA, OP y NP, requiere una etapa previa de derivatización de las muestras, debido a la baja volatilidad de estos compuestos.⁵⁶ Esta misma limitación se hace evidente para algunos DEs clasificados como agroquímicos. Finalmente, en lo que respecta al análisis de HPAs por CG, si bien es viable sin necesidad de una derivatización previa de los compuestos, la baja volatilidad de los HPAs pesados requiere de la aplicación de rampas de temperatura, alcanzando valores de hasta 350 °C, y largos tiempos de análisis.⁵⁹ Por otro lado, la sensibilidad de CG-EM para el análisis de compuestos de elevado peso molar es relativamente baja.⁶⁰

Teniendo en cuenta las desventajas detalladas en el párrafo anterior, en este estudio se decidió emplear CLAE acoplada a calibración de segundo orden para la determinación simultánea de DEs en diferentes muestras complejas. Como se mencionó en la sección anterior (pág. 47), el uso de calibración de segundo orden permite reducir significativamente el consumo de solventes tóxicos en las dos etapas más contaminantes del

análisis (pre-tratamiento de las muestras y adquisición de los datos). Por tal motivo, esta estrategia se aplicó al análisis de DEs derivados de plásticos en muestras de bebidas envasadas en recipientes plásticos o que tuvieron contacto con este tipo de materiales durante el proceso de elaboración. Además, se empleó detección por DAD y DFL en simultáneo, de manera de poder detectar a cada analito por medio de su señal más conveniente.

Posteriormente, la misma estrategia se empleó para el análisis de sistemas experimentales modelo constituidos por diferentes DEs, algunos de los cuales presentan propiedades fluorescentes. En este caso se propuso emplear a los detectores DAD y DFL simultáneamente y fusionar estos datos de segundo orden, de manera de poder mejorar la sensibilidad y selectividad de las calibraciones construidas.

1.6 Calibración y tratamiento de los datos

La calibración es una etapa muy importante del desarrollo de un método cuantitativo, ya que determina la relación entre la respuesta analítica y la concentración del analito. Uno de los métodos de calibrado más ampliamente empleados es la construcción de curvas de calibración univariadas, o de orden cero, en las cuales se registra un dato puntual, o sensor, para cada muestra de calibrado. Estos datos se emplean posteriormente para construir una recta que relacione el parámetro instrumental medido con la concentración del analito, mediante un ajuste de mínimos cuadrados. Es importante tener en cuenta que la calibración

univariada es aplicable siempre y cuando se verifique que la respuesta medida es atribuible únicamente al analito de interés.

Sin embargo, como se ha mencionado previamente, las muestras complejas suelen presentar interferencias que no permiten la cuantificación de los analitos empleando una calibración univariada a menos que se recurra a pre-tratamientos de extracción y limpieza.

Una alternativa útil y “verde” es introducir métodos de procesamiento de información que permiten aislar matemáticamente y de manera eficiente la contribución del analito de la señal total. La quimiometría moderna ha desarrollado, para estos propósitos, métodos de análisis capaces de procesar datos instrumentales de gran complejidad.⁶¹

En calibración multivariada se emplean señales instrumentales utilizando más de una variable predictora (sensor) para la determinación simultánea de analitos con señales solapadas, aún en presencia de interferentes. La calibración multivariada se puede aplicar a datos de primer, segundo y tercer orden, u órdenes superiores,⁶² es decir, arreglos de vectores, matrices u arreglos de cuatro vías, respectivamente, como se muestra en la **Fig. 4**.

El uso de calibración multivariada permite:

- Determinar simultáneamente varios analitos con mayor selectividad, ya que cada nuevo modo de los datos aporta un grado adicional de selectividad parcial.

- Detectar datos rechazables (*outliers*).

- Mejorar la sensibilidad, debido a que se promedia el ruido instrumental en la gran cantidad de datos medidos.

- Cuantificar analitos calibrados en presencia de interferentes no modelados en la etapa de calibración. Esta propiedad, llamada *ventaja de segundo orden*, implica que después de obtener datos de tres o más vías para muestras de analitos puros, sus concentraciones podrán ser determinadas en cualquier muestra futura, sin importar su complejidad, o cuántos interferentes posea.⁹

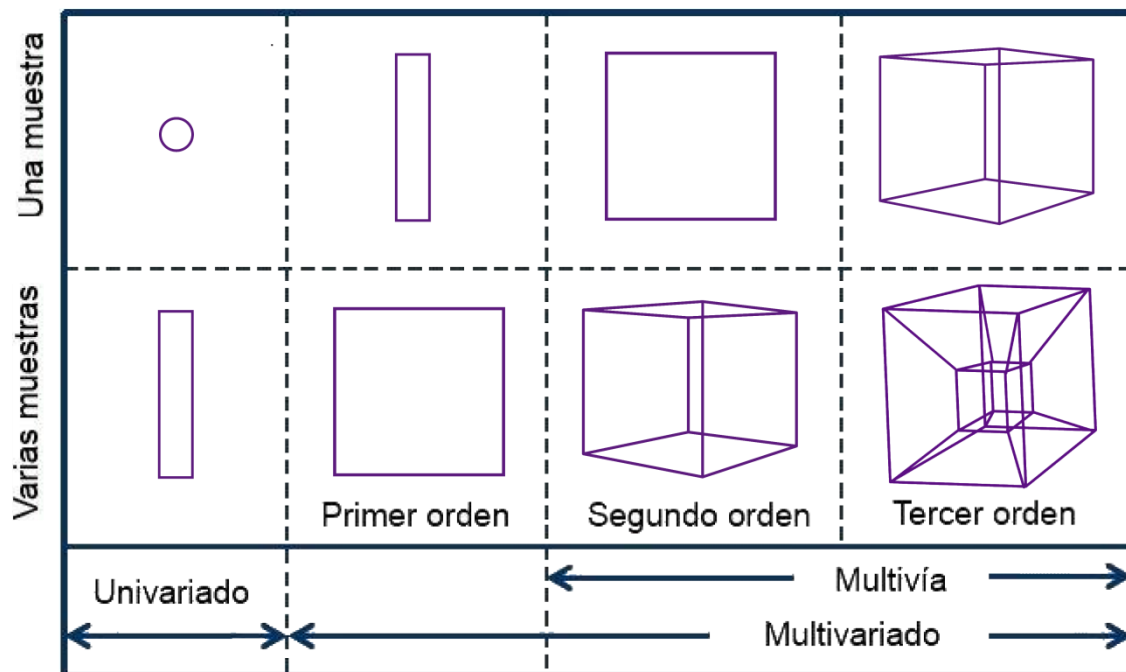


Fig. 4: Tipos de arreglos de datos que se utilizan para diferentes calibraciones.

La construcción y aplicación de calibraciones multivariadas consiste en tres etapas fundamentales:

Calibrado: En esta etapa se analizan una serie de muestras de concentración perfectamente conocida de los analitos. Los datos

multidimensionales registrados se emplean para construir un modelo predictivo.

Validación: Se analizan una serie de muestras sintéticas de concentración conocida de los analitos, diferentes a las pertenecientes al conjunto de muestras de calibrado. Se emplea el modelo construido en la etapa previa para predecir las concentraciones del conjunto de muestras de validación. Se realiza una comparación estadística de los valores nominales y predichos de dichas concentraciones para determinar si la calibración construida es suficientemente exacta y precisa.

Predicción de las muestras: Una vez validado el método, se lo puede emplear para cuantificar a los analitos calibrados en muestras reales o sintéticas de concentraciones desconocidas.

En la presente tesis se emplearon modelos de calibrado de segundo orden. Como se explicó anteriormente, los datos analizados constan de matrices de excitación-emisión de luminiscencia o matrices cromatográficas con detección espectral (ya sea UV-visible o luminiscente), que constituyen arreglos de I matrices de dimensiones $J \times K$, siendo I el número de muestras analizadas y J y K el número de sensores registrados en los dos modos instrumentales.

Cabe destacar que el procesamiento de datos de segundo orden requiere de algoritmos avanzados. Si los datos son trilineales, es decir que cada especie química se define en las diferentes matrices de datos por el

mismo perfil espectral y de concentración, se pueden aplicar algoritmos trilineales, como PARAFAC (análisis paralelo de factores),⁶³ o métodos basados en variables latentes como U-PLS (cuadrados mínimos parciales desdoblados) y N-PLS (cuadrados mínimos parciales multidimensionales).

Sin embargo, los datos de origen cromatográfico suelen mostrar corrimientos en los perfiles temporales, por lo que se los considera datos no trilineales.⁶⁴ En ese caso, el uso de los algoritmos antes mencionados requiere de un alineamiento previo de los perfiles temporales mediante un *software* adecuado.⁶⁵ Es importante destacar que el proceso de alineación es generalmente complejo y no siempre da buenos resultados en presencia de interferentes.⁶⁶ Una opción más conveniente es la aplicación del algoritmo MCR-ALS (resolución multivariada de curvas acoplada a cuadrados mínimos alternantes), que desdobra los datos obteniendo una matriz aumentada, de manera de preservar la bilinealidad.⁶⁷

A continuación se expondrán en forma sucinta los fundamentos de cada uno de los algoritmos empleados en la presente tesis.

PARAFAC

En PARAFAC, los datos de segundo orden de las I_{cal} matrices de calibración, cada uno de los cuales conforma una matriz ($\mathbf{X}_{i,\text{cal}}$) de dimensiones $J \times K$, y la matriz de la muestra desconocida \mathbf{X}_u se utilizan para formar un arreglo tridimensional \mathbf{X} , de tamaño $[(I_{\text{cal}}+1) \times J \times K]$.

En la **Fig. 5** se muestra el armado de un arreglo de matrices para ser analizado con PARAFAC de tres vías.

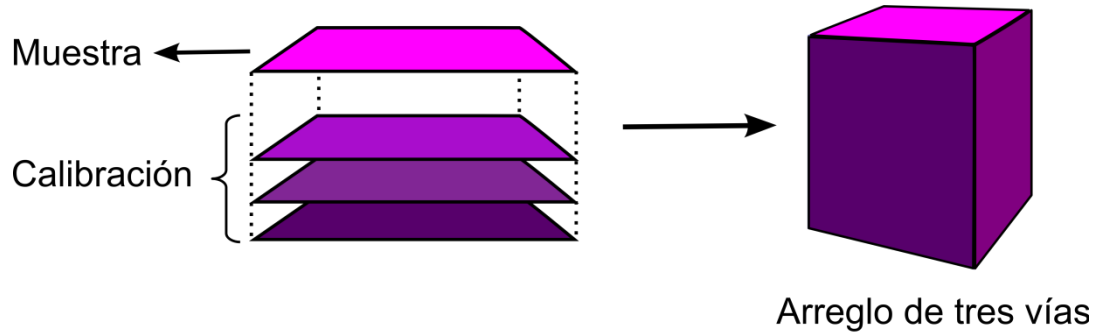


Fig. 5: Arreglo tridimensional de datos para la aplicación de PARAFAC.

Si el arreglo \mathbf{X} es trilineal, puede escribirse en términos de tres vectores para cada uno de los componentes (a_n , b_n , y c_n) que contienen información de las concentraciones relativas para el componente n , así como sus perfiles en ambos modos de datos. El modelo PARAFAC puede expresarse como:⁶⁸

$$X_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} + E_{ijk} \quad \text{Ec. 13}$$

donde N es el número total de componentes (que contribuyen a la señal), a_{in} es la concentración relativa del componente n en la i -ésima muestra, y b_{jn} y c_{kn} las intensidades en los canales j y k respectivamente. Los valores de a_{in} se almacenan en la matriz de *scores* \mathbf{A} , mientras que b_{jn} y c_{kn} en las matrices de *loadings* \mathbf{B} y \mathbf{C} (las columnas de estas últimas dos matrices se normalizan a la unidad).

La deconvolución de \mathbf{X} por medio de la **Ec. 13**, en general mediante el uso de técnicas de minimización de los cuadrados de los residuos,⁶⁹

permite obtener los perfiles en las dimensiones **B** y **C**, y calcular las concentraciones, empleando **A**, de los componentes en la muestra de *test* sin importar su composición.

Al aplicar el modelo PARAFAC, hay algunas consideraciones que tener en cuenta:

Iniciación del algoritmo: Existen diferentes estrategias para abordar este paso, entre ellas el uso de vectores GRAM (método generalizado de anulación de rango),⁷⁰ la obtención de perfiles espectrales de los analitos puros o *loadings* que dan el mejor ajuste luego de un pequeño número de corridas de PARAFAC, y la descomposición en valores singulares de la matriz. Estas alternativas se encuentran disponibles en el paquete PARAFAC desarrollado por R. Bro.⁷¹

Determinación del número de componentes: Se pueden aplicar diferentes métodos para estimar el número de componentes N . Entre ellos, CONCORDIA determina un parámetro llamado consistencia de núcleos.⁷² El número de componentes es adecuado si la adición de un componente más no mejora significativamente el ajuste del modelo. Otra opción es la evaluación del error residual del modelo, es decir el desvío estándar de los elementos en el arreglo (**E**) (**Ec. 13**), que muestra un comportamiento decreciente al mejorar el ajuste. Se considera que N es el número adecuado de componentes cuando este desvío se asemeja al error instrumental.

Identificación de los componentes: Los perfiles obtenidos por el modelo deben compararse con perfiles obtenidos para los compuestos puros, de manera de poder identificar a qué analito corresponde cada perfil, ya que el orden en que aparecen puede cambiar de una muestra a otra.

Calibración: Como la descomposición de los arreglos de tres vías sólo permite obtener valores de concentración relativos (\mathbf{A}), es necesario realizar una calibración para obtener las concentraciones absolutas. La calibración consiste en el análisis de un conjunto de estándares de concentración conocida (vector \mathbf{y} de dimensiones $I_{cal} \times 1$), con los que se construye la regresión (los primeros elementos de la columna \mathbf{a}_n en función de \mathbf{y}), de manera que:

$$k = \mathbf{y}^+ \times [a_{1,n} \mid \dots \mid a_{I_{cal},n}] \quad \text{Ec. 14}$$

donde $^+$ implica la pseudo-inversa. Para cada muestra incógnita, la concentración relativa de n debe convertirse en absoluta dividiendo el último elemento de la columna \mathbf{a}_n [$a_{(I_{cal}+1)n}$] por la pendiente de la calibración k :

$$y_u = a_{(I_{cal}+1)n} / k \quad \text{Ec. 15}$$

U-PLS

En U-PLS, las matrices de datos se desdoblan en vectores antes de aplicar el algoritmo de cuadrados mínimos parciales (PLS),⁷³ tal como se muestra en la **Fig. 6**. Esto se realiza concatenando para cada muestra las

dos dimensiones instrumentales, de tal manera que cada matriz de muestras de $J \times K$ genere un vector de $JK \times 1$. Seguidamente, en la fase de calibración, se emplea la información de concentración de los estándares, sin incluir información de la muestra incógnita. Con los I_{cal} vectores de calibración y el vector de concentraciones y (de tamaño $I_{cal} \times 1$) se construye el modelo PLS convencional. Se genera un conjunto de *loadings* \mathbf{P} y de *weight-loadings* \mathbf{W} (ambos de tamaño $JK \times A$, donde A es el número de factores latentes), así como también los coeficientes de regresión \mathbf{v} (de tamaño $A \times 1$).

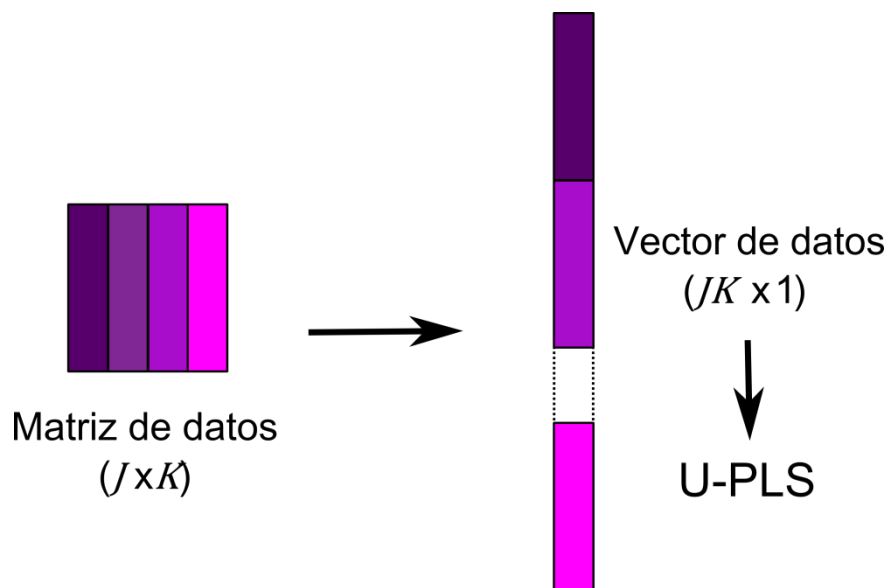


Fig. 6: Desdoblamiento de la matriz de datos y obtención de un vector de datos sobre el que luego se aplica el modelo PLS.

El parámetro A puede seleccionarse por medio de técnicas como validación cruzada: cada muestra se quita del conjunto de calibración, y su concentración se predice usando un modelo construido con los espectros de las muestras restantes.⁷⁴ Luego, se suma el cuadrado del error para la

predicción de cada muestra que se dejó de lado, dando un parámetro llamado PRESS (Suma de cuadrados del error de predicción). Este proceso se repite modificando el número de factores hasta lograr el mínimo valor de PRESS.

Si en la muestra incógnita no están presentes compuestos inesperados, \mathbf{v} se puede utilizar para estimar la concentración del analito empleando la siguiente expresión:

$$y_u = \mathbf{t}_u^T \cdot \mathbf{v} \quad \text{Ec. 16}$$

donde \mathbf{t} es el *score* de la muestra incógnita, obtenido al proyectar los datos vectorizados provenientes de la misma (\mathbf{X}_u) en el espacio de los A factores latentes de acuerdo a la **Ec. 17**.

$$\mathbf{t}_u = (\mathbf{W}^T \cdot \mathbf{P})^{-1} \cdot \mathbf{W}^T \text{vec}(\mathbf{X}_u) \quad \text{Ec. 17}$$

con $\text{vec}()$ = operador de vectorización.

Cuando aparecen constituyentes inesperados en la muestra incógnita, sus *scores*, dados por la **Ec. 17**, no son adecuados para la predicción de analitos a través de la **Ec. 16**. En este caso, los residuos de la predicción (s_p) obtenidos al aplicar la **Ec. 18** serán anormalmente grandes en comparación con el ruido instrumental típico:

$$\begin{aligned} s_p &= \|\mathbf{e}_p\| / (JK - A)^{\frac{1}{2}} = \|\text{vec}(\mathbf{X}_u) - \mathbf{P}(\mathbf{W}^T \mathbf{P})^{-1} \mathbf{W}^T \text{vec}(\mathbf{X}_u)\| / (JK - A)^{\frac{1}{2}} = \\ &= \|\text{vec}(\mathbf{X}_u) - \mathbf{P} \mathbf{t}_u\| / (JK - A)^{\frac{1}{2}} \mathbf{t}_u = (\mathbf{W}^T \cdot \mathbf{P})^{-1} \cdot \mathbf{W}^T \text{vec}(\mathbf{X}_u) \quad \text{Ec. 18} \end{aligned}$$

donde $\|\cdot\|$ indica la norma euclidiana.

Si se presentan interferencias, debe realizarse un procedimiento posterior a la calibración llamado bilinealización residual (RBL),^{75,76} que consiste en un análisis de componentes principales (PCA) basado en la descomposición de valores singulares (SVD). El objetivo del procedimiento RBL es minimizar la norma del vector residual \mathbf{e} , que se computa mientras se ajustan los datos de la muestra a la suma de las contribuciones más relevantes.

$$\text{vec}(\mathbf{X}_u) = \mathbf{P}\mathbf{t}_u + \text{vec}[\mathbf{B}_{\text{int}} \mathbf{G}_{\text{int}} (\mathbf{C}_{\text{int}})^T] + \mathbf{e}_u \quad \text{Ec. 19}$$

donde \mathbf{B}_{int} y \mathbf{C}_{int} son matrices conteniendo los primeros autovectores izquierdo y derecho de \mathbf{E}_p (transformación del vector \mathbf{e}_p en una matriz de $J \times K$), \mathbf{G}_{int} es una matriz diagonal que contiene los valores singulares, obtenida mediante el análisis SVD:

$$\mathbf{B}_{\text{int}} \mathbf{G}_{\text{int}} (\mathbf{C}_{\text{int}})^T = \text{SVD}(\mathbf{E}_p) \quad \text{Ec. 20}$$

Durante RBL, \mathbf{P} se mantiene constante a los valores de calibración, y \mathbf{t} se varía hasta que $\|\mathbf{e}_u\|$ se minimiza en la Ec. 19, empleando normalmente un procedimiento de Gauss-Newton. Es importante tener en cuenta que en algunos casos este esquema puede converger a un mínimo erróneo desde el punto de vista químico.⁷⁷ Para resolver este problema, se ha propuesto preceder RBL con un paso de optimización por enjambre de partículas, un método estocástico para encontrar el mínimo global basado en computación natural. Una vez que $\|\mathbf{e}_u\|$ se minimiza, las concentraciones

del analito se obtienen a través de la **Ec. 16**, por introducción del vector \mathbf{t} final encontrado por el procedimiento RBL.

Para un único componente inesperado, el análisis es directo y proporciona su correspondiente perfil. Sin embargo, para un mayor número de componentes inesperados, los perfiles \mathbf{B}_{int} y \mathbf{C}_{int} devueltos no se corresponden necesariamente con perfiles verdaderos. En lo que se refiere a la estimación del número de componentes inesperados, debería notarse que el objetivo que guía RBL es la minimización de los errores residuales s_u a un nivel compatible con el nivel de ruido presente en las señales medidas, dado por:

$$s_u = \|\mathbf{e}_u\| / [(J - N_{RBL})(K - N_{RBL}) - A]^{1/2} \quad \text{Ec. 21}$$

donde N_{RBL} es el número de componentes en RBL y A el número de factores en la calibración por PLS.

De esta forma, si se considera más de un componente inesperado, RBL debería seleccionar el modelo más simple que de un valor residual que no sea estadísticamente diferente del mínimo, de manera de evitar el sobreajuste. Es importante notar que en la discusión anterior aparecen dos parámetros residuales diferentes que no deberían confundirse: s_p (**Ec. 18**) que corresponde a la diferencia entre la señal de la muestra incógnita y la modelada por U-PLS antes de aplicar el procedimiento RBL, mientras que s_u (**Ec. 21**) surge de la diferencia luego de que se efectúa el modelado del interferente por RBL. Es este último valor el que debería ser del orden del

ruido instrumental si el procedimiento RBL logra modelar los interferentes de manera satisfactoria.

N-PLS/RBL

El modelo N-PLS es muy similar a U-PLS, pero en este caso las matrices originales no son desdobladas para su tratamiento (**Fig. 7**).

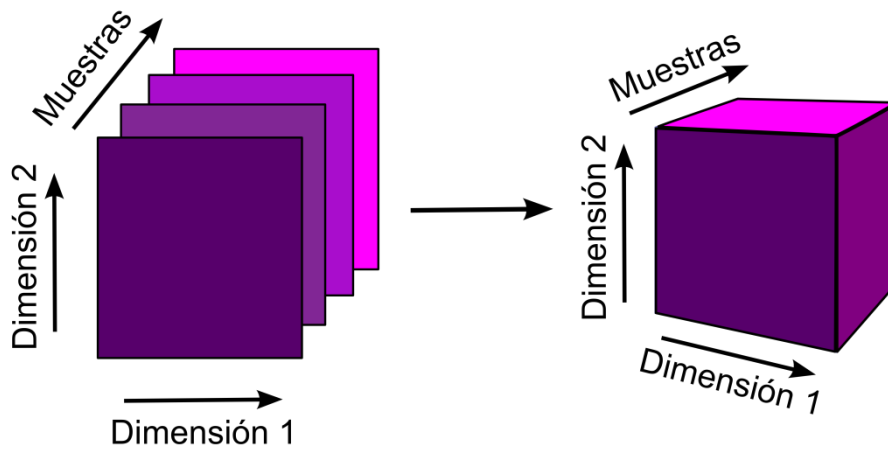


Fig. 7: Conformación de arreglos tridimensionales analizados por N-PLS.

El paso de calibración involucra la obtención de dos conjuntos de *loadings*, \mathbf{W}^j y \mathbf{W}^k (de dimensiones $J \times A$ y $K \times A$), y un vector de coeficientes de regresión \mathbf{v} ($A \times 1$).⁷⁸

Cuando no se encuentran interferentes inesperados en la muestra incógnita, es posible utilizar la **Ec. 16** para predecir la concentración de los analitos. Sin embargo, en presencia de interferentes, los *scores* obtenidos de esta forma no son aplicables, y los residuos del modelo (s_p), dados por la **Ec. 22**, resultan mucho mayores que el ruido experimental.

$$s_p = \|\mathbf{e}_p\| / (JK - A)^{\frac{1}{2}} = \|\text{vec}(\mathbf{X}_u) - \text{vec}(\hat{\mathbf{X}}_u)\| / (JK - A)^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ec. 22}$$

donde $\hat{\mathbf{X}}_u$ es la matriz de datos de la muestra, y \mathbf{X}_u la reconstruida por el modelo N-PLS. En este caso, es necesaria la aplicación del procedimiento RBL, explicado en la sección anterior.

MCR-ALS

En el algoritmo MCR-ALS se construye una matriz de datos aumentada a partir de la matriz de la muestra incógnita y las matrices de las muestras de calibración (**Fig. 8**).⁶⁷

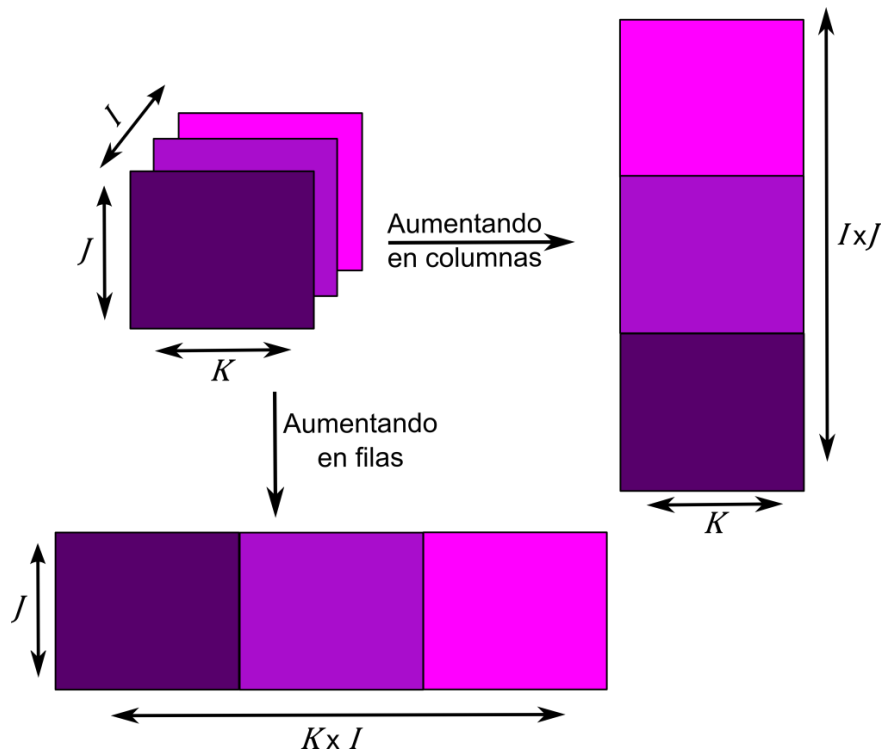


Fig. 8: Desdoblamiento de un arreglo tridimensional de datos en una matriz.

Las matrices son de tamaño $J \times K$, donde J es el número de tiempos de elución (número de filas de cada matriz), y K el número de longitudes de onda (número de columnas de cada matriz). Si bien el aumento matricial puede realizarse tanto en el sentido de filas como de columnas, teniendo en

cuenta que en datos de origen cromatográfico la trilinealidad se pierde en el modo temporal, en este estudio el aumento de la matriz se implementó en el sentido de las columnas.

Cuando la matriz se aumenta en el sentido de las columnas, su descomposición se realiza de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\mathbf{D} = \mathbf{CS}^T + \mathbf{E} \quad \text{Ec. 23}$$

La descomposición de \mathbf{D} se realiza por medio de cuadrados mínimos alternantes de los elementos contenidos en \mathbf{E} , bajo condiciones restrictivas adecuadas, tales como no negatividad, unimodalidad, correspondencia entre señales y analitos, etc.⁷⁹

El algoritmo MCR-ALS requiere una inicialización con parámetros tan cercanos como sea posible al sistema tratado. Por ejemplo, los espectros de las especies se pueden obtener a partir de soluciones estándares de cada analito puro, o del análisis del llamado espectro “puro”,^{80,81} un algoritmo multivariado que extrae el espectro del componente a partir de una serie de espectros de las mezclas de composición variada.⁸¹ Otra opción es estimar los perfiles de tiempos de elución, obtenidos a partir de procedimientos tales como el análisis de factores evolutivos.⁸² Las restricciones específicas iniciales aplicadas en cada caso se detallarán más adelante.

Luego de la descomposición de \mathbf{D} , la información de la concentración contenida en los perfiles de elución (matriz \mathbf{C}) se utiliza para realizar las

predicciones cuantitativas, definiendo el *score* del analito como el área debajo del perfil temporal de cada muestra:

$$a(i,n) = \sum_{j=1+(i-1)J}^{iJ} C(j,n) \quad \text{Ec. 24}$$

donde $a(i,n)$ es el *score* del analito n en la muestra i , y $C(i,n)$ es el elemento del perfil del analito en el modo aumentado. Los *scores* del analito en las muestras de calibración se emplean para construir un gráfico de calibración pseudo-univariada en función de las concentraciones nominales del analito, prediciendo la concentración en la muestra incógnita por interpolación de su *score*.

1.7 Fusión de datos

La fusión de datos es la combinación de señales de diferentes fuentes o detectores instrumentales, con el objetivo de mejorar la capacidad predictiva del método analítico. Cabe destacar que se obtendrán mejores resultados si las técnicas empleadas brindan información complementaria.

Existen tres estrategias de combinación de datos:⁸³

- Fusión a nivel de los datos: consiste en combinar los datos obtenidos en diferentes técnicas analíticas para su posterior procesamiento por medio de algún algoritmo quimiométrico, con el fin de obtener un único modelo predictivo.
- Fusión a nivel de las variables: consiste en extraer las variables o características importantes de los datos obtenidos en cada una de las

técnicas empleadas, para su posterior fusión y construcción del modelo predictivo.

- Fusión a nivel de las decisiones: los datos obtenidos a partir de cada técnica analítica son analizados y modelados por separado, y los resultados de estos modelos son combinados para la toma de decisiones. Esta estrategia es mayormente utilizada en métodos de clasificación.

De acuerdo al tipo de datos a fusionar, se aplican diferentes tratamientos previos a la fusión. Entre los pre-tratamientos de datos más empleados se encuentran el escalado, correcciones de línea de base y selección de variables.

En numerosas publicaciones se describe la aplicación de datos de primer orden fusionados a la clasificación de muestras mediante algoritmos como PCA y PLS, principalmente para certificación de origen y adulteración de alimentos como vinos,⁸⁴ aceite de oliva,⁸⁵ frutas y vegetales⁸⁶ y café,⁸⁷ empleando técnicas basadas en sensores para gases y líquidos,⁸⁴ EM y espectroscopía visible-infrarrojo cercano (NIR),⁸⁸ espectroscopía UV-vis. y espectroscopía NIR.⁸⁵

En relación a datos de segundo orden, Peré-Trepat y colaboradores⁸⁹ fusionaron satisfactoriamente datos de origen cromatográfico obtenidos mediante DAD y EM para la determinación de agrocompuestos en muestras de aguas residuales y sedimentos. También se encuentran en la literatura trabajos sobre fusión de datos de tres fuentes separadas: CLAE con detección por EM y DAD y experimentos de cinética para la

caracterización del proceso de fotodegradación de ketoprofeno y amilorida en muestras sintéticas.^{90,91} En los tres casos mencionados la fusión fue posible debido a que el corrimiento de las señales entre ambos detectores resultó constante. Sin embargo, la misma estrategia no puede aplicarse si se observan corrimientos temporales variables entre las señales de los analitos medidas por ambos detectores.

1.8 Validación y cifras de mérito

La determinación de las cifras de mérito de un método analítico permite no sólo evaluar su desempeño, sino también comparar objetivamente sus propiedades analíticas con las provistas por otros métodos. Entre las cifras de mayor interés se encuentran la selectividad, sensibilidad, límites de detección y cuantificación y rango lineal.

Sensibilidad, selectividad y sensibilidad analítica

La sensibilidad (SEN) es un parámetro clave, ya que permite el cálculo de otras cifras de mérito, como la sensibilidad analítica, la selectividad y la incertidumbre en las predicciones, que a su vez permite calcular los límites de detección y cuantificación.

En calibración de orden cero, la sensibilidad del método se define como el cambio en la señal analítica cuando la concentración del analito de interés se incrementa en una unidad, y corresponde a la pendiente de la curva de calibración.⁹² Si bien en un principio esta misma definición se aplicó al análisis de datos multivariados, mediante el cálculo de la “señal

meta correspondiente al analito”, no se obtuvieron buenos resultados.⁹³ En la actualidad, la estrategia más ampliamente utilizada consiste analizar la propagación de la incerteza en la concentración predicha. Este análisis permitió desarrollar una ecuación para el cálculo de la SEN válida para calibraciones univariadas y multivariadas, con parámetros que adquieren diferentes expresiones de acuerdo al modelo quimiométrico empleado:⁹⁴

$$SEN_n = \left\{ \mathbf{g}_n^T \left[\mathbf{Z}_{esp}^T (\mathbf{I} - \mathbf{Z}_{in} \mathbf{Z}_{in}^+) \mathbf{Z}_{esp} \right]^{-1} \mathbf{g}_n \right\}^{-1/2} \quad \text{Ec. 25}$$

donde el subíndice n identifica al analito de interés, la matriz \mathbf{Z}_{esp} contiene a los perfiles de los componentes calibrados, el vector \mathbf{g}_n es una columna de tamaño $(N_{cal} \times 1)$ con ceros y uno en la posición del analito (N_{cal} es el número de componentes presentes en las muestras de calibrado), y la expresión $(\mathbf{I} - \mathbf{Z}_{in} \mathbf{Z}_{in}^+)$ hace referencia a los perfiles de los componentes inesperados, siendo la manifestación matemática de la *ventaja de segundo orden*. Es importante tener en cuenta que la SEN depende del ruido instrumental, por lo que si se deben comparar métodos cuyos niveles de ruido difieren, se debe emplear la sensibilidad analítica (γ), calculada como:

$$\gamma_n = SEN_n / \sigma_x \quad \text{Ec. 26}$$

con σ_x = incerteza en la señal.

Finalmente, otro parámetro de interés que puede calcularse a partir de SEN es la selectividad (SEL), definida como la capacidad de un método para cuantificar a un analito dado en la presencia de compuestos interferentes. La expresión matemática empleada para el cálculo de este

parámetro depende nuevamente del algoritmo quimiométrico empleado en la calibración, pero en todos los casos está basada en la siguiente relación:

$$SEL_n = SEN_n(\text{mezcla compleja})/SEN_n(\text{puro}) \quad \text{Ec. 27}$$

Límite de detección y límite de cuantificación

Un concepto ampliamente generalizado en la química analítica es el de límite de detección (LD) de un método, es decir la cantidad mínima de un analito que puede ser detectada con cierto grado de certeza. El cálculo de dicho parámetro actualmente tiene en cuenta la probabilidad de errores de tipo I (falsos positivos) y tipo II (falsos negativos).⁹⁵ Si se busca que la probabilidad de ambos tipos de errores sea del 5%, la expresión del límite de detección en unidades de concentración viene dada por:

$$LD = 3,3 \times s_{x_0} \quad \text{Ec. 28}$$

siendo s_{x_0} la incertidumbre en la concentración de una muestra que tiende hacia el LD.

Al considerar datos multivariados, la **Ec. 28** lleva a la siguiente expresión:

$$LD_n = 3,3(\text{SEN}_n^{-2}\sigma_x^2 + h_0\text{SEN}_n^{-2}\sigma_x^2 + h_0\sigma_{y_{cal}}^2)^{1/2} \quad \text{Ec. 29}$$

donde σ_x^2 y $\sigma_{y_{cal}}^2$ corresponden a las varianzas en la señal instrumental y en las concentraciones de calibrado, respectivamente, y h_0 es la leva, es decir la "distancia" de la muestra incógnita al centro de la calibración.

A partir del LD es posible calcular también el límite de cuantificación (LC), definido como la mínima concentración de un analito que puede ser cuantificada por un método analítico dado. Este parámetro se estima como la concentración a la cual el error relativo de predicción es del 10%, dando como resultado la siguiente expresión (independientemente del tipo de calibración empleada):

$$LC_n = 3 \times LD_n \quad \text{Ec. 30}$$

Error cuadrático medio de predicción y error relativo de predicción

Otro parámetro de interés a la hora de evaluar el desempeño analítico de un método es el RMSEP, o error cuadrático medio en la predicción. Este parámetro permite verificar la concordancia entre las concentraciones de los analitos en muestras conocidas (valores nominales) y las predichas por medio del método analítico empleado. En calibración multivariada el RMSEP se considera un indicador de la exactitud y capacidad predictiva del modelo quimiométrico propuesto. Se calcula como:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{n}} \quad \text{Ec. 31}$$

donde \hat{y}_i e y_i son, respectivamente, los valores predicho y nominal para un analito dado en la muestra i , y n es el número de muestras de *test*. El RMSEP tiene unidades de concentración.

También es habitual emplear como una medida del error al REP, o error relativo de predicción, calculado como:

$$\text{REP} = \frac{100 \times \text{RMSEP}}{\bar{y}_{cal}} \quad \text{Ec. 32}$$

con \bar{y}_{cal} = concentración media de la curva de calibración.

Comparación de valores de concentración obtenidos con valores nominales o dados por métodos de referencia

Para evaluar la exactitud y precisión de un método analítico se requiere de analizar una serie de muestras de *test* de concentraciones conocidas (ya sea a partir de un método analítico de referencia o con los valores nominales, si se dispone de ellos). Una vez predichas las concentraciones de las muestras, existen dos posibilidades: si las concentraciones de los analitos en las muestras estudiadas se encuentran distribuidas en aproximadamente todo el rango de calibrado, se debe aplicar el *test* de la región elíptica de confianza conjunta (EJCR).⁹⁶ En caso contrario, se debe emplear un *test t* de comparación de medias por parejas.

Prueba de la región elíptica de confianza conjunta: Esta prueba consiste en graficar la región elíptica de confianza (95%) conjunta entre la pendiente y la ordenada al origen obtenidas en las regresiones nominal vs predicho, y comprobar si el punto ideal, pendiente = 1 y ordenada = 0, está incluido en dicha región. Si dicho punto se encuentra dentro de la elipse, puede concluirse que el método es exacto. Además, el tamaño de la elipse,

que está controlado por el desvío estándar de la regresión, da una idea de la precisión del método analítico que se está analizando.

Prueba t de comparación de medias por parejas: En este caso, si se adopta como hipótesis nula que no existen discrepancias significativas entre las concentraciones dadas por dos métodos, se puede probar si la media de las diferencias es significativamente distinta de cero. Si el valor crítico $|t|$ de tabla para un determinado nivel de confianza y $n-1$ grados de libertad es mayor que el valor calculado, se acepta la hipótesis nula: los métodos ofrecen concentraciones similares. El valor experimental de t se calcula usando la siguiente expresión:

$$t = \frac{\bar{D}}{S_D/\sqrt{n}} \quad \text{Ec. 33}$$

donde n es el número de muestras analizadas, \bar{D} y S_D representan el promedio y desvío estándar de las diferencias entre cada par de datos, respectivamente.



OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Generales

Proponer estrategias y métodos analíticos verdes para la determinación de disruptores endócrinos en matrices de interés alimenticio y/o ambiental, mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y separativos, acoplados a calibración multivariada.

2.2 Objetivos específicos

- Estudiar el uso de medios organizados para la exaltación de la señal fluorescente de disruptores endócrinos fenólicos, y su aplicación en el desarrollo de técnicas luminiscentes de cuantificación que impliquen un bajo consumo de solventes orgánicos y condiciones de trabajo compatibles con la química verde.
- Desarrollar una metodología empleando matrices de excitación-emisión de fluorescencia y calibración de segundo orden para la determinación de disruptores endócrinos fenólicos en muestras de envases plásticos.
- Desarrollar un método para la cuantificación de disruptores endócrinos fenólicos y ésteres ftálicos derivados de plásticos en muestras de bebidas, basado en cromatografía líquida con detección dual (por arreglo de diodos y fluorescente) acoplada a calibración multivariada, siguiendo los postulados de la química analítica verde.

- Evaluar las ventajas de la fusión de datos cromatográficos de segundo orden (tiempo de elución-longitud de onda de absorción y tiempo de elución-longitud de onda de emisión de fluorescencia) obtenidos mediante detección dual en tres sistemas experimentales, constituidos por disruptores endócrinos, y aplicar dicha estrategia en el análisis de muestras reales de aguas ambientales.



SECCIÓN EXPERIMENTAL

3. SECCIÓN EXPERIMENTAL

3.1 Equipamiento

Las medidas de fluorescencia se realizaron en un fluorómetro PerkinElmer modelo LS 55 (Norwalk, EE.UU.), equipado con una lámpara pulsante de xenón, controlado mediante una PC, y utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico.

La temperatura del portacelda se reguló empleando un baño termostatzado Lauda modelo Alpha RA8 (Frankfurt, Alemania).

Las medidas de pH de las soluciones se realizaron con un pHmetro Orion 420 (Thermo Scientific, Waltham, EE.UU.) equipado con electrodos de vidrio y Ag/AgCl.

Los espectros de ^1H -RMN se obtuvieron mediante un espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker Advance modelo AC-300 (Karlsruhe, Alemania). La frecuencia nominal de operación del equipo fue de 300,13 MHz.

Los análisis por CLAE se llevaron a cabo en un cromatógrafo de líquidos Agilent 1200 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), equipado con una bomba cuaternaria, un inyector Rheodyne (Cotati, EE.UU.) con carga de 20 μL , un termostatzador de columna, y dos detectores conectados en serie, de manera que funcionaran en simultáneo: un detector de arreglo de diodos y uno de fluorescencia. Los datos se recolectaron por medio del *software* HP Chemstation para LC Rev. HP 1990-1997.

Los análisis de CG-EM se realizaron en un equipo Shimadzu GC MS-QP2010 Plus (Kyoto, Japón), equipado con un inyector automático. Para los análisis cuantitativos, el detector se operó en modo SIM (monitoreo selectivo de iones) y para la adquisición e integración de los datos se empleó el *software* LabSolutions.

3.2 Reactivos y soluciones

A continuación se detallan las marcas de los reactivos y materiales empleados en el presente trabajo, siendo todos de grado analítico:

- BPA, OP, DEP, DBP, DEHP, FLT, PIR, BaP, BaA, BbF, DBA, BghiP, CBL, NAP, metil- β -CD (M- β -CD), Brij[®] 35, Tween[®] 80 y 2,6-di-O-metil- β -CD (DM- β -CD): Sigma-Aldrich (Milwaukee, EE.UU.).
- NP, NOR, bromuro de deciltrimetilamonio (DTAB), bromuro de hexadecilpiridina (HTAB), cloruro de hexadecilpiridina (HTAC) y 2-hidroxiethyl- β -CD (HE- β -CD): Fluka (Buchs, Suiza).
- α -, β - y γ -CDs y 2-hidroxipropil- β -CD (HP- β -CD): Cyclolab (Budapest, Hungría).
- Triton[®] X-100: J.T. Baker (Phillipsburg, EE. UU.).
- Hidróxido de sodio, dodecilsulfato de sodio (SDS), acetonitrilo (ACN) y metanol (MeOH): Merck (Darmstadt, Alemania).
- Acetato de etilo: Carlo Erba (Milán, Italia).
- Trimetilclorosilano (TMCS) y N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA): Supelco (Bellefonte, PA, EE.UU.).

- Ácido clorhídrico, etanol y acetato de etilo: Cicarelli (Bs. As., Argentina).
- El agua ultrapurificada se obtuvo mediante un sistema Millipore (Massachusetts, EE.UU.).
- Discos de C18 para EFS Empore: Supelco (Bellefonte, PA, EE.UU.).

Se prepararon soluciones patrón metanólicas de los DEs de 1,00 mg mL⁻¹. Dichas soluciones se diluyeron en MeOH para obtener concentraciones entre 2,00 y 10,0 µg mL⁻¹.

Las soluciones acuosas de trabajo se prepararon diariamente a partir de soluciones metanólicas diluidas, tomando las alícuotas correspondientes, evaporando el solvente orgánico por medio de nitrógeno seco, y diluyendo con agua ultrapura. Las soluciones patrón de CDs y surfactantes se prepararon pesando la cantidad apropiada del sólido y disolviéndolos en agua ultrapurificada.

Los solventes utilizados para CLAE se filtraron a través de membranas de nylon de 0,22 µm antes de su uso.

3.3 Software

Para el tratamiento de los datos se emplearon diferentes algoritmos quimiométricos: PARAFAC, U-PLS, N-PLS y MCR-ALS.^{64,67} Las rutinas utilizadas se encuentran escritas en el entorno MATLAB 7.0, y se implementaron mediante la interfaz gráfica MVC2.⁹⁷

Las determinaciones de pK_a se realizaron mediante el programa PKFIT.⁹⁸ El algoritmo COW se aplicó utilizando una rutina para MATLAB, disponible en internet.⁹⁹

3.4 Estudio espectrofluorimétrico de DEs en presencia de medios organizados

Obtención de espectros de fluorescencia

Se estudió el comportamiento espectrofluorimétrico de BPA, NP y OP en presencia de β -CD, M- β -CD, DM- β -CD, HE- β -CD, HP- β -CD, α -CD, γ -CD, HTAB, HTAC, DTAB, Triton[®] X-100, Tween[®] 80, SDS y Brij[®] 35. Se obtuvieron espectros de fluorescencia de los analitos en solución acuosa, en ausencia y presencia de diferentes CDs. En todos los casos la concentración de DE empleada fue de 500 ng mL^{-1} , y la de CDs y surfactantes, $2 \times 10^{-3} \text{ M}$. Los parámetros instrumentales empleados para las medidas de fluorescencia fueron: $\lambda_{\text{ex}} = 278 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 307 \text{ nm}$, rendijas de emisión y excitación de 10 ó 5 nm (dependiendo del experimento), voltaje del fotomultiplicador de 700 V – 850 V y velocidad de barrido de 1500 nm min^{-1} . La temperatura del portacelda se mantuvo a $20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Determinación de constantes de inclusión de DE en CDs

Se procedió a determinar sus constantes de inclusión. Para ello, se prepararon soluciones acuosas de 500 ng mL^{-1} de los DEs con concentraciones de CDs entre 0 y $1 \times 10^{-2} \text{ M}$. Además, se prepararon

soluciones de las mismas concentraciones de CDs, en ausencia de analito, para utilizarlas como blancos. Se midieron los espectros de emisión de fluorescencia de todas las soluciones, excitando a 278 nm. Para cada espectro, a la intensidad de la emisión a 307 nm se le restó el blanco correspondiente. Estas intensidades corregidas se graficaron en función de la concentración de CD. Las gráficas obtenidas se ajustaron a la **Ec. 10** (pág. 38) y se determinaron las constantes de inclusión de cada complejo.

Efecto del pH

Para evaluar el cambio en la intensidad de fluorescencia en función del pH de BPA, NP y OP, en presencia y ausencia de las diferentes CDs, se empleó el siguiente procedimiento: se prepararon 50 mL de una solución de cada analito o de sus complejos en medio HCl ($C_{HCl} \approx 1 \times 10^{-4}$ M). Estas soluciones se titularon con alícuotas de 0,01-0,5 mL de solución de NaOH ($C_{NaOH} \approx 0,1-1$ M). Para cada valor de pH se extrajo una alícuota de 2,00 mL de la solución, se registró el espectro de fluorescencia ($\lambda_{ex} = 278$ nm) y luego se la reincorporó a la solución.

Las concentraciones iniciales de NP y OP fueron de 500 ng mL⁻¹. Debido a la muy baja fluorescencia de BPA en agua, su concentración inicial fue de 1000 ng mL⁻¹. En todos los casos, la concentración de cada CD ensayada fue 2×10^{-3} M.

Las determinaciones se llevaron a cabo a 20 °C, con agitación y burbujeo de nitrógeno, para evitar la descomposición de los analitos. Las titulaciones se realizaron por duplicado.

Las curvas de fluorescencia en función del pH se utilizaron para determinar las constantes de acidez (pK_a) de los analitos en estado excitado, tanto en presencia como en ausencia de las CDs estudiadas.

A partir de los datos experimentales, el cálculo de las constantes se realizó mediante el programa PKFIT, basado en un procedimiento de ajuste por cuadrados mínimos.

Análisis estructural de los complejos de inclusión

Espectros de 1H -RMN: Se registraron los espectros protónicos de los analitos libres y en presencia de algunas de las β -CDs estudiadas. Las soluciones se prepararon en d_6 -dimetilsulfóxido (DMSO). Los desplazamientos químicos (expresados en ppm) se determinaron usando como referencia tetrametilsiloxano y el pico del solvente ($\delta_{DMSO} = 2,5$ ppm). Como las solubilidades de los analitos en DMSO son mayores a sus solubilidades en agua, fue posible realizar los experimentos trabajando con altas concentraciones de DEs ($C_{BPA} = 8,8 \times 10^{-3}$ M, $C_{OP} = 9,7 \times 10^{-3}$ M, $C_{NP} = 9,1 \times 10^{-3}$ M y $C_{CD} = 0,07$ M).

Cálculos semiempíricos: Las estructuras geométricas en estado fundamental de los complejos de inclusión se optimizaron utilizando el

método semiempírico mecanocuántico AM1, contenido en el paquete HyperChem versión 7.02 (Hypercube Inc.).

Construcción de curvas de calibración univariadas

A partir de los resultados obtenidos se seleccionaron las condiciones de pH y naturaleza y concentración de CD, para la construcción de curvas de calibración de BPA, OP y NP.

Las curvas de calibrado se obtuvieron en ausencia y presencia de M- β -CD ($C_{CD} = 1,5 \times 10^{-3} \text{ M}$), a siete niveles de concentración de DEs, por triplicado. Se emplearon diferentes longitudes de onda de excitación: 220 y 278 nm para OP y NP, y 225 y 278 nm para BPA. En todos los casos, la longitud de onda de emisión fue de 307 nm. Se calcularon las cifras de mérito de las calibraciones.

3.5 Determinación simultánea de BPA y NP en envases plásticos

Muestras de calibración y validación

Se preparó un conjunto de 10 muestras de calibración, mediante un diseño central compuesto. También se preparó un conjunto de validación de 9 muestras, con concentraciones aleatorizadas de BPA y NP, dentro del rango del rango de calibrado. En la **Tabla 2** se muestra la composición tanto de los estándares utilizados para la calibración como de las muestras de validación.

Tabla 2: Composición de las muestras utilizadas en la calibración y la validación (ng mL⁻¹).

Calibración		Validación	
BPA	NP	BPA	NP
0	0	49	149
25	150	0	100
0	75	28	73
43	22	16	81
25	0	37	53
43	128	4	21
7	128	12	92
50	75	31	41
25	150	20	0
7	22		

Las soluciones de las muestras de calibración y validación se prepararon agregando alícuotas de soluciones acuosas de BPA y NP en matraces de 5,00 mL, adicionando una alícuota de la solución de M- β -CD para llegar a una concentración final de 1×10^{-3} M, y llevando a volumen con agua ultrapura. Finalmente, se registraron las MEEFs de dichas soluciones en los siguientes rangos: λ_{ex} = 215-285 nm (cada 0,5 nm); λ_{em} =295-365 nm (cada 2 nm). Todas las medidas se realizaron a 5 °C.

Las matrices resultantes (131×35 datos) se guardaron en formato ASCII y se transfirieron a una computadora para su posterior análisis mediante diferentes algoritmos quimiométricos.

Muestras reales

La determinación de NP y BPA se realizó en muestras de plásticos de diferente composición.

Las muestras se cortaron en pequeños fragmentos, se lavaron 5 veces con 50 mL de agua ultrapura y se secaron. A continuación se realizó el siguiente proceso de extracción: se pesó 1 g de cada plástico y se lo colocó en un balón con 2,5 mL de etanol durante 1 h a 35 °C, a reflujo y con agitación. Debido a las altas concentraciones de NP en las películas plásticas analizadas, se pesaron 0,1 g de dichas muestras y se trataron con 5 mL de etanol. Teniendo en cuenta la fotosensibilidad de los analitos, estos procedimientos se realizaron protegiendo las muestras de la luz mediante papel de aluminio y bajo atmósfera de nitrógeno. Una vez enfriados los extractos, se filtraron utilizando membranas de nylon de 0,45 µm, y se los separó en dos alícuotas, para el posterior análisis por CLAE (método de referencia) y por el método de fluorescencia propuesto.

El análisis por fluorescencia se realizó transfiriendo 1,00-2,00 mL de extracto a un matraz. El solvente se evaporó mediante corriente de nitrógeno, se agregó una alícuota de solución de M-β-CD (para obtener una concentración final de 1×10^{-3} M) y se llevó a volumen con agua ultrapura. Finalmente, se registraron las MEEFs de dichas soluciones, empleando las condiciones experimentales que se describieron para los conjuntos de calibración y validación (pág. 78).

El análisis por CLAE se llevó a cabo evaporando 125-250 µL de extracto por corriente de nitrógeno, y luego reconstituyéndolo en 500 µL de FM (40% agua: 60% MeOH). Las soluciones resultantes se analizaron por CLAE, empleando el método de referencia descrito a continuación.

Método de referencia

El método de CLAE seleccionado como referencia se llevó a cabo empleando una modificación de la técnica propuesta por Zhou y colaboradores.¹⁵

Se trabajó a un flujo de $0,7 \text{ mL min}^{-1}$. La FM consistió en dos solventes, agua ultrapura (solvente A) y MeOH (solvente B). La separación satisfactoria de los analitos en las matrices a analizar se logró aplicando un gradiente de elución: 0-5,5 min, composición isocrática, 40% A : 60% B; 5,5-10 min, gradiente lineal desde 40% A : 60% B hasta 10% A : 90% B; 10-17 min, composición isocrática 10% A : 90% B. Finalizado el análisis, se volvió a la condición inicial, requiriendo 5 minutos de re-acondicionamiento de la columna antes de realizar la siguiente inyección. Las muestras inyectadas se filtraron previamente por membranas de nylon de $0,22 \mu\text{m}$. La detección fluorescente se realizó a $\lambda_{\text{ex}}=225 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}}=306 \text{ nm}$.

3.6 Determinación de DEs en bebidas

Muestras de calibración y validación

Con el objeto de desarrollar un método para la cuantificación de DEs en presencia de interferentes propios de las muestras a analizar, se realizó una calibración de segundo orden.

Se preparó un conjunto de 12 muestras de calibración, con concentraciones en el intervalo 0-50 ng mL⁻¹ para BPA, NP y OP, y en el intervalo 0-200 ng mL⁻¹ para DEP, DBP y DEHP.

También se preparó un conjunto de validación de 10 muestras, con concentraciones de los analitos seleccionadas al azar, dentro de sus respectivos intervalos de calibración.

Las concentraciones de ambos conjuntos de muestras se detallan en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Concentraciones (ng mL⁻¹) de las muestras de calibración y validación.

Calibración					
BPA	OP	NP	DEP	DBP	DEHP
0	0	0	0	0	0
0	20	5	200	160	80
5	35	20	40	200	160
20	50	35	80	40	200
35	0	50	160	80	40
50	5	0	0	160	80
27	20	27	120	0	160
5	35	5	200	120	0
20	50	20	40	200	120
35	27	35	80	40	200
50	5	50	160	80	40
27	27	27	120	120	120

Validación					
BPA	OP	NP	DEP	DBP	DEHP
42	40	23	145	66	150
19	8	15	74	128	107
9	20	41	101	80	87
30	33	9	40	50	50
5	12	34	58	199	132
14	25	5	123	158	195
23	46	27	198	102	73
34	5	49	168	173	178
48	29	11	89	92	95
27	17	30	180	185	115

Las soluciones de las muestras de calibración y validación se prepararon adicionando alícuotas de soluciones metanólicas de los analitos en matraces de 5,00 mL, secando el solvente bajo corriente de nitrógeno, y llevando a volumen con una mezcla ACN:agua (70:30 v/v). Finalmente, las soluciones se filtraron a través de membranas de nylon de 0,22 μm de diámetro de poro y se las analizó por CLAE.

El análisis por CLAE se llevó a cabo usando una FM constituida por agua (solvente A) y ACN (solvente B). Se empleó el siguiente gradiente de elución: se mantuvieron condiciones isocráticas de 30% A:70% B durante los primeros 4,5 min. Luego se aplicó un gradiente lineal durante 1,5 min, llevando la composición de la FM a 7% A:93% B. Esta composición se mantuvo constante durante los últimos 3 min de análisis. Finalmente, se

retornó a las condiciones iniciales, con un período de reacondicionamiento de 5 min previo a la inyección de la siguiente muestra. De esta manera, se alcanzó un tiempo de análisis instrumental de 14 min por muestra.

Las determinaciones se realizaron mediante detección dual simultánea (DAD y DFL), colectándose dos matrices por muestra, CL-DAD y CL-DFL. En el caso del DAD, se recogieron espectros cada 0,85 s, en el intervalo 200-300 nm, cada 0,5 nm. Con respecto al DFL, la longitud de onda de excitación fue 226 nm, y se colectaron espectros de emisión, cada 0,85 s, en el intervalo 295-350 nm, cada 1 nm. Los datos se guardaron en formato ASCII y se transfirieron a una computadora para su posterior tratamiento quimiométrico.

Muestras reales

Se analizaron 12 muestras de bebidas: gaseosas, jugos, agua mineral, vinos, cervezas y bebidas alcohólicas blancas. Luego de adquiridas, se transvasaron a envases de vidrio, y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

Las bebidas carbonatadas (gaseosas y cervezas) se desgasificaron mediante baño de ultrasonido.

Las bebidas alcohólicas se sometieron a un proceso de evaporación del etanol por medio de un evaporador rotatorio, de manera de garantizar una óptima recuperación en el subsiguiente proceso de pre-concentración.

Todas las muestras se filtraron a través de membranas de nylon de 0,45 μm , y se pre-concentraron por EFS en membranas de C18. Esta pre-concentración se llevó a cabo activando las membranas con 0,75 mL de

MeOH, y filtrando diferentes volúmenes de muestra (3-40 mL), manteniendo un flujo óptimo de entre 10 mL min^{-1} y 30 mL min^{-1} .¹⁰⁰ Los compuestos retenidos se eluyeron con aproximadamente 0,75 mL de MeOH. Finalmente, el eluato se llevó a un volumen final de 1,00 mL.

El análisis por CLAE se llevó a cabo de la siguiente forma: se evaporaron 25-250 μL de eluato bajo corriente de nitrógeno, se reconstituyeron en 250 μL de FM (30% agua:70% ACN), y se analizaron de igual manera que las muestras de calibración y validación. Cabe destacar que el factor máximo de pre-concentración alcanzado en este caso fue de 40. Estos análisis se realizaron por duplicado.

Método de referencia

El método de análisis desarrollado se validó por CG-EM, siguiendo una modificación del procedimiento propuesto por Ballesteros y colaboradores.⁵⁷ Las muestras reales se trataron de igual manera a la descrita en la sección anterior, pero empleando factores de pre-concentración en el intervalo 40 - 400.

Teniendo en cuenta que BPA, OP y NP no son compuestos lo suficientemente volátiles para ser analizados por CG, fue necesario realizar una etapa de derivatización previa al análisis cromatográfico. Por ello, una vez tomadas las alícuotas correspondientes de eluato, se evaporó el solvente bajo corriente de nitrógeno y se les adicionó 30 μL de una mezcla 25:5 v/v acetato de etilo: BSTFA/TMCS al 1%. A continuación, se sellaron

los viales, se homogeneizaron en un vórtex y se colocaron en un baño a 80 °C, durante 30 minutos. Finalmente, 3 µL de las muestras derivatizadas se inyectaron en el cromatógrafo de gases. En la **Fig. 9** se muestra la reacción de silanización empleada:

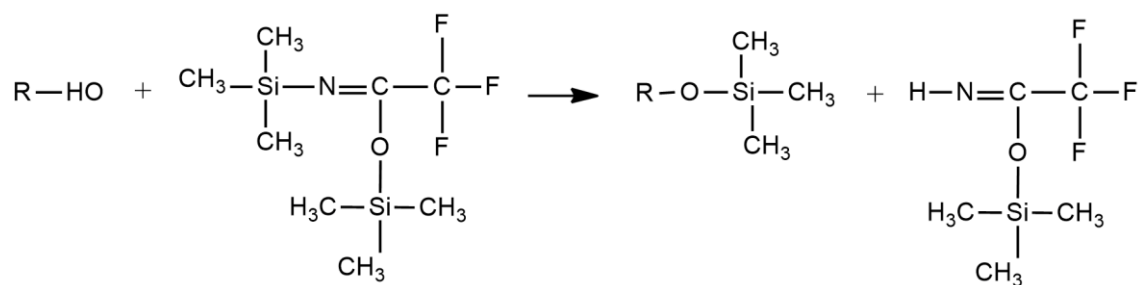


Fig. 9: Reacción de silanización empleada para derivatizar a los analitos de baja volatilidad.

A continuación se detallan las condiciones cromatográficas empleadas: se utilizó helio como gas portador, a un flujo de 1 mL min⁻¹; la temperatura del puerto de inyección se fijó en 250 °C; la temperatura del horno se modificó siguiendo un gradiente (120 °C durante 1 min, gradiente lineal hasta 230 °C en los siguientes 9 min, y temperatura constante de 230 °C los 9 min finales) de manera de lograr una completa resolución de los analitos. Se aplicó una energía de ionización de 70 eV, utilizando el modo SCAN para la identificación de los analitos, y posteriormente el modo SIM para fines cuantitativos. Los iones monitoreados fueron: 149 *m/z* para DEP, DBP y DEHP, 179 *m/z* para NP, 278 *m/z* para OP y 357 *m/z* para BPA.

3.7 Fusión de datos cromatográficos de segundo orden: determinación de DEs en muestras de agua.

Análisis cromatográfico

Se analizaron tres sistemas experimentales modelo, constituidos por DEs de diferente naturaleza y origen. Los análisis cromatográficos de los sistemas experimentales propuestos se realizaron en todos los casos en condiciones isocráticas, y empleando detección dual (DAD y DFL):

- En el Sistema I (SI), constituido por DBP, FLT, PIR, BaA, NP, BbF, BaP, DBA y BghiP, se empleó como FM una mezcla de ACN:agua 85:15 v/v, obteniéndose un tiempo total de análisis de 3,2 min. El DAD se configuró para registrar espectros de absorbancia cada 0,8 s, en el rango 200-350 nm, cada 2 nm, mientras que el DFL registró espectros de emisión de fluorescencia cada 2,2 s, en el rango 295-450, cada 3 nm, con $\lambda_{ex}= 222$ nm.

- En el Sistema II (SII), compuesto por CBL, BPA, NAP y E2, se utilizó una mezcla ACN:agua 36:64 v/v como FM, con un tiempo total de análisis de 3,5 min. El DAD se configuró para registrar espectros de absorbancia cada 0,8 s, en el rango 200-300 nm, cada 1 nm, mientras que el DFL registró espectros de emisión de fluorescencia cada 1,7 s, en el rango 295-420, cada 3 nm, con $\lambda_{ex}= 225$ nm.

- Finalmente, el Sistema III (SIII), conformado por DMP, CBL, BPA, NAP y NOR, se analizó empleando ACN:agua 41:59 v/v como FM, obteniendo un tiempo total de análisis de 3 min. El DAD se configuró para

registrar espectros de absorbancia cada 0,4 s, en el rango 200-320 nm, cada 2 nm, mientras que el DFL registró espectros de emisión de fluorescencia cada 1,2 s, en el rango 295-430, cada 3 nm, con λ_{ex} = 225 nm.

Calibración y validación

Las concentraciones de las muestras de calibrado de **SI**, **SII** y **SIII** se encuentran detalladas en las **Tablas 4, 5 y 6** respectivamente.

Tabla 4: Concentraciones (en ng mL⁻¹) de las muestras de calibrado del **SI**.

	DBP	FLT	PIR	BaA	NP	BbF	BaP	DBA	BghiP
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	100	50	50	10	50	10	10	10	10
3	20	50	10	10	50	50	10	50	10
4	20	10	10	50	10	50	50	50	10
5	100	50	50	50	50	50	50	50	50
6	100	50	10	10	10	50	50	10	50
7	100	10	10	10	50	10	50	50	10
8	20	50	10	50	50	10	50	10	50
9	100	50	10	50	10	10	10	50	10
10	20	10	10	10	10	10	10	10	50
11	20	50	50	50	10	50	10	10	10
12	100	10	10	50	50	50	10	10	50
13	20	10	50	10	50	50	50	10	10
14	20	50	50	10	10	10	50	50	50
15	100	10	50	10	10	50	10	50	50
16	100	10	50	50	10	10	50	10	10
17	20	10	50	50	50	10	10	50	50
18	60	30	30	30	30	30	30	30	30

En el caso del **SI**, se prepararon 16 muestras de calibrado de acuerdo a un diseño factorial fraccionado, un blanco, y una muestra de concentración

media de los 9 analitos, dando un total de 18 muestras. Se trabajó en un rango de concentraciones de 0-50 ng mL⁻¹ para todos los analitos a excepción del DBP. En el caso de este último, el intervalo de concentraciones empleadas fue 0-100 ng mL⁻¹.

En los sistemas **SII** y **SIII** se prepararon conjuntos de 10 muestras de calibrado, 8 de acuerdo a un diseño factorial fraccionado, y las dos restantes combinando concentraciones medias y nulas de los analitos en forma intercalada. En el **SII** se trabajó con un rango de concentraciones de 0-50 ng mL⁻¹ para todos los analitos, mientras que en el **SIII** se emplearon rangos de concentraciones de 0-100 ng mL⁻¹ para DMP y NOR, y de 0-50 ng mL⁻¹ para CBL, BPA y NAP. Además, se prepararon para cada uno de los sistemas experimentales estudiados 10 muestras de validación con concentraciones aleatorias pero conocidas de los analitos, dentro de sus respectivos intervalos de calibrado.

Tabla 5: Concentraciones (en ng mL⁻¹) de las muestras de calibrado del **SII**.

	CBL	BPA	NAP	E2
1	0	35	35	0
2	35	0	0	35
3	50	50	50	50
4	50	10	10	50
5	50	50	10	10
6	10	50	10	50
7	10	10	10	10
8	10	50	50	10
9	10	10	50	50
10	50	10	50	10

Tabla 6: Concentraciones (en ng mL⁻¹) para las muestras de calibrado del SIII.

	DMP	CBL	BPA	NAP	NOR
1	20	10	50	50	20
2	100	50	10	50	20
3	100	10	10	10	100
4	20	10	10	50	100
5	20	50	50	10	100
6	100	50	50	50	100
7	20	50	10	10	20
8	100	10	50	10	20
9	0	30	0	30	0
10	50	0	30	0	50

Las soluciones de las muestras de calibración y validación de los tres sistemas experimentales se prepararon adicionando alícuotas de soluciones metanólicas de los analitos en matraces de 5,00 mL, evaporando el solvente bajo corriente de nitrógeno, y llevando a volumen con la correspondiente FM. Finalmente, las soluciones se filtraron a través de membranas de nylon de 0,22 µm de diámetro de poro y se analizaron por CLAE, bajo las condiciones instrumentales previamente detalladas para cada sistema experimental.

Los datos se guardaron en formato ASCII y se transfirieron a una computadora para su posterior tratamiento quimiométrico.

Muestras reales

Se analizaron muestras reales de agua de red, agua de pozo y agua del río Paraná, recolectadas en Rosario, Funes y en el balneario La Florida respectivamente. Se decidió realizar la determinación de los analitos

correspondientes al **SIII**, ya que en el mismo se observaron las ventajas más significativas debidas a la aplicación de la fusión. Para ello, en primera instancia se confirmó la ausencia de los analitos correspondientes al sistema seleccionado, y posteriormente se realizó un estudio de recuperación por adición de DMP, CBL, BPA, NAP y NOR, en concentraciones dentro de sus respectivos rangos de calibrado.

Las muestras se prepararon adicionando alícuotas de las soluciones metanólicas patrón de los analitos en matraces de 5,00 mL, evaporando el solvente mediante corriente de nitrógeno, agregando 3,00 mL de muestra, y llevando a volumen con ACN, para lograr una composición análoga a la de la FM. Finalmente, las muestras fueron filtradas por membrana de nylon de 0,45 μm , y analizadas por CLAE, bajo las mismas condiciones que las muestras de calibrado y validación del **SIII**.

Tratamiento de los datos

Como se detalló previamente, en el análisis por CLAE se registraron dos matrices por muestra: CL-DAD y CL-DFL. En estas matrices, el número de columnas es igual al número de sensores espectroscópicos, mientras que el número de filas se corresponde con el número de tiempos de elución registrados.

Una vez obtenidas estas matrices, y previamente a su fusión, fue necesario aplicar un pre-tratamiento a los datos, a fin de subsanar los siguientes problemas: distorsiones en la línea de base, diferencias en el

número de filas entre CL-DAD y CL-DFL, y corrimientos de los perfiles temporales entre ambos detectores.

Este pre-tratamiento, aplicado al par de matrices obtenidas en el análisis de una muestra, se detalla a continuación:

1. Se corrigieron las líneas de base de CL-DAD y CL-DFL por medio de un algoritmo basado en cuadrados mínimos asimétricos.¹⁰¹

2. Teniendo en cuenta que la velocidad de adquisición de datos del DAD es mayor que la del DFL, y que es necesario que ambas matrices posean el mismo número de filas para fusionarlas, se agregaron digitalmente sensores temporales a CL-DFL por interpolación lineal, mediante la aplicación de la función “interp1” (incluida en el programa MATLAB).

3. La alineación de los perfiles temporales de CL-DFL y CL-DAD se llevó a cabo construyendo dos vectores que denominamos y_{DAD} e y_{DFL} , sumando las columnas correspondientes a los máximos de absorbancia o emisión de fluorescencia de todos los analitos, respectivamente. De esta manera se obtuvieron “cromatogramas virtuales”, conteniendo los perfiles temporales de todos los analitos presentes. Una primera aproximación a la alineación se realizó desplazando digitalmente la matriz CL-DFL un número dado de sensores temporales, determinado a partir de una comparación visual entre y_{DAD} e y_{DFL} . Posteriormente a dicho desplazamiento se calculó un nuevo vector y_{DFL} .

4. Debido a la presencia de corrimientos temporales no uniformes a lo largo del experimento cromatográfico, fue necesario realizar una segunda etapa de alineación, empleando el programa “alineamiento optimizado de correlación unidimensional” o 1D-COW, basado en un algoritmo de sincronización de cromatogramas. Este programa requiere como entradas el vector a alinear (y_{DFL}), el vector modelo (y_{DAD}) y las variables “segmento” y “dilatación”. En general, el segmento se aproximó al ancho en sensores del pico más angosto, y la dilatación óptima se encontró en el rango 1-4. El programa 1D-COW permitió obtener un y_{DFL}^w alineado a y_{DAD} , y el parámetro de alineación *warping*. Cuando se obtuvo una alineación no satisfactoria, se ajustaron de manera iterativa el segmento y la dilatación hasta lograr los resultados esperados. Una explicación más detallada acerca del funcionamiento del 1D-COW puede encontrarse en el trabajo de Tomasi y colaboradores,¹⁰² mientras que el trabajo de Nielsen y colaboradores explica los fundamentos para la selección del segmento y dilatación óptimos.¹⁰³

5. Por medio de la función “cow_apply”, incluida en el programa 1D-COW, el *warping* obtenido al alinear y_{DFL} a y_{DAD} se aplicó a todas las columnas de la matriz CL-DFL ya interpolada.

6. Finalmente, la matriz CL-DAD y la matriz corregida CL-DFL se fusionaron, de manera de lograr un aumento en la dirección temporal (en columnas). La matriz resultante, CL-DAD-DFL se guardó en formato ASCII para su posterior análisis por MCR-ALS.

En la **Fig. 10** se presenta un diagrama ilustrativo del pre-tratamiento descrito.

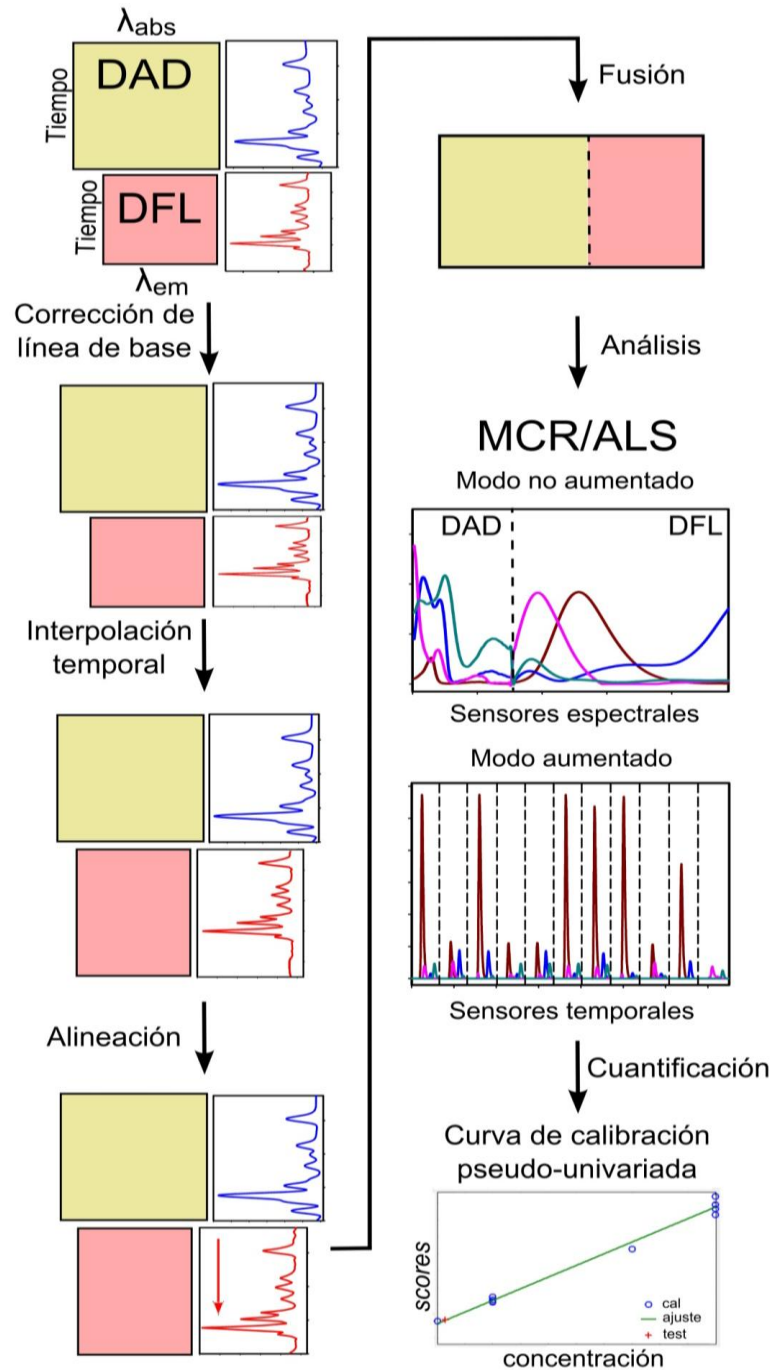


Fig. 10: Metodología de pre-tratamiento y análisis de los datos de segundo orden obtenidos.

Cabe destacar que si se presentaran diferencias de intensidad significativas entre CL-DAD y CL-DFL sería necesario un paso adicional de

escalado previo a la fusión. Sin embargo, la aplicación de este último paso no fue necesaria en ninguno de los sistemas evaluados en el presente trabajo.

Análisis de los datos

Los datos se modelaron empleando MCR-ALS. Para cada uno de los sistemas estudiados se construyeron tres calibraciones de segundo orden: una calibración a partir de los datos de CL-DAD, una a partir de los datos de CL-DFL, y finalmente, una a partir de los datos fusionados. En todos los casos el algoritmo se aplicó aumentando en el modo temporal, de manera de preservar la bilinealidad de los datos. Las matrices aumentadas se obtuvieron a partir de cada una de las muestras de validación y todas las muestras de calibración.

El número de componentes se determinó por PCA, obteniendo resultados concordantes con la constitución de cada sistema. MCR-ALS se inicializó empleando los perfiles espectrales estimados por un algoritmo multivariado que extrae el espectro de cada componente puro a partir de una serie de espectros de mezclas de composición variada,⁸¹ y se aplicaron las siguientes restricciones: (1) no negatividad en ambos modos, (2) unimodalidad en cada perfil del modo temporal, (3) correspondencia entre componentes y muestras⁶⁷ y (4) correlación entre concentraciones y áreas bajo los perfiles temporales.¹⁰⁴

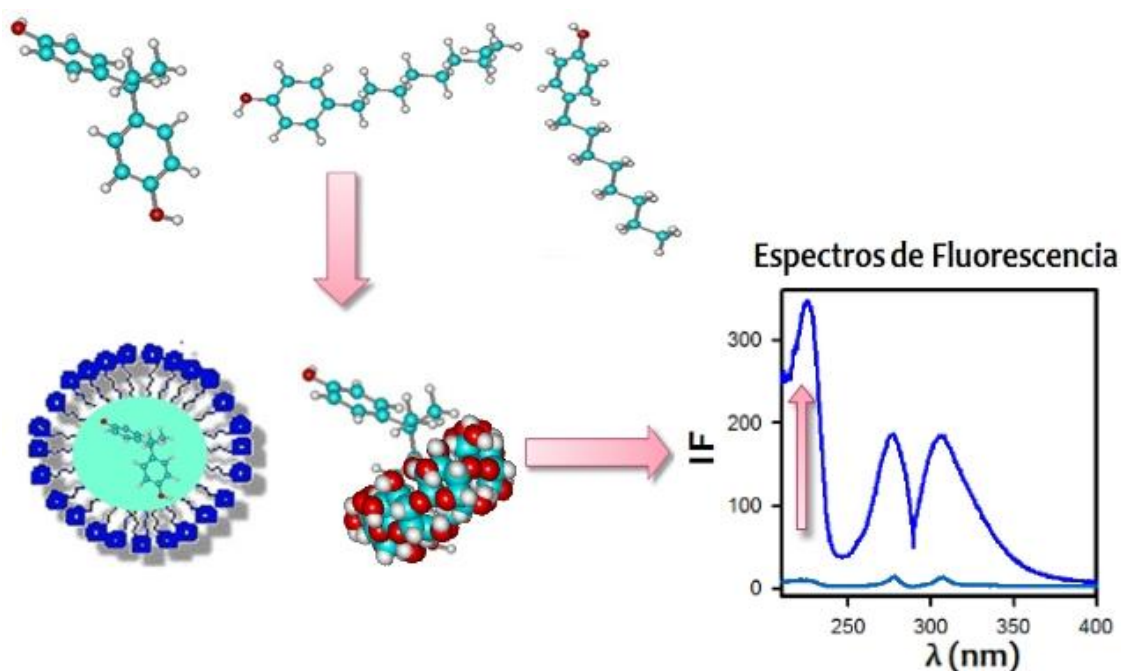
Se estableció como criterio de convergencia una variancia relativa entre iteraciones sucesivas del 0.01%, alcanzada en todos los casos en menos de 50 ciclos de iteración. Una vez lograda la convergencia por ALS, los analitos se identificaron por sus perfiles espectrales y se cuantificaron por medio de sus correspondientes curvas pseudo-univariadas.



RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Estudio espectrofluorimétrico de DEs en presencia de ciclodextrinas



En una primera etapa del presente trabajo de tesis, se estudiaron tres DEs derivados del fenol: BPA, OP y NP. Como se mencionó previamente, estos compuestos exhiben una baja señal fluorescente en medio acuoso. Sin embargo, existen estudios sobre el incremento de la señal fluorescente de BPA en presencia de β -CD. En base a esto, y con el propósito de optimizar las señales de fluorescencia de los analitos en estudio y emplearlas en el desarrollo de metodologías analíticas amigables con el ambiente, se evaluaron dichas señales en presencia de medios organizados.

Inicialmente, se estudió la interacción de los analitos con diferentes CDs nativas y derivatizadas, y con medios micelares formados por

surfactantes neutros, aniónicos y catiónicos. Se demostró que las señales fluorescentes de BPA, OP y NP en agua aumentan significativamente en presencia de β -ciclodextrinas nativas y modificadas, sugiriendo la formación de complejos de inclusión. Se determinaron las estequiometrías y constantes de formación de dichos complejos. Por otro lado, se investigó el cambio en la intensidad de fluorescencia en función del pH de BPA, NP y OP evaluando las constantes de acidez de los analitos en presencia y ausencia de CDs. A partir de estos resultados, y mediante análisis de ^1H -RMN y cálculos semiempíricos se propusieron posibles estructuras de los complejos DE-CD. Finalmente, teniendo en cuenta los estudios realizados, se establecieron las condiciones de trabajo óptimas para la determinación espectrofluorimétrica de BPA, OP y NP en presencia de medios organizados, se construyeron las respectivas curvas de calibración univariadas y se calcularon las correspondientes cifras de mérito.

Espectros de fluorescencia

Los espectros de fluorescencia de los DEs estudiados presentan dos máximos de excitación, a 220 nm y a 278 nm, y un máximo de emisión a 307 nm (**Fig. 11**). Como puede observarse, estos DEs poseen una baja intensidad de fluorescencia en solución acuosa (principalmente el BPA), sus espectros son muy similares y se superponen con la banda Raman del agua (marcada con líneas punteadas negras en el recuadro).

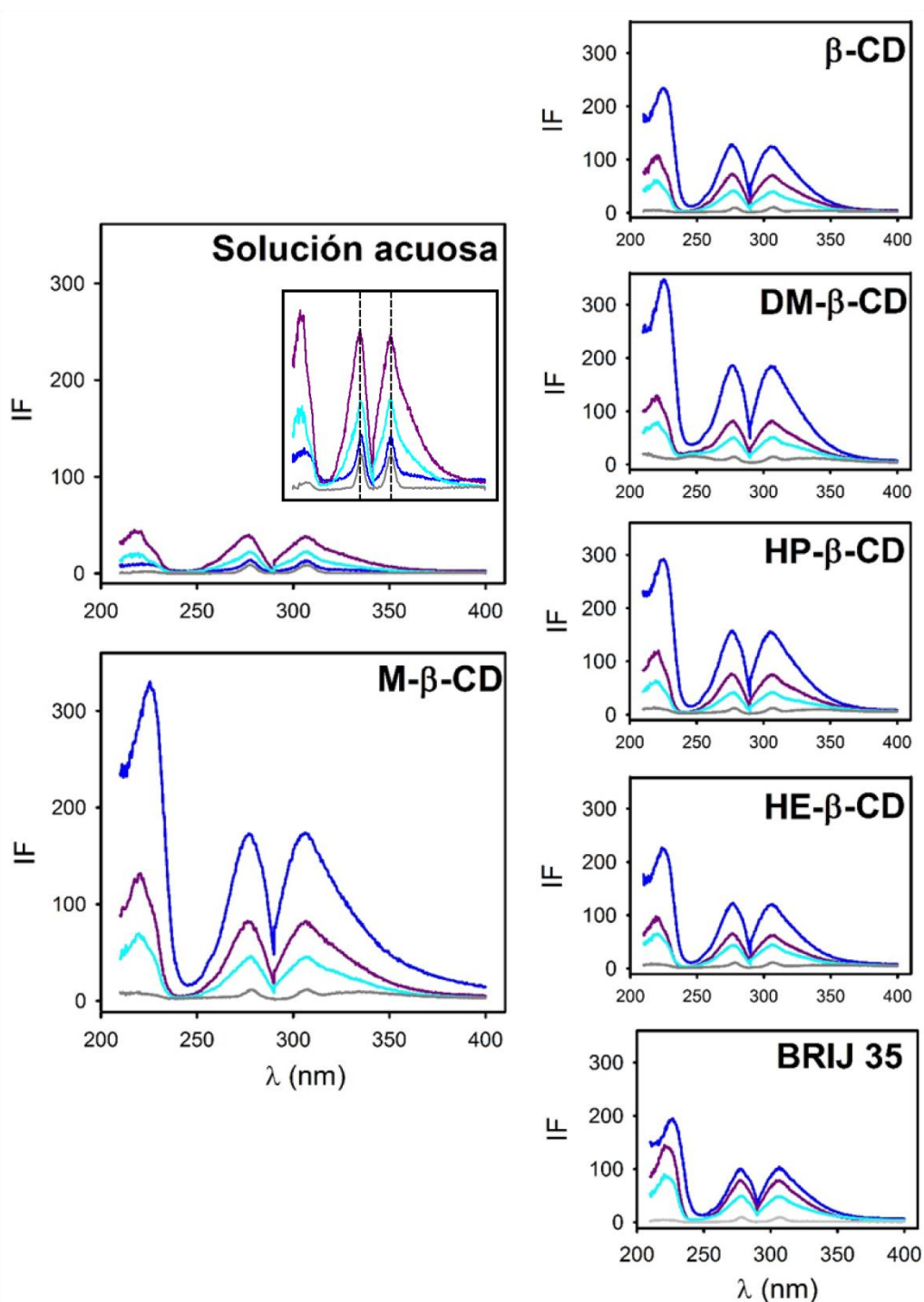


Fig. 11: Espectros de excitación y emisión de BPA (azul), OP (violeta), NP (celeste) y blancos (gris), en ausencia y en presencia de diferentes CDs y BRIJ 35 ($C_{DEs} = 500 \text{ ng mL}^{-1}$; $C_{CD} = C_{BRIJ} = 2 \times 10^{-3} \text{ M}$). **Recuadro:** ampliación de los espectros de los analitos en ausencia de CDs. En líneas punteadas negras se marcan las bandas RAMAN del agua.

También puede apreciarse en la figura que la presencia de β -CDs, nativa y sustituidas, y Brij 35 genera un aumento de la señal fluorescente,

de diferente magnitud, dependiendo del medio organizado evaluado. Este incremento de la fluorescencia sugiere la formación de complejos de inclusión entre los analitos y las CDs, permitiendo determinar experimentalmente sus constantes de formación.

No se presentan los espectros de los analitos en presencia de α -CD y γ -CD, ya que la adición de estas CDs no generó una variación significativa en la intensidad de dichos espectros. Esto sugiere que sólo β -CD y sus derivados tienen el tamaño de cavidad apropiado para la formación de complejos de inclusión con los analitos. Con respecto a los surfactantes estudiados, solamente Brij 35 tuvo un efecto exaltador en la fluorescencia de los DEs, pero de menor magnitud al logrado en presencia de β -CD, por lo que no se lo empleó en las etapas posteriores de este trabajo.

Complejos de inclusión DE-CD

Los experimentos se realizaron a pH neutro ya que, como se demostrará más adelante, en estas condiciones la intensidad de fluorescencia es máxima y los DEs estudiados se encuentran en su estado no ionizado, favoreciendo la interacción con la cavidad hidrofóbica de las CDs.¹⁰⁵

En la **Fig. 12** se muestran las curvas de intensidad de fluorescencia corregida en función de la concentración de CD. El ajuste de los datos experimentales permitió determinar las constantes de inclusión de los tres analitos con β -CD, M- β -CD, DM- β -CD, HE- β -CD y HP- β -CD.

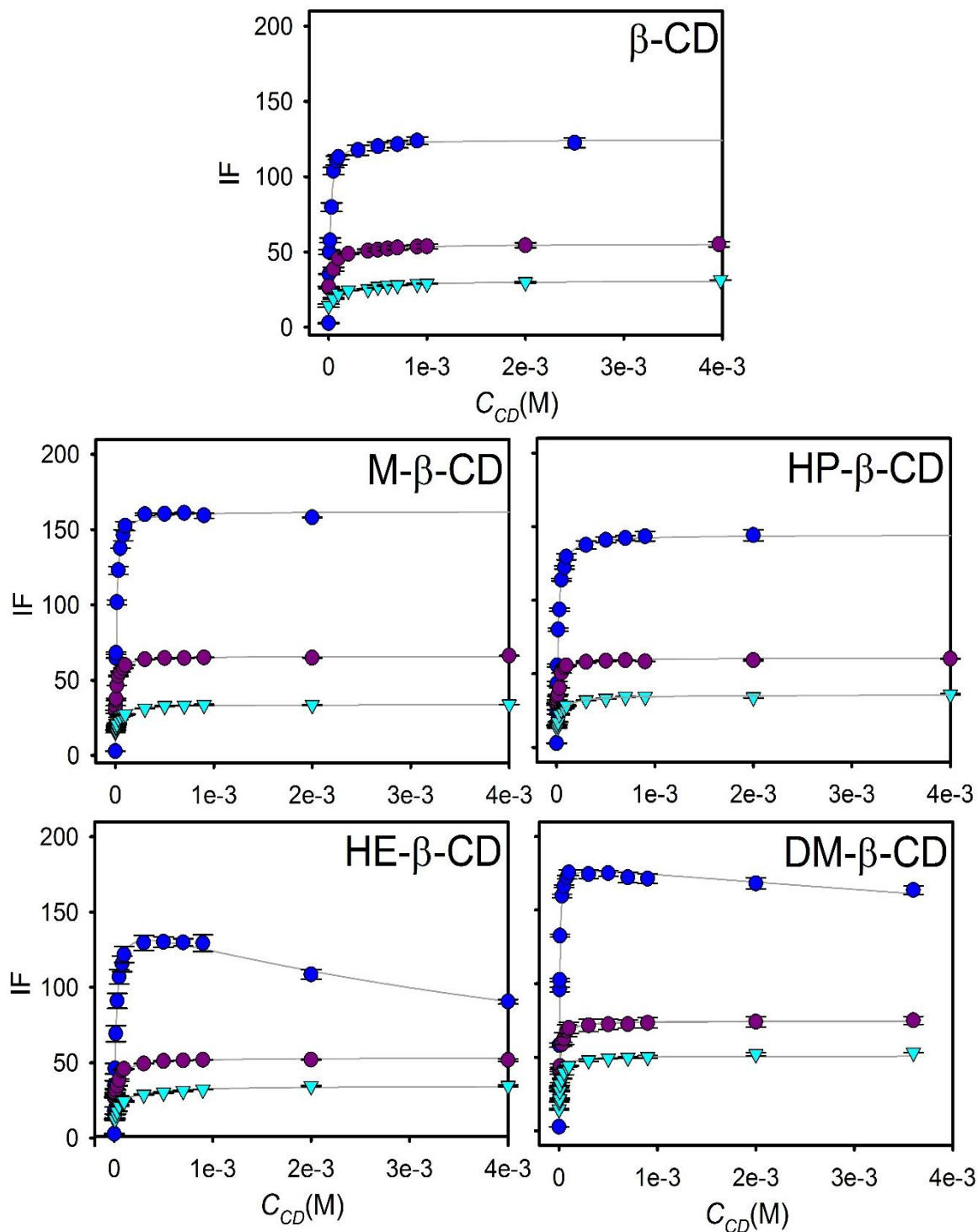
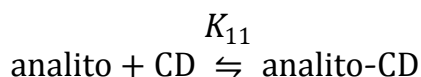


Fig. 12: Efecto de la concentración de CDs en la intensidad de la emisión fluorescente a 307 nm para BPA (azul), OP (violeta) y NP (celeste), con $C_{BPA} = C_{OP} = C_{NP} = 500 \text{ ng mL}^{-1}$; $\lambda_{ex} = 278 \text{ nm}$. Las líneas sólidas representan el ajuste no-lineal de los datos experimentales.

Como puede observarse en la figura, en la mayoría de los casos, los primeros agregados de CD a las soluciones de DEs generan un marcado

aumento de la señal fluorescente, y una vez que se alcanza el máximo, la señal permanece prácticamente constante. Este comportamiento es consistente con la formación de complejos de inclusión de estequiometría 1:1 analito-CD, según la reacción:



Dado que se verificó el cumplimiento de las condiciones mencionadas en la pág. 39, y que los espectros de absorción de los DEs no se modificaron significativamente en presencia de CD, los datos experimentales se ajustaron a la **Ec. 10** (pág. 38) mediante una regresión no lineal de mínimos cuadrados, obteniendo las respectivas K_{11} .

Los valores de K_{11} se estimaron también utilizando la ecuación de Benesi-Hildebrand (B-H) (**Ec. 11**, pág. 39). En la **Fig. 13** se muestran los gráficos de B-H para los complejos de los analitos con algunas de las CDs estudiadas.

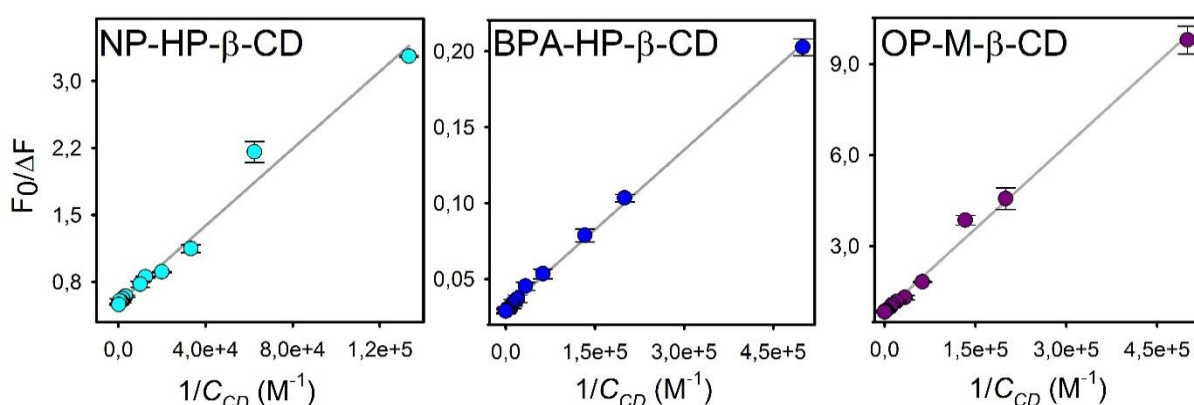


Fig. 13: Gráficos de Benesi-Hildebrand para los complejos NP-HP-β-CD, BPA-HP-β-CD y OP-M-β-CD. Las líneas sólidas corresponden al ajuste lineal de los datos.

Además, las constantes obtenidas por ambos métodos se presentan en la **Tabla 7**.

Tabla 7: Constantes de inclusión para los complejos DE-CD obtenidas mediante el ajuste no lineal (K_{11} y K'_{12}) y la ecuación de Benesi-Hildebrand (K_{11}^{B-H}).^a

	BPA			OP		NP	
	$\log K_{11}$	$\log K_{11}^{B-H}$	$\log K'_{12}$	$\log K_{11}$	$\log K_{11}^{B-H}$	$\log K_{11}$	$\log K_{11}^{B-H}$
β -CD	4,85 (4)	4,86 (4)	-	4,17 (4)	4,19 (2)	3,87 (4)	3,88 (6)
HE- β -CD	4,75 (1)	-	2,17 (3)	4,24 (6)	4,21 (3)	4,05 (5)	4,06 (2)
HP- β -CD	4,87 (2)	4,87 (1)	-	4,46 (6)	4,42 (7)	4,20 (6)	4,23 (3)
M- β -CD	5,03 (2)	5,01 (2)	-	4,69 (2)	4,67 (4)	4,42 (4)	4,40 (9)
DM- β -CD	5,33 (3)	-	1,52 (5)	4,77 (3)	4,73 (4)	4,76 (5)	4,74 (5)

^a Entre paréntesis se informan los desvíos estándar en la última cifra.

Los altos valores de las constantes de asociación obtenidos indican que existe una fuerte interacción entre los analitos y las CDs estudiadas. Esta interacción puede explicarse como resultado de la alta hidrofobicidad de los DEs, que favorece su inclusión en la cavidad no polar de las CDs. Además, la inclusión protege a los analitos de los procesos de desactivación no radiante, aumentando sus rendimientos cuánticos de fluorescencia. Este aumento de la señal fluorescente es particularmente elevado para el BPA, dando como resultado intensidades aproximadamente 60 veces mayores en presencia de β -CD y sus derivados, en relación a los valores en agua pura. En base a los resultados obtenidos, se puede enunciar que las CDs podrían

ser empleadas en el desarrollo de métodos fluorescentes verdes para la cuantificación de DEs.

Los valores de la constante para el complejo de inclusión BPA- β -CD informados en la literatura ($\log K_{11} = 4,54-5,1$)¹⁰⁶ son similares al obtenido en este trabajo. Para los sistemas restantes no se encontraron valores de constantes en la bibliografía.

Si comparamos las estabilidades de los complejos de BPA con diferentes CDs, concluimos que los formados con β -CD y sus derivados hidroxilados no muestran diferencias importantes, mientras que los complejos de los derivados metilados presentan constantes significativamente mayores. Esta diferencia podría ser el resultado de la combinación de dos efectos:

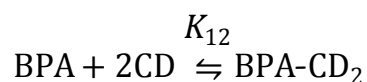
- Un efecto inductivo de los grupos metilo sobre los pares de electrones libres en el O-metilo, generando la formación de puentes de hidrógeno más fuertes con el grupo OH del fenol.
- La extensión de la cavidad no-polar de la CD generada por los sustituyentes alquílicos.

Por otro lado, las constantes de inclusión de complejos con OP son ligeramente menores que las de los complejos con BPA, pero levemente mayores que las de los complejos con NP. En los sistemas de OP y NP, la presencia de sustituyentes hidroxipropilo e hidroxietilo en las CDs tampoco genera diferencias significativas con respecto a los complejos con β -CD, mientras que los complejos formados con M- β -CD y DM- β -CD

muestran constantes apreciablemente mayores, sugiriendo participación de los grupos O-metilo en la formación de los complejos.

En la **Fig. 12** también podemos observar que las gráficas correspondientes a los complejos BPA-HE- β -CD y BPA-DM- β -CD no se comportan de la manera previamente descrita, sino que una vez alcanzada la máxima fluorescencia, el agregado de CD genera un descenso de la señal (más marcado en el caso de la HE- β -CD). Este descenso puede explicarse teniendo en cuenta la formación de complejos de estequiometría 1:2, los cuales parecen exhibir una menor fluorescencia.

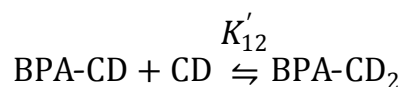
La formación de los complejos 1:2 está dada por el equilibrio:



donde K_{12} es la constante de formación acumulativa. Asumiendo la formación de estos complejos, y que su rendimiento cuántico de fluorescencia es despreciable, puede utilizarse la **Ec. 12** (pág. 39) para determinar las constantes de formación de los complejos 1:1 y 1:2. Al aplicar esta expresión para los sistemas BPA-HE- β -CD y BPA-DM- β -CD, se obtienen muy buenos ajustes, que sugieren la presencia de complejos de estequiometría 1:2.

Es importante tener en cuenta que las K_{12} calculadas están definidas como constantes globales, de manera que incluyen al proceso de formación de complejos 1:1 y complejos 1:2. Es por esto que para poder determinar

cuál de los dos complejos es más estable es necesario definir la constante de formación parcial:



K'_{12} se calculó a partir de K_{11} y K_{12} , y los valores obtenidos se presentan en la . Los bajos valores observados para las K'_{12} sugieren una muy baja estabilidad de los complejos 1:2, que resulta razonable teniendo en cuenta las restricciones estéricas existentes. Es posible que estas restricciones generen un alejamiento del BPA de la cavidad no polar de la CD, desprotegiéndolo y generando una señal fluorescente menor a la observada cuando sólo se forma el complejo 1:1.

Además de las constantes de inclusión, se calcularon los cocientes de los rendimientos cuánticos entre los analitos complejados y libres, para todos los sistemas. Estos cocientes se presentan en la **Tabla 8** y muestran el incremento en la señal fluorescente de los DEs en presencia de las diferentes CDs. Puede observarse que el incremento de la señal es mucho mayor para BPA, cuya intensidad de fluorescencia nativa en solución acuosa es casi nula. Los rendimientos cuánticos de OP y NP son aproximadamente dos veces mayores cuando se encuentran incluidos en las CDs. En todos los casos, los mayores incrementos en la señal fluorescente se producen en presencia de DM- β -CD, seguidos por los complejos con M- β -CD.

Tabla 8: Cocientes de los rendimientos cuánticos de los complejos (ϕ_C) y DEs libres (ϕ_{DE}).

	BPA	OP	NP
	ϕ_C/ϕ_{DE}	ϕ_C/ϕ_{DE}	ϕ_C/ϕ_{DE}
β -CD	45,7 \pm 0,3	1,970 \pm 0,004	2,170 \pm 0,009
HE- β -CD	52,4 \pm 0,2	1,92 \pm 0,02	2,67 \pm 0,02
HP- β -CD	51,7 \pm 0,2	2,08 \pm 0,01	2,40 \pm 0,02
M- β -CD	58,1 \pm 0,2	2,203 \pm 0,006	2,151 \pm 0,009
DM- β -CD	67,1 \pm 0,4	2,671 \pm 0,009	3,48 \pm 0,02

Finalmente, en la **Tabla 9** se informan los valores calculados de los porcentajes de inclusión de los analitos en los diferentes complejos, para una concentración de CD 2×10^{-3} M. Este porcentaje representa la fracción de analito incluido en la CD con respecto a su concentración analítica. En estas condiciones, el porcentaje de inclusión es cercano al 100% en todos los casos, con excepción del sistema BPA-HE- β -CD, donde una fracción importante del BPA se encuentra formando el complejo 1:2.

Tabla 9: Porcentaje de inclusión de los analitos en las diferentes CDs.

	BPA		OP	NP
	%(C ₁)	%(C ₂)	%	%
β -CD	99	-	98	94
HE- β -CD	77	23	97	97
HP- β -CD	99	-	98	97
M- β -CD	100	-	99	99
DM- β -CD	94	6	99	99

C₁: complejo de estequiometría 1:1. C₂: complejo de estequiometría 1:2.

Constantes de acidez de los DE

En las Fig. 14, 15 y 16 se muestran los gráficos de las titulaciones espectrofluorimétricas de BPA, OP y NP en solución acuosa, en ausencia y en presencia de CDs (sólo se muestran los gráficos de una CD, como ejemplo), así como también el ajuste de los datos experimentales obtenido con el programa PKFIT, y las gráficas de distribución de especies a los diferentes pH.

En todos los sistemas la señal fluorescente es máxima y se mantiene prácticamente constante a pH menores a 9, decreciendo al acercarse a valores de pH más alcalinos.

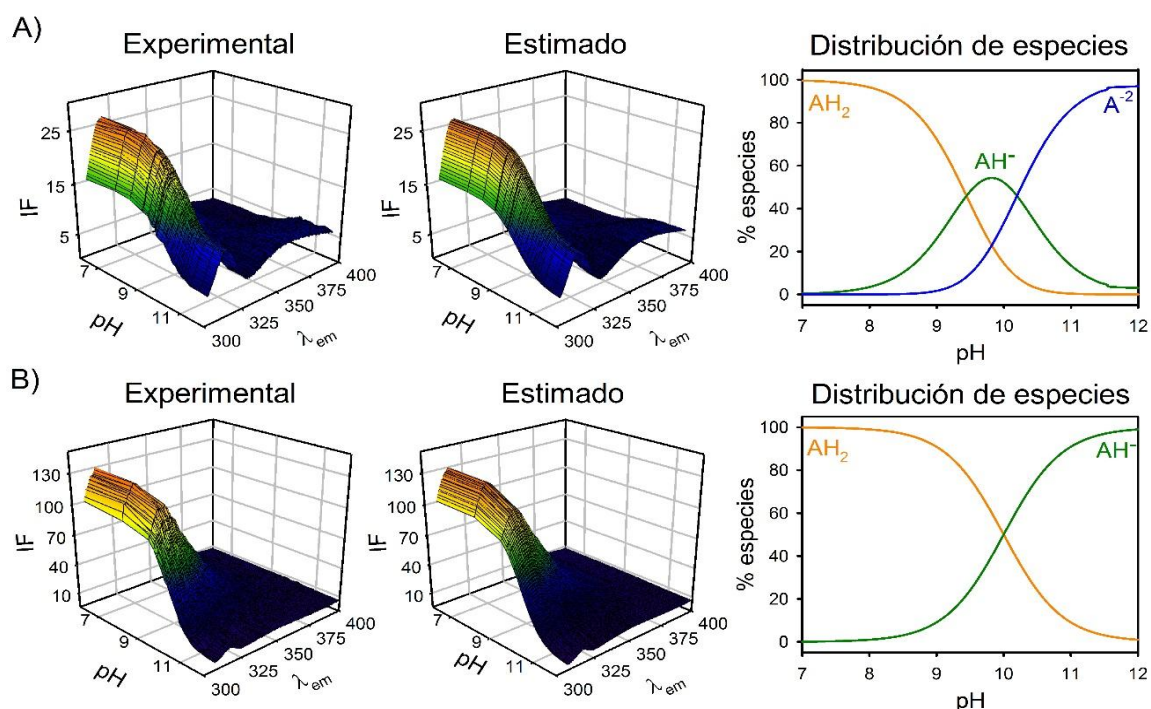


Fig. 14: Gráficos experimentales y estimados de intensidad de fluorescencia en función del pH y λ_{em} y distribución de especies vs pH de BPA en solución acuosa (A), y en presencia de HP- β -CD (B).

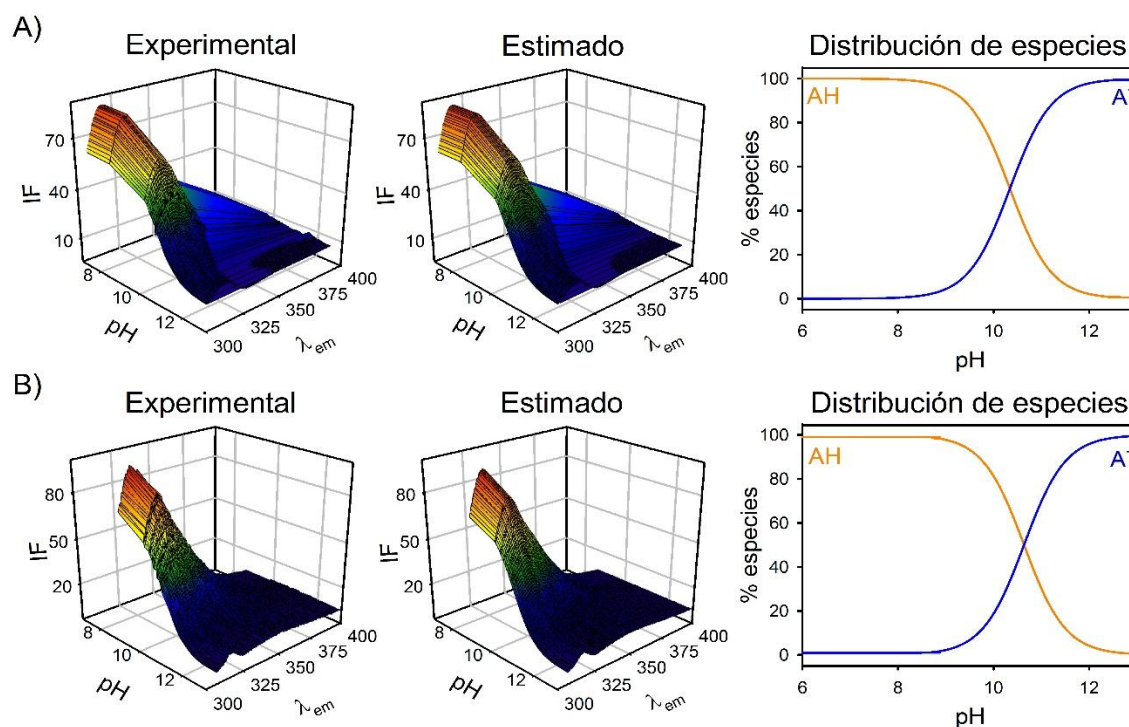


Fig. 15: Gráficos experimentales y estimados de intensidad de fluorescencia en función del pH y λ_{em} y distribución de especies vs pH de OP en solución acuosa (A), y en presencia de M- β -CD (B).

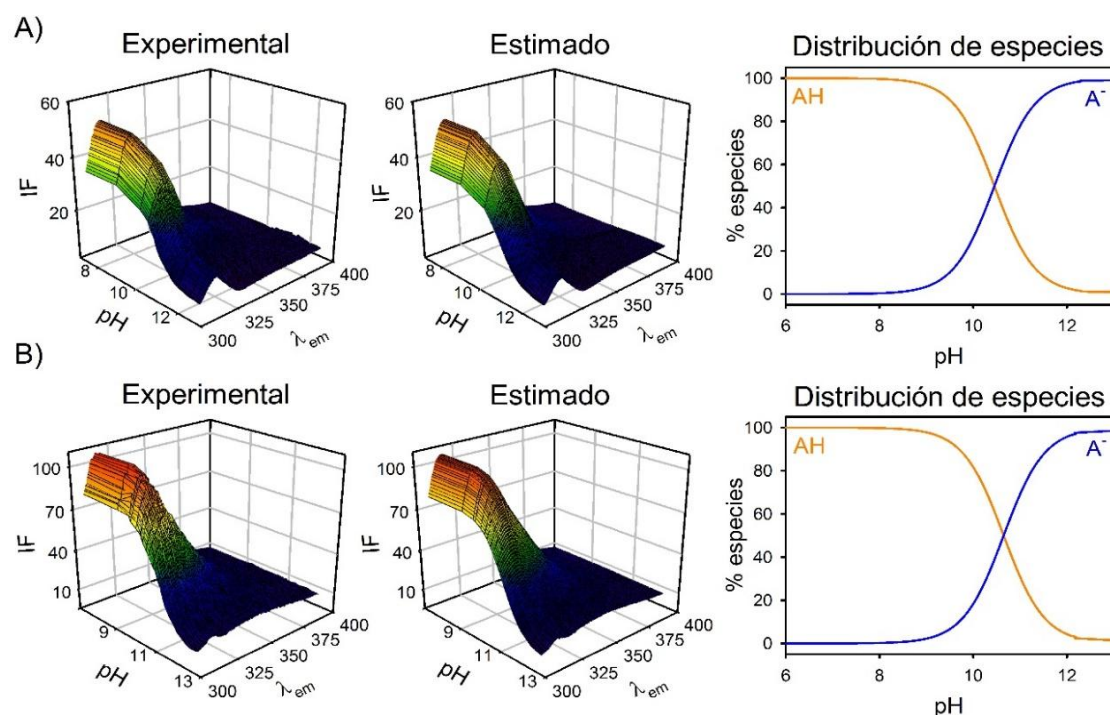


Fig. 16: Gráficos experimentales y estimados de intensidad de fluorescencia en función del pH y λ_{em} y distribución de especies vs pH de NP en solución acuosa (A), y en presencia de DM- β -CD (B).

En la **Tabla 10** se muestran las constantes ácidas de los analitos en solución acuosa tanto en ausencia como en presencia de las diferentes CDs estudiadas.

Si comparamos los valores de constantes de acidez obtenidos para los diferentes analitos en solución acuosa con los obtenidos en presencia de CDs, podemos inferir la ubicación de los grupos ionizables cuando los analitos están formando parte de los complejos, es decir, si estos grupos se encuentran o no incluidos en la cavidad de la CD.

Para asegurar un grado de inclusión de los analitos de aproximadamente el 100%, y de esta manera poder afirmar que los pK_a determinados corresponden a los analitos complejados, los experimentos se llevaron a cabo utilizando una concentración de CD de 2×10^{-3} M.

Tabla 10: Constantes de acidez (pK_a) de los DE libres y formando complejos con las diferentes β -CDs.^a

	BPA		OP	NP
	pK_a		pK_a	pK_a
Ausencia de CD	9,43 (3)	10,18 (1)	10,36 (3)	10,450 (4)
β -CD	9,9 (1)		10,41 (1)	10,41 (6)
HE- β -CD	10,16 (3)		10,41 (3)	10,37 (2)
HP- β -CD	10,01 (1)		10,40 (8)	10,35 (1)
M- β -CD	10,39 (5)		10,57 (9)	10,53 (2)
DM- β -CD	10,66 (2)		10,65 (5)	10,65 (4)

^a Desvios estándar en la última cifra entre paréntesis.

BPA posee dos grupos ionizables, por lo que en ausencia de CD se observan dos procesos de deprotonación, con valores de pK_a muy cercanos entre sí. En cambio, al formarse los complejos de inclusión sólo se pudo determinar una constante de acidez, sugiriendo que uno de los anillos fenólicos permanece fuera de la cavidad de la CD y el otro se encuentra incluido, impidiendo su deprotonación.

En el sistema BPA- β -CD, el valor de pK_a calculado es similar al pK_{a1} del BPA libre, mientras que para los complejos formados con las β -CD sustituidas, estos valores son ligeramente mayores, detectándose una diferencia más marcada en el caso del complejo BPA-DM- β -CD. Estos resultados sugieren una interacción entre el grupo fenólico externo del BPA y los sustituyentes de la CD. Cabe mencionar que la baja proporción de BPA que se encuentra formando complejos 1:2 en los sistemas BPA-HE- β -CD y BPA-DM- β -CD no parece mostrar una influencia significativa en los valores de las constantes determinadas.

Por otro lado, las constantes de acidez de OP y NP en presencia de CDs no difieren significativamente de las determinadas en su ausencia, lo que indicaría que los anillos aromáticos y los grupos hidroxilo de estos analitos no se encuentran incluidos en la cavidad de las CDs.

Estructura de los complejos de inclusión

Con el fin de evaluar las posibles estructuras de los diferentes complejos de inclusión formados, se registraron los espectros de ^1H -RMN

de los analitos puros y en presencia de β -CD, β -CD con sustituyentes O-metilo (M- β -CD) y β -CD hidroxilada (HE- β -CD), analizando en cada caso los desplazamientos químicos de las señales de los hidrógenos.

Por otro lado, mediante el programa AM1, se realizaron cálculos semiempíricos de orbitales moleculares para optimizar las diferentes estructuras propuestas. En una primera etapa se optimizaron los analitos y las CDs por separado, y posteriormente se utilizaron estas moléculas optimizadas para formar los complejos y refinar sus geometrías. Los cálculos se realizaron considerando un entorno acuoso. Todas las optimizaciones se llevaron a cabo empleando diferentes modos iniciales de inclusión.

En la **Fig. 17** se detalla la numeración de H para cada DE. Por otro lado, en la **Fig. 18** se muestran sus espectros ^1H -RMN en ausencia de CDs.

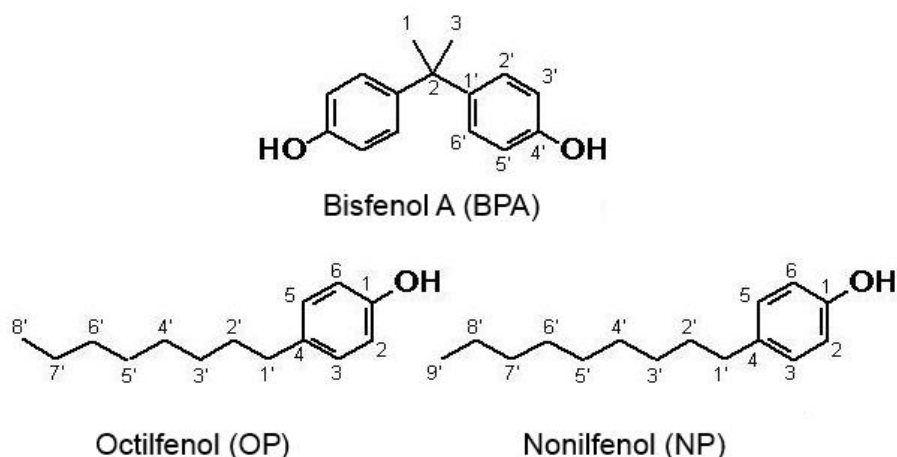


Fig. 17: Numeración de los protones de los analitos para el estudio de ^1H -RMN.

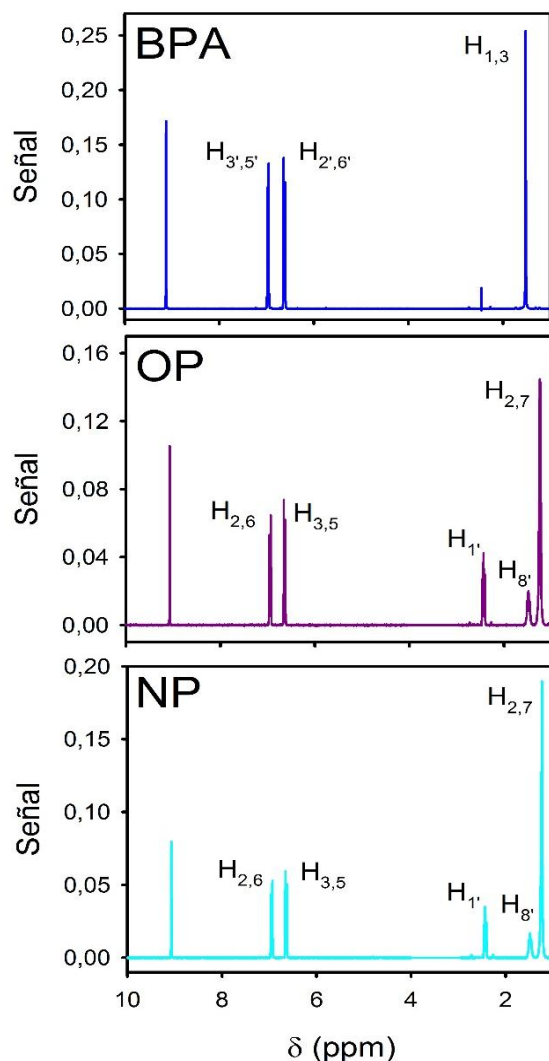


Fig. 18: Espectros de ^1H -RMN de los analitos en DMSO, y asignaciones de las señales presentes.

Al comparar los espectros de la **Fig. 18** con los obtenidos en presencia de CD (no mostrados) se observó que la formación de los complejos produce variaciones en algunos de los desplazamientos químicos, sin modificar sus constantes de acoplamiento. Debido al rápido intercambio entre ambas especies en ningún caso se observaron simultáneamente señales correspondientes a los analitos libres y complejados.

En la **Tabla 11** se presentan los datos de los desplazamientos medidos para el BPA libre y en presencia de CDs. Cabe destacar que si bien las diferencias presentes en los desplazamientos parecen muy bajas (del orden de la centésima de ppm), estos corrimientos se consideran significativos en sistemas como los estudiados en el presente trabajo de tesis.¹⁰⁷

Tabla 11: Desplazamientos químicos (δ_H) en ppm de los protones de BPA libre y en la presencia de diferentes β -CDs, en DMSO.

	BPA		
	H _{3',5'}	H _{2',6'}	H _{1,3}
δ_{DE}	6,9706	6,6254	1,5225
$\delta_{DE/\beta CD}$	6,9652	6,6204	1,5163
$\delta_{DE/M-\beta CD}$	6,9662	6,6277	1,5209
$\delta_{DE/HE-\beta CD}$	6,9611	6,6158	1,5146

Como puede observarse, en el sistema de BPA, la presencia de todas las CDs ensayadas produce corrimientos leves de los δ_H hacia campos mayores, sugiriendo que en los complejos 1:1 uno de los anillos fenólicos se encuentra incluido en la cavidad de la CD, y el puente entre ambos fenilos se encuentra involucrado en la formación del complejo.

Estudios previos realizados por otros autores concluyen que el BPA se encuentra incluido en la cavidad hidrofóbica de la β -CD, adoptando diferentes conformaciones. Estas estructuras están en equilibrio, pero en todos los casos la interacción involucra a uno de los anillos aromáticos y a los metilos del BPA.^{105, 108} Las estructuras obtenidas mediante la optimización AM1 coinciden con estas conclusiones, obteniéndose para

todos los complejos BPA-CD valores de calores de formación ΔH_f negativos. En la **Fig. 19** se muestra, como ejemplo, la estructura optimizada del complejo BPA-M- β -CD.

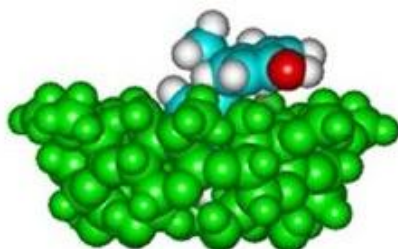


Fig. 19: Estructura optimizada mediante cálculos AM1 para el complejo BPA-M- β -CD.

En el caso de los complejos de NP y OP, se pueden proponer dos tipos de conformaciones (**Fig. 20**):

- Inclusión de la cadena alquílica, al que llamaremos modo “cola”.
- Inclusión del anillo fenólico, al que llamaremos modo “cabeza”.

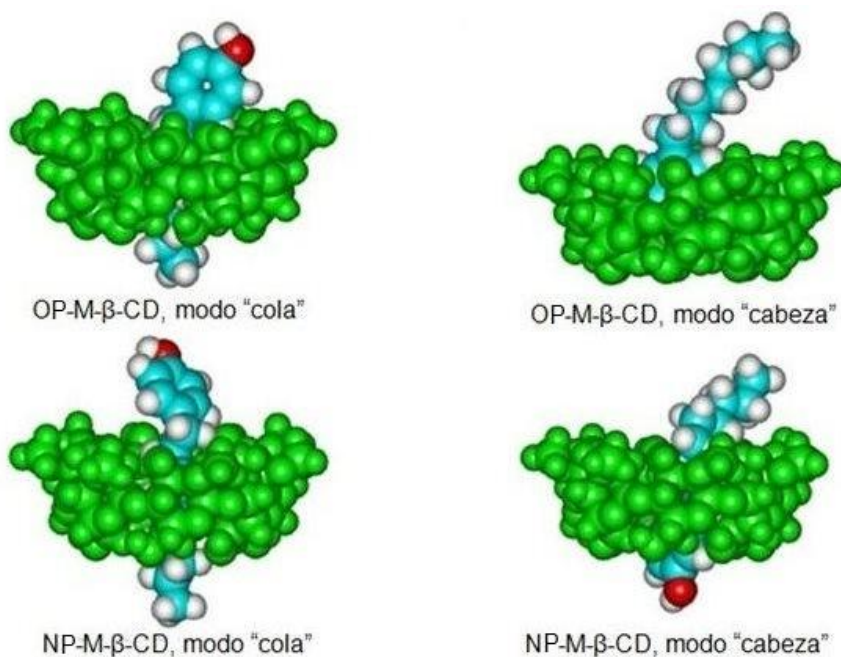


Fig. 20: Estructuras optimizadas mediante cálculos AM1 para los complejos de inclusión OP-M- β -CD y NP- β -CD.

Con el fin de determinar cuál de las dos conformaciones propuestas es la más probable, se analizaron los δ_H de los hidrógenos para el OP y el NP, en ausencia y presencia de CDs (**Tabla 12**).

Se observa que los desplazamientos de los H aromáticos no se modifican en presencia de CD, mientras que se producen leves pero significativos corrimientos de los δ_H de los H de las cadenas alquílicas. Esto indica la presencia de interacciones dispersivas entre las cadenas alifáticas de los compuestos y las cavidades no polares de las CDs, sugiriendo que estos complejos se forman en modo “cola”.

Tabla 12: Desplazamientos químicos (δ_H) en ppm de los protones de OP y NP libres y en la presencia de diferentes β -CDs, en DMSO.

	OP				
	H _{3,5}	H _{2,6}	H _{1'}	H _{2'-7'}	H _{8'}
δ_{DE}	6,6417	6,9481	2,4331	1,2428	1,4847
$\delta_{DE/\beta CD}$	6,6363	6,9423	2,4237	1,2287	1,4758
$\delta_{DE/M-\beta CD}$	6,6431	6,9405	2,4271	1,2375	1,4783
$\delta_{DE/HE-\beta CD}$	6,6265	6,9317	2,4232	1,2349	1,4753
	NP				
	H _{3,5}	H _{2,6}	H _{1'}	H _{2'-8'}	H _{9'}
δ_{DE}	6,6413	6,9473	2,4326	1,2324	1,4822
$\delta_{DE/\beta CD}$	6,6365	6,9424	2,4248	0,1224	1,4753
$\delta_{DE/M-\beta CD}$	6,6433	6,9398	2,4279	1,2317	1,4768
$\delta_{DE/HE-\beta CD}$	6,6221	6,9296	2,4223	1,2245	1,4730

En la **Tabla 13** se informan los valores de calores de formación (ΔH_f) obtenidos con el programa AM1 para los diferentes complejos en los dos modos propuestos.

En todos los casos, el modo “cola” resulta ser la conformación con valores de ΔH_f más negativos. Teniendo en cuenta los resultados de las determinaciones de pKa, $^1\text{H-RMN}$ y cálculos semiempíricos realizados, se concluye que en los complejos formados con OP y NP, las cadenas alquílicas se encuentran incluidas en la cavidad de la CD, mientras que el anillo fenólico permanece excluido. Esta conclusión coincide con la estructura establecida por Bonenfant y colaboradores para el complejo NP- β -CD en un estudio realizado con espectroscopías FT-IR y UV-Vis.¹⁰⁹

Tabla 13: ΔH_f de los complejos de inclusión de OP y NP en sus dos posibles modos, obtenidos a partir de cálculos semiempíricos.

	OP	NP
<i>β-CD</i>		
cabeza	-21,2Kcal mol ⁻¹	-29,6Kcal mol ⁻¹
cola	-84,5 Kcal mol ⁻¹	-57,6 Kcal mol ⁻¹
<i>HE-β-CD</i>		
cabeza	-25,9Kcal mol ⁻¹	-27,8 Kcal mol ⁻¹
cola	-66,0Kcal mol ⁻¹	-88,4 Kcal mol ⁻¹
<i>HP-β-CD</i>		
cabeza	-22,9 Kcal mol ⁻¹	-20,8 Kcal mol ⁻¹
cola	-83,0 Kcal mol ⁻¹	-109,9 Kcal mol ⁻¹
<i>M-β-CD</i>		
cabeza	-35,0 Kcal mol ⁻¹	-107,4 Kcal mol ⁻¹
cola	-78,5 Kcal mol ⁻¹	-136,8 Kcal mol ⁻¹
<i>DM-β-CD</i>		
cabeza	-49,2 Kcal mol ⁻¹	-57,5 Kcal mol ⁻¹
cola	-84,6 Kcal mol ⁻¹	-77,5 Kcal mol ⁻¹

Curvas de calibración univariadas

En base al incremento de la señal fluorescente de los analitos en presencia de CDs, se planteó la utilización de este recurso en el desarrollo

de un método analítico verde. Teniendo en cuenta que los complejos con M- β -CD muestran las señales de fluorescencia más intensas y, además, sólo se forman complejos con estequiometría 1:1, de altas estabilidades y rendimientos cuánticos elevados, se decidió utilizar dicha CD como medio organizado. Se seleccionó una concentración de CD tal que el grado de inclusión de los analitos fuera aproximadamente del 100% ($C_{CD} = 1 \times 10^{-3}$ M).

Se construyeron curvas de calibración univariadas para cada uno de los analitos, a dos longitudes de onda correspondientes a los máximos de excitación, en presencia y en ausencia de M- β -CD. Como el objetivo de este trabajo fue desarrollar metodologías para la cuantificación de DEs a niveles muy bajos, se trabajó con rangos de concentración acotados, sin determinar el límite superior del rango lineal.

En la Fig. 21 se presentan las curvas de calibración obtenidas para los tres analitos, tanto en presencia como en ausencia de M- β -CD, a una de las dos longitudes de onda de excitación ensayadas ($\lambda_{ex} = 278$ nm).

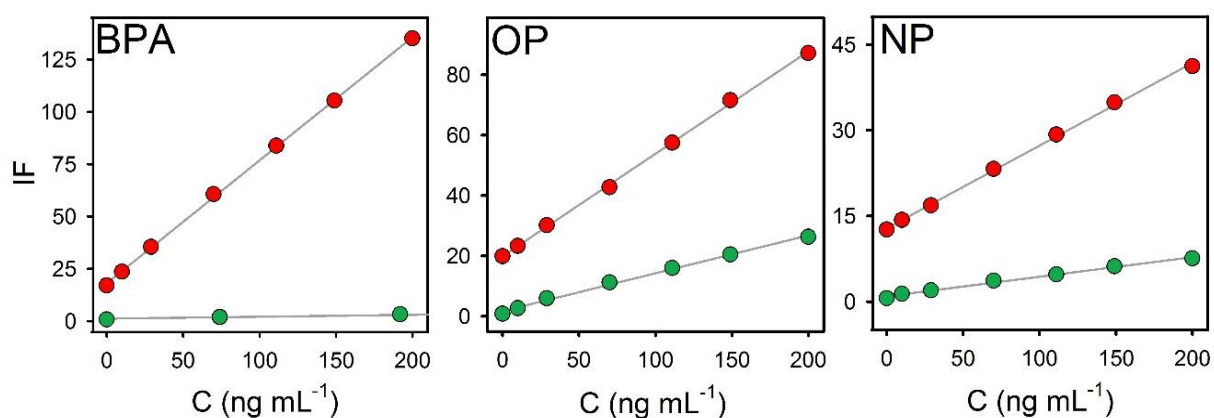


Fig. 21: Curvas de calibración univariadas de los DEs en presencia y ausencia de M- β -CD.

En la **Tabla 14** se presentan las cifras de mérito de todas las calibraciones realizadas. Cabe destacar que los LD y LC se determinaron utilizando las **Ec. 28 y 30**, de acuerdo a lo recomendado por la IUPAC.

Tabla 14: Cifras de mérito para las calibraciones univariadas de BPA, OP, y NP, en ausencia y presencia de M- β -CD.

	BPA		OP		NP	
	λ_{ex}		λ_{ex}		λ_{ex}	
	225 nm	278 nm	220 nm	278 nm	220 nm	278 nm
<i>Sin M-β-CD</i>						
IC ^a	0-1000	0-1000	0-200	0-200	0-200	0-200
R ^b	0,989	0,991	0,996	0,996	0,988	0,993
γ (ng ⁻¹ mL)	0,02	0,02	0,16	0,17	0,09	0,12
LD(ng mL ⁻¹)	128	115	15	13	25	20
LC (ng mL ⁻¹)	370	334	43	39	73	56
REP(%)	11	10	5,5	3,3	9,3	10,8
<i>Con M-β-CD</i>						
IC	0-200	0-200	0-200	0-200	0-200	0-200
R	0,999	0,999	0,999	0,999	0,998	0,998
γ (ng ⁻¹ mL)	0,55	0,3	0,37	0,3	0,14	0,23
LD(ng mL ⁻¹)	4	8	6	8	9	10
LC (ng mL ⁻¹)	12	22	18	22	25	29
REP(%)	1,8	2,2	3,6	2,6	3,2	5,8

^a Intervalo de calibración (ng mL⁻¹). ^b Coeficiente de correlación.

En base a los valores presentados en la tabla se puede afirmar que se obtuvieron excelentes resultados para los tres analitos en presencia de M- β -CD, con LDs entre 4 y 10 ng mL⁻¹ y errores relativos de entre 2-4% (n = 5). El efecto del agregado de M- β -CD es más pronunciado en el caso del BPA, generando límites 30 veces menores a los obtenidos en ausencia de medios organizados. Por otro lado, se observa que para los tres DEs, cuando se excita a la menor longitud de onda (λ_{ex} =220 nm para NP y OP, y 225 nm para el BPA), se obtienen menores límites y menores errores relativos.

Se han publicado numerosos artículos dedicados a la determinación de BPA y otros DEs en diferentes matrices. En un trabajo de revisión relativamente reciente se citaron más de 40 referencias relacionadas con el análisis de BPA en bebidas, alimentos y muestras ambientales, usando sensores de distinta naturaleza.⁵² En estos trabajos se exponen un amplio rango de LDs, incluyendo valores entre 1×10^{-5} y 50 ng mL⁻¹.

También se informó un método selectivo pero no muy sensible (LD = 120 ng mL⁻¹) para detectar BPA basado en nanopartículas de oro superficialmente impresas y dispersión RAMAN de superficie mejorada.¹¹⁰ En otra publicación se determinó BPA, NP y OP en muestras de agua utilizando microextracción dispersiva líquido-líquido iónico seguida de análisis cromatográfico, lográndose LDs en el rango 0,23-0,48 ng mL⁻¹.¹⁵

Finalmente, Lisboa y colaboradores determinaron BPA, NP y OP en muestras de agua de mar mediante una pre-concentración en cartuchos de

C18, seguida del análisis por CLAE ultra rápida, obteniendo LDs de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$.¹¹¹

Si comparamos estos resultados con los determinados en el presente trabajo, las cifras de mérito obtenidas son muy satisfactorias, y más aun teniendo en cuenta que en todos los trabajos previamente citados los LDs se calcularon considerando una relación señal/ruido de 3, mientras que los informados en el presente estudio se determinaron de acuerdo a una definición más rigurosa.

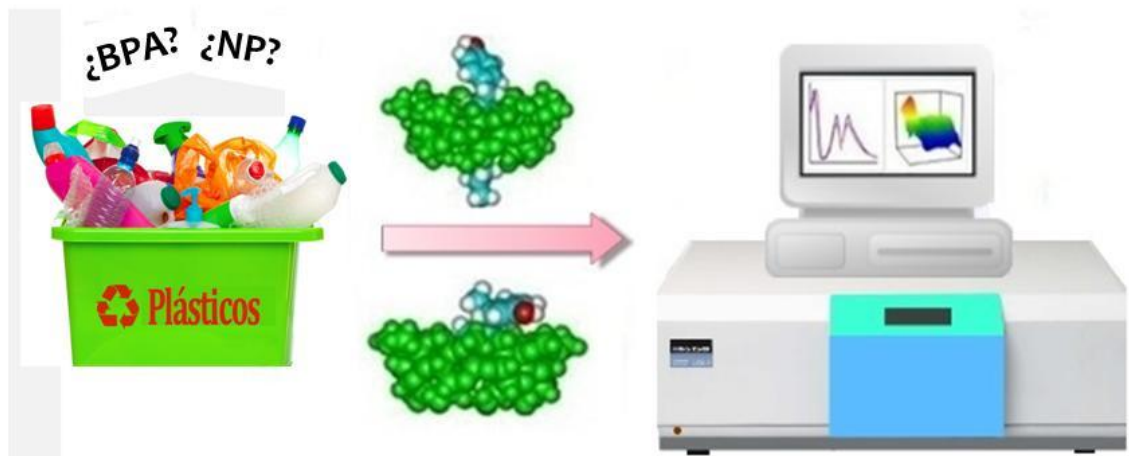
Conclusiones parciales

En la primera etapa del estudio realizado se demostró que las bajas intensidades de fluorescencia de BPA, OP y NP se incrementaron en presencia de diferentes β -CDs. Este importante incremento en la señal fluorescente se debe a la formación de complejos de inclusión entre las CDs y los DEs estudiados.

Los diferentes experimentos diseñados permitieron determinar la estequiometría, geometría y estabilidad de los complejos formados, y optimizar las condiciones experimentales para maximizar la intensidad de fluorescencia de los analitos.

El incremento de la señal fluorescente observado se empleó como estrategia en el desarrollo de un método analítico univariado para la determinación de los tres DEs estudiados, trabajando bajo los principios de la QAV.

4.2 Determinación simultánea de BPA y NP en envases plásticos



Con el objetivo de desarrollar un método analítico verde y simple para la determinación simultánea de BPA y NP en muestras de plásticos, se planteó combinar la alta sensibilidad de la fluorescencia en presencia de medios organizados con la selectividad de la calibración multivariada. Por tal motivo, se registraron MEEFs en presencia de M- β -CD, bajo las condiciones experimentales optimizadas en la primera etapa de esta tesis. A modo comparativo, los datos de segundo orden obtenidos se procesaron con diferentes algoritmos (PARAFAC, U-PLS y N-PLS). Las calibraciones construidas con cada algoritmo se emplearon para predecir las concentraciones de un conjunto de muestras de validación.

Se optimizaron las condiciones de pre-tratamiento de las muestras reales (solvente, tiempo y temperatura de extracción) mediante ensayos de recuperación. Una vez seleccionadas estas condiciones, se analizaron 15

muestras de plásticos de diferente composición y procedencia (botellas de bebidas, bandejas de comida y cubiertos descartables, juguetes).

Los resultados obtenidos empleando el método propuesto se validaron frente a un método de referencia utilizando CLAE.

Comportamiento fluorescente de BPA y NP

Las condiciones experimentales, en relación al medio organizado exaltador de la señal fluorescente y al pH de trabajo, se seleccionaron de acuerdo a los resultados obtenidos en la primera etapa de la investigación: las soluciones de BPA y NP se prepararon en presencia de M- β -CD 1×10^{-3} M, a pH neutro (pág. 118). Además, teniendo en cuenta que en algunos sistemas un descenso de la temperatura produce un aumento en la intensidad de la señal fluorescente,¹¹² se evaluaron dos posibles temperaturas de trabajo: 25 °C y 5 °C.

En la **Fig. 22** se muestran los espectros de excitación-emisión de los dos analitos y el blanco, a las dos temperaturas evaluadas. Puede observarse que la emisión de ambos analitos aumenta al bajar la temperatura (más marcadamente en el caso del BPA), mientras que la señal del blanco permanece constante. En base a estos resultados se decidió trabajar a 5 °C, ya que el aumento de las señales de los analitos permitiría obtener un método más sensible.

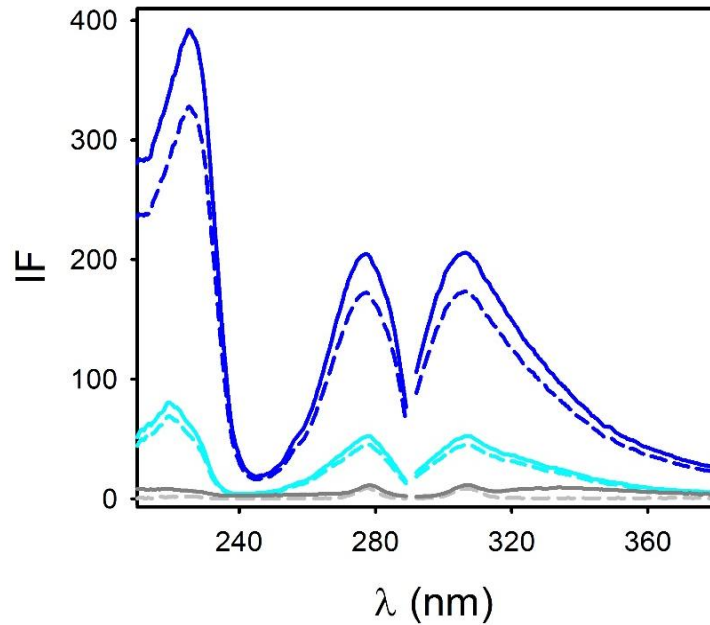


Fig. 22: Espectros de excitación-emisión de BPA (en azul), NP (en celeste) y señal del blanco (en gris), a 25 °C (líneas continuas) y 5 °C (líneas discontinuas).

Por otro lado, en la **Fig. 23** se presentan los espectros de excitación y emisión normalizados de los DEs estudiados.

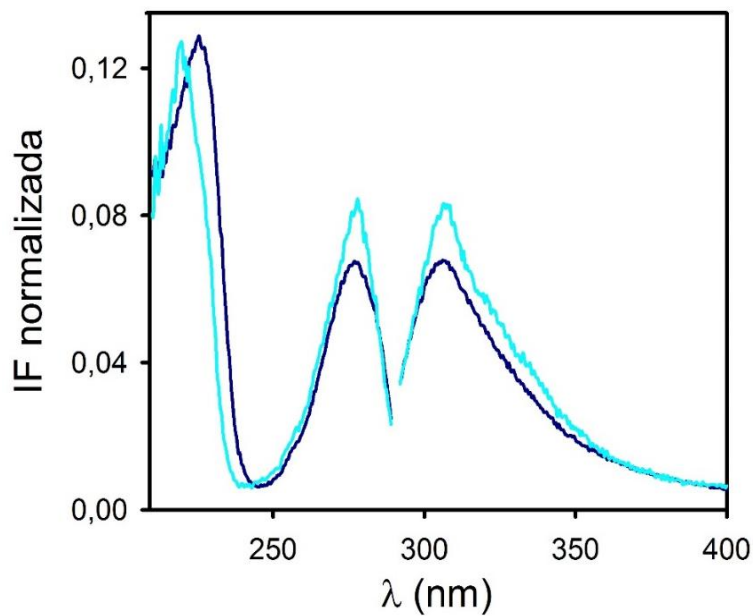


Fig. 23: Espectros de excitación y emisión de fluorescencia normalizados de BPA y NP.

Como puede verse, existe un importante solapamiento entre ellos que impide su determinación simultánea utilizando una calibración de orden cero. Además, es altamente probable que las muestras reales presenten componentes que también estén solapados, interfiriendo en la determinación. Por tal motivo, se propuso realizar una calibración de segundo orden mediante MEEFs.

Análisis cuantitativo

Los rangos espectrales empleados para la construcción de las MEEFs se seleccionaron teniendo en cuenta las regiones de máxima intensidad de señal de los analitos: 215-280 nm (excitación) y 295-335 nm (emisión). En la **Fig. 24** muestra una matriz de una muestra de calibrado, y su correspondiente superficie de contorno.

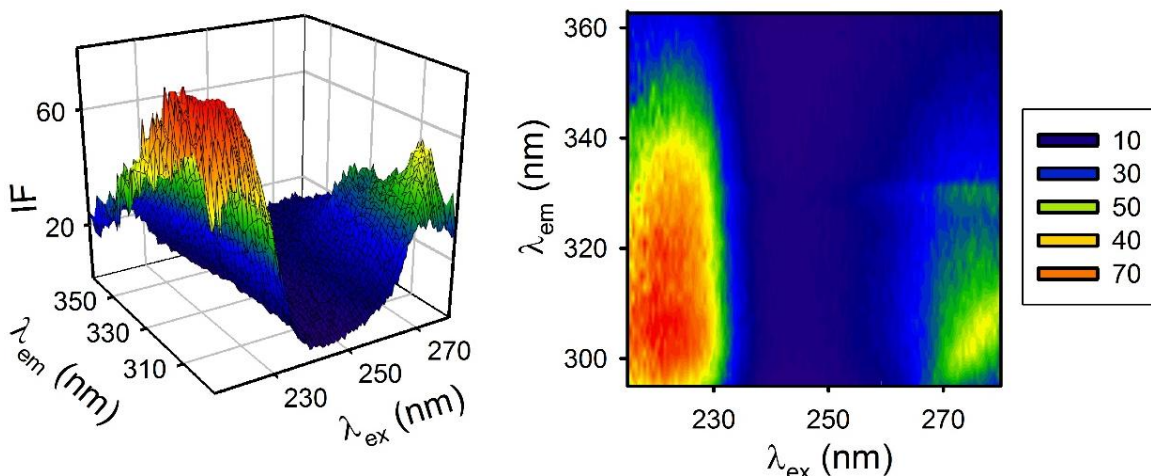


Fig. 24: Gráfico tridimensional y de contorno de una MEEF para una muestra de calibrado ($C_{BPA} = 43 \text{ ng mL}^{-1}$, $C_{NP} = 128 \text{ ng mL}^{-1}$).

Con respecto a las concentraciones empleadas en la etapa de calibración, en el caso de BPA se fijó un intervalo de concentraciones de

0–50 ng mL⁻¹, mientras que para NP, debido a su menor intensidad de fluorescencia, el rango fue de 0-150 ng mL⁻¹. Al igual que en la sección anterior, en ninguno de los casos se determinó el límite superior del rango lineal.

Un grupo de MEEFs constituye un arreglo intrínsecamente trilineal, por lo que debería de ser posible procesarlas mediante PARAFAC. Este algoritmo de segundo orden es fácil de implementar y posee la ventaja de proporcionar los perfiles, en este caso espectrales, del sistema en estudio. Por tal motivo, fue la primera opción para procesar las MEEFs obtenidas.⁶⁴ Sin embargo, debido a la gran superposición espectral de BPA y NP, PARAFAC no fue capaz de modelar el sistema, generando predicciones no satisfactorias de las muestras de validación.¹¹³

Se decidió, entonces, tratar los datos con algoritmos de segundo orden basados en variables latentes, más flexibles en relación a la trilinealidad del sistema: U-PLS y N-PLS. A diferencia de PARAFAC, al aplicar estos algoritmos no se obtienen perfiles correspondientes a los espectros de los componentes puros, pero generalmente es posible modelar muestras con mayor solapamiento espectral. El número óptimo de variables latentes se determinó empleando validación cruzada,⁷⁴ obteniéndose tres variables latentes cuando se utilizó U-PLS y cuatro en el caso de N-PLS.

La capacidad predictiva de ambos modelos se comprobó mediante el análisis de un conjunto de muestras de validación.

En la **Fig. 25** se presentan las curvas de concentración predicha en función de la nominal para dichas muestras, utilizando ambos algoritmos, y las respectivas pruebas EJCR. Además, en la **Tabla 15** se presentan las cifras de mérito de las calibraciones de segundo orden construidas con los dos algoritmos ensayados.

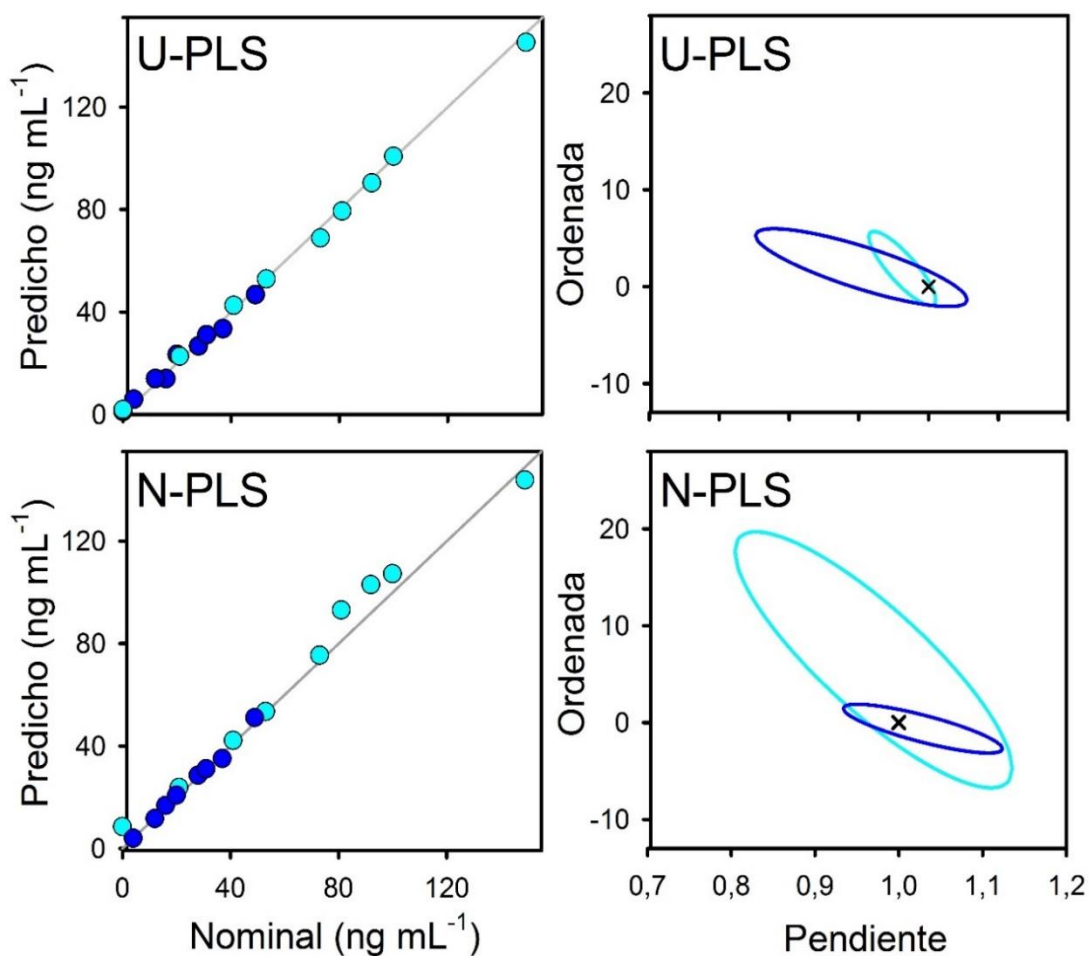


Fig. 25: Curvas de concentración nominal de los analitos vs concentración predicha para los diferentes algoritmos y sus correspondientes pruebas de la elipse.

Como puede observarse en la **Fig. 25**, el punto ideal en el *test* de la elipse se encuentra dentro de la región de confianza para ambos algoritmos aplicados. Esto indica que tanto U-PLS como N-PLS permiten obtener

predicciones satisfactorias en cuanto a exactitud. Sin embargo, los tamaños relativos de estas elipses prueban que las predicciones obtenidas por U-PLS son más precisas, en concordancia con los REPs y RMSEPs presentados en la **Tabla 15**. Esto puede deberse a que PLS, en su variante multidimensional (N-PLS) presenta una mayor dificultad que en su forma desdoblada (U-PLS) para resolver el gran solapamiento espectral de los analitos, especialmente en el modo de emisión.

Los límites de detección se calcularon de acuerdo a un nuevo método aprobado por la IUPAC,¹¹⁴ expresándose como un intervalo de límites de detección. Además, es importante mencionar que dichos LDs se obtuvieron sin necesidad de una etapa de pre-concentración, y resultaron mejores que los logrados en las calibraciones univariadas (**Tabla 14**, pág. 120), debido a que el uso de datos de segundo orden genera una mayor sensibilidad y selectividad en el método.⁶⁴

Tabla 15: Cifras de mérito para la determinación de BPA y NP en muestras de validación mediante los algoritmos descritos.

	U-PLS		N-PLS	
	BPA	NP	BPA	NP
IC ^a (ng mL ⁻¹)	0-50	0-150	0-50	0-150
γ (ng ⁻¹ mL)	3,3	0,9	2,8	0,6
Rango LD (ng mL ⁻¹)	1-2	4-14	1-2	6-11
Rango LC (ng mL ⁻¹)	3-6	11-41	4-7	17-34
RMSEP ^b (ng mL ⁻¹)	3	2	1	7
REP ^c (%)	8	3	4	9

^a IC, intervalo de calibración. No se determinaron los límites superiores de los rangos lineales. ^b Error cuadrático medio de la predicción. ^c Error relativo de la predicción.

Muestras reales

Luego de analizar las muestras de validación, se procedió al análisis de muestras reales. Se estudiaron diferentes envases plásticos, principalmente botellas de bebidas y envoltorios de alimentos, ya que se los puede considerar como una fuente de exposición a BPA y NP. En la literatura se describen dos tipos de procesamiento de plásticos para su posterior análisis, un tratamiento de disolución completa y precipitación por agregado de metanol o etanol,¹¹⁵⁻¹¹⁷ y otro de extracción con solventes en condiciones menos severas.¹¹⁸⁻¹¹⁹ El primer procesamiento tiene como desventaja que se consumen grandes cantidades de solvente y, además, algunos plásticos se hidrolizan en las condiciones de trabajo, liberando cantidades adicionales de BPA. Es por esto que se decidió utilizar el segundo tipo de pre-tratamiento.

En primera instancia, para optimizar la técnica de extracción, se tomó una muestra de polietilenoftalato (PET) como modelo y se realizó la extracción durante 2 hs, a 55 °C.¹¹⁹ En los extractos obtenidos se determinaron las concentraciones de BPA y NP por CLAE-DFL. Se probaron tres solventes de extracción: etanol, metanol y acetato de etilo, estableciéndose que con etanol se obtuvieron los mayores rendimientos, y por ello se lo seleccionó para los experimentos subsiguientes.

La temperatura y tiempo de extracción se optimizaron utilizando un diseño bifactorial. Las temperaturas evaluadas fueron 35 °C y 55 °C, y los

tiempos ensayados fueron 1, 2 y 3 hs. En base a los resultados obtenidos se estableció que las condiciones óptimas de extracción son de 1 h a 35 °C.

En la **Tabla 16** se muestran las recuperaciones calculadas para los dos analitos, en las condiciones optimizadas, a tres niveles de concentración.

En esta tabla se puede observar que las recuperaciones se encuentran en el rango 99 - 108%, demostrando que la metodología adoptada es adecuada para la extracción de los analitos en las matrices de interés.

Tabla 16: Recuperación porcentual (%R) de BPA y NP en una muestra de plástico a diferentes niveles de concentración.^a

BPA			NP		
Añadido	Hallado	%R	Añadido	Hallado	%R
0	120		0	314	
25	146	101	100	410	99
50	176	104	200	519	101
100	237	108	300	650	106

^a en ng mL⁻¹.

Una vez seleccionadas las condiciones de extracción, se analizaron diferentes muestras de plásticos, empleando la calibración de segundo orden obtenida. Se estudiaron muestras de polietileno (PE), cloruro de polivinilo (PCV), polipropileno (PP), policarbonato (PC) y PET.

En la **Fig. 26** se comparan las MEEFs de un estándar de calibración y de una muestra real, evidenciando el gran solapamiento espectral de los analitos con la matriz. Este solapamiento refuerza la justificación del uso de una calibración de segundo orden, porque además de permitir la

separación virtual de los analitos, posibilita su cuantificación en presencia de otros constituyentes de la muestra sin la necesidad de eliminarlos. En el caso de los algoritmos empleados en esta instancia, la *ventaja de segundo orden* se alcanza mediante el procedimiento RBL.

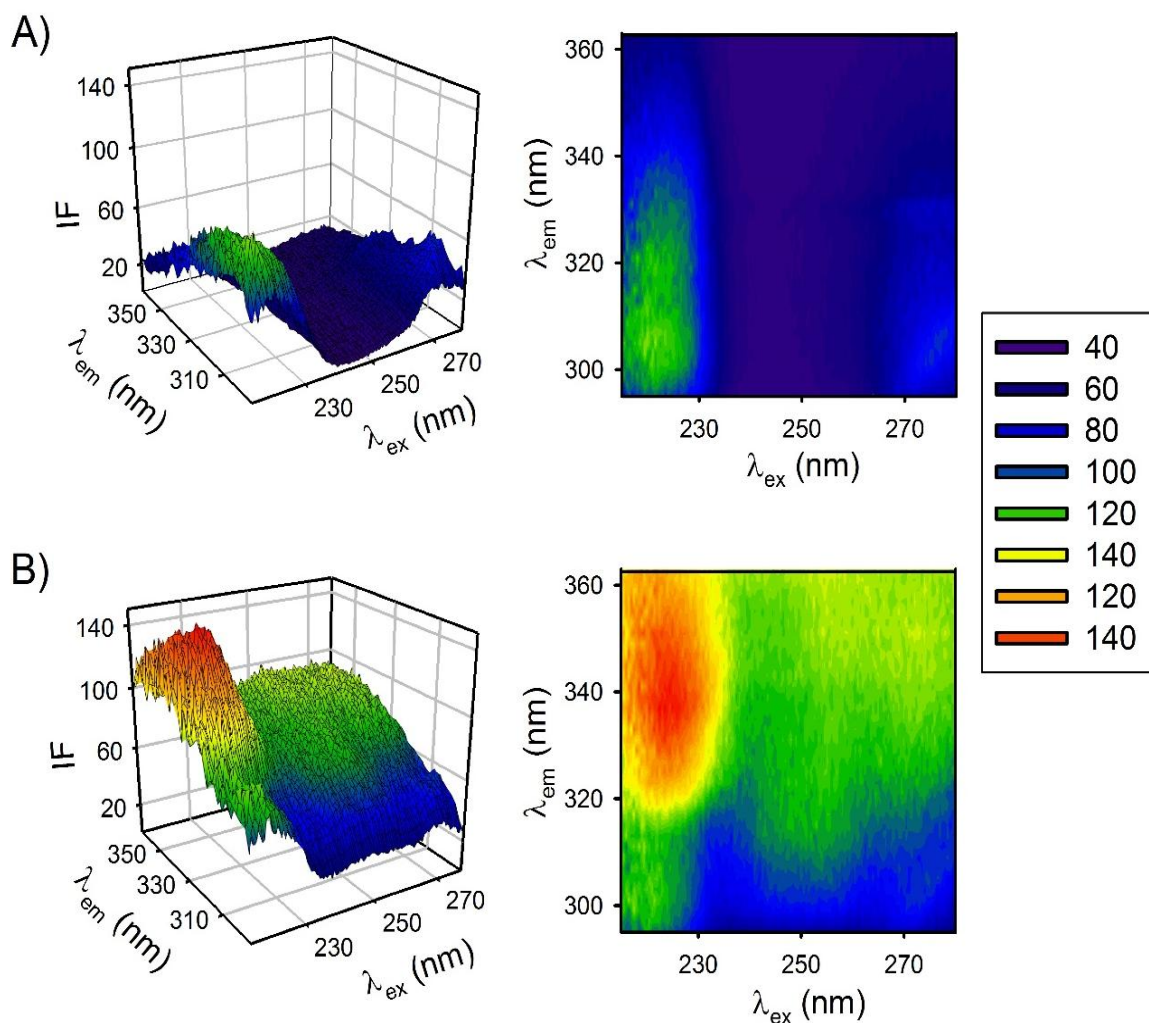


Fig. 26: Gráficos tridimensionales excitación-emisión y de contorno de las matrices de fluorescencia para: **A)** una muestra de calibración ($C_{BPA}=43 \text{ ng mL}^{-1}$, $C_{NP}=128 \text{ ng mL}^{-1}$) y **B)** una muestra de PET tratada como se explica en la sección experimental ($C_{BPA}=20 \text{ ng mL}^{-1}$, $C_{NP}=38 \text{ ng mL}^{-1}$).

Si bien se obtuvieron resultados aceptables empleando N-PLS para predecir las muestras de validación, este algoritmo no rindió

recuperaciones adecuadas en las muestras reales, posiblemente por su incapacidad de modelar satisfactoriamente a los interferentes de la matriz. Esta dificultad de N-PLS/RBL para modelar sistemas altamente complejos, con gran superposición espectral entre analitos e interferentes ya se informó en otros estudios.^{35- 120 , 121} En consecuencia, el tratamiento quimiométrico de los datos correspondientes a las muestras reales se realizó utilizando U-PLS/RBL. Como se indicó previamente, en estos sistemas, además de los tres factores latentes, se requirió la aplicación del método RBL, con tres componentes inesperados en la mayoría de las muestras.

En la **Tabla 17** se presentan las concentraciones de BPA y NP de las muestras analizadas, determinadas tanto por el método propuesto como por el de referencia.

Ambos métodos se compararon por medio de un *test t* de Student por parejas, a $n-1$ grados de libertad y con un nivel de significancia del 95%. Los valores obtenidos para BPA ($t = 0.46$) y NP ($t = 0.16$) se encuentran muy por debajo del valor crítico (2,13 para BPA y 1,83 para NP). Este análisis estadístico demostró que los resultados obtenidos mediante el método propuesto no difieren significativamente de los obtenidos por el método de referencia, evidenciando la capacidad del algoritmo U-PLS/RBL de modelar las interferencias del sistema.

Tabla 17: Concentraciones determinadas de BPA y NP en muestras de plásticos, mediante MEEFs–U-PLS/RBL y el método de referencia (MR).^a

Muestra	Tipo ^b	BPA			NP		
		MEEF	MR	<i>t</i> ^c	MEEFs	MR	<i>t</i> ^c
1 Botella de agua	PET	130(2)	120(2)		325(10)	314(6)	
2 Botella de gaseosa	PET	99(5)	106(2)		365(4)	368(7)	
3 Botella de agua	PET	ND	ND		ND	ND	
4 Botella de gaseosa	PET	ND	ND		ND	ND	
5 Botella de etanol	PE	199(10)	195(6)		375(5)	413(8)	
6 Bandeja descartable	PE	66(1)	68(2)		153(8)	162(3)	
7 Botella de lavandina	PE	ND	ND		ND	ND	
8 Película plástica	PE	ND	ND		8,9(3)×10 ²	8,8(3)×10 ²	
9 Cubierto descartable	PVC	ND	ND		ND	ND	
10 Tuberías de agua	PVC	ND	ND		272(5)	247(7)	
11 Juguete	PVC	ND	ND		95(6)	93(3)	
12 Película plástica	PVC	ND	ND		30(2)×10 ³	30(2)×10 ³	
13 Bandeja descartable	PP	ND	ND		ND	ND	
14 Tapa plástica	PC	ND	ND		101(2)	99(4)	
15 Tapa plástica	PC	26(1)	24(1)		115(8)	113(6)	
				0,46	0,16		

^a Concentraciones en ng g⁻¹, SD entre paréntesis, ND = no detectado.

^b Valores de *t* calculados al aplicar un *test* por parejas.

Es importante mencionar que las concentraciones de BPA y NP informadas en la literatura dependen del material plástico estudiado y del tipo de tratamiento realizado sobre el mismo. Como es de esperarse, los trabajos que utilizan un pre-tratamiento de disolución completa de la

muestra detectan concentraciones significativamente mayores de ambos analitos.^{122,123} Los niveles hallados en el presente estudio son similares a los informados en las publicaciones que utilizan un método de extracción análogo al empleado, con niveles de BPA de hasta 200 ng g⁻¹ y concentraciones de NP elevadas para las muestras de polietileno y cloruro de polivinilo.^{124,125}

En la **Tabla 18** se presentan las cifras de mérito del método propuesto para la cuantificación de BPA y NP en muestras de plásticos. Los límites de detección y cuantificación, y el RMSEP, expresados tanto en ng g⁻¹ de material sólido como en ng mL⁻¹ de extracto, muestran una buena precisión y sensibilidad. Sin embargo, si fuera necesario, es posible obtener menores límites aumentando la masa de muestra pesada y reduciendo el volumen de solvente de extracción.

Tabla 18: Cifras de mérito para la determinación de BPA y NP en muestras reales, mediante MEEFs-U-PLS/RBL.

	BPA	NP
γ (ng ⁻¹ mL)	0,6	0,3
Rango LD (ng mL ⁻¹)	6–7	15–24
Rango LD (ng g ⁻¹)	15–18	35–50
Rango LC (ng mL ⁻¹)	17–21	45–70
Rango LC (ng g ⁻¹)	40–50	100–150
RMSEP (ng mL ⁻¹)	2	4
RMSEP (ng g ⁻¹)	7	16
REP (%)	6	3

Conclusiones parciales

Se propuso un método no separativo para la determinación simultánea de BPA y NP en muestras de plásticos, basado en la adquisición de MEEFs en solución acuosa, en presencia de M- β -CD, acoplado al procesamiento quimiométrico de los datos.

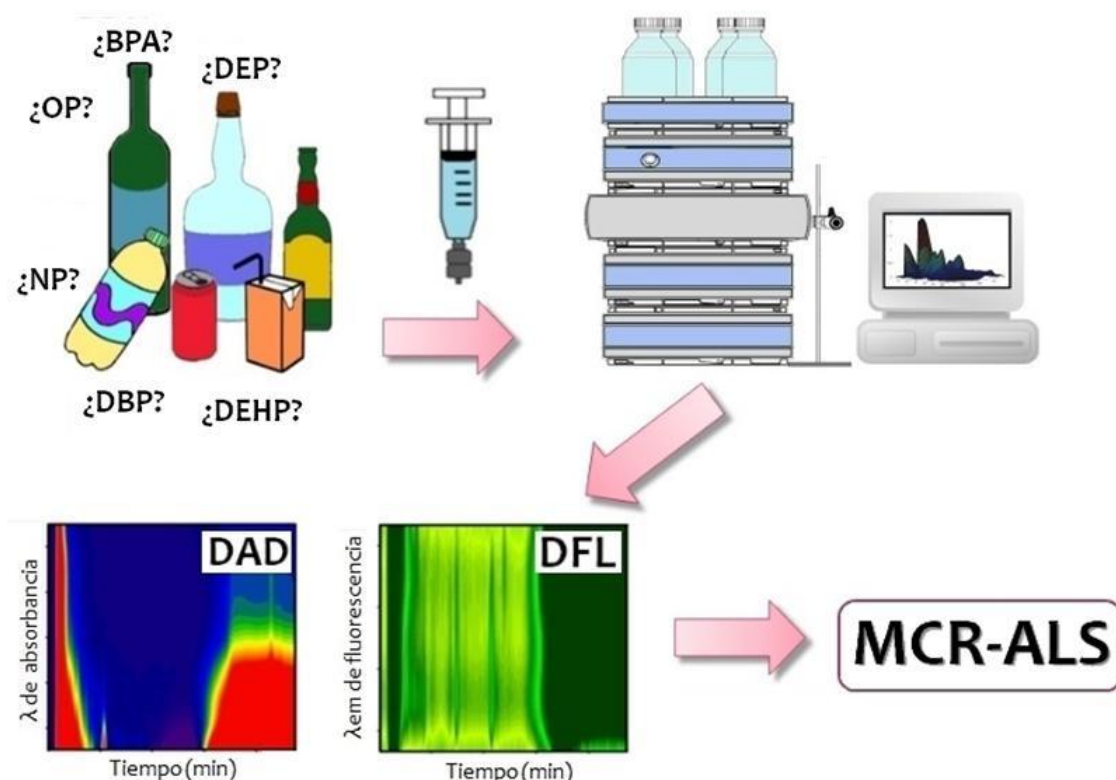
El uso de calibración de segundo orden permitió emplear un simple pre-tratamiento de las muestras, minimizando el consumo de solventes tóxicos (2,5 mL de etanol por muestra), de acuerdo a los principios de la QAV. La etapa de adquisición de los datos también se desarrolló siguiendo estos principios, ya que se trabajó en solución acuosa, utilizando un aditivo no tóxico (M- β -CD) para la exaltación de la señal fluorescente de los analitos.

La selectividad obtenida por medio de la calibración multivariada y el aumento de la sensibilidad generado por el uso de medios organizados, permitieron obtener límites de detección del orden de partes por billón, sin necesidad de etapas de pre-concentración.

Mediante la aplicación del algoritmo U-PLS/RBL, se logró la determinación de los analitos a niveles de vestigios, en presencia de altas concentraciones de interferentes y con un importante solapamiento espectral.

En conclusión, la determinación de DEs en materiales plásticos por MEEFs-U-PLS/RBL resultó ser una técnica rápida, sensible, sencilla y verde.

4.3 Determinación de DEs en bebidas



En esta etapa del presente trabajo de tesis, y siguiendo los principios de la QAV,¹¹ se propuso el desarrollo de un método cromatográfico para la determinación de seis DEs derivados de plásticos (BPA, OP, NP, DEP, DBP y DEHP) en bebidas envasadas en recipientes plásticos, o que tuvieron contacto con este tipo de materiales durante el proceso de elaboración.

Teniendo en cuenta que, en general, el análisis por CLAE requiere de rigurosos pre-tratamientos de las muestras, y un importante consumo de solventes tóxicos durante la etapa de adquisición de datos, se decidió emplear calibración multivariada como estrategia para desarrollar un método más verde (pág. 447).

Las condiciones cromatográficas se optimizaron minimizando el uso de solventes orgánicos y el tiempo de análisis, aún en detrimento de la resolución. Pero, como ya se ha expresado anteriormente, al aplicar calibración multivariada no es necesaria la separación completa de las bandas cromatográficas.

Se registraron matrices CL-DAD y CL-DFL, y se procesaron con el algoritmo MCR-ALS, para construir calibraciones de segundo orden y predecir las concentraciones de un conjunto de muestras de validación.

El método propuesto se aplicó a la cuantificación de DEs en gaseosas, jugos, agua mineral, vinos, cervezas y bebidas blancas. Los resultados obtenidos se compararon con un método de referencia (CG-EM).

Datos cromatográficos de segundo orden

Como se discutió previamente, a diferencia de los métodos cromatográficos tradicionales, cuyo objetivo es obtener una completa resolución entre los analitos, en el presente trabajo las condiciones cromatográficas se optimizaron con el fin de minimizar el tiempo de análisis y el uso de solventes tóxicos. Como es de esperarse, este enfoque llevó a una pérdida parcial de resolución entre algunos de los analitos, requiriendo la aplicación de una calibración multi-vía para resolver el solapamiento temporal presente. Por otro lado, considerando la complejidad de las muestras a analizar y la probable presencia de interferentes, este tipo de calibración resulta beneficiosa ya que permite la

cuantificación de los analitos aún en presencia de compuestos no modelados en la etapa de calibrado.

La detección dual (DAD y DFL) permitió que los analitos estudiados se detectaran con la señal más conveniente, según sus propiedades espectroscópicas: BPA, OP y NP por fluorescencia; DEP, DBP y DEHP por absorbancia. Teniendo en cuenta la necesidad de detectar y cuantificar DEs a niveles muy bajos, se trabajó con intervalos de concentración acotados, sin determinar el límite superior del intervalo lineal.

Se ensayaron diferentes condiciones cromatográficas: tipo y largo de columna, composición de la FM y velocidad de flujo. Con el fin de obtener datos adecuados con un flujo de FM relativamente alto, y disminuir de este modo el tiempo de análisis, se seleccionó una columna de C18 de 50 mm de largo.

En relación a la FM, generalmente es preferible trabajar en condiciones isocráticas, ya que el análisis es más simple, y no se requiere tiempo de reacondicionamiento de la columna entre inyecciones sucesivas. Por tal motivo, en primera instancia se probaron diferentes condiciones isocráticas basadas en trabajos informados en la literatura.^{126,127} Si bien se ensayaron diferentes mezclas ACN:agua y MeOH:agua, estas últimas no se consideraron viables debido a que sus altas viscosidades¹²⁸ impidieron la aplicación de flujos mayores a 1 mL min^{-1} . Por otro lado, se observó que a causa de las grandes diferencias de polaridad entre los compuestos analizados, las mezclas ACN:agua evaluadas no permitieron obtener

tiempos de retención satisfactorios para todos los analitos. Es decir, aquellas composiciones que fueron adecuadas para la separación parcial de los analitos menos retenidos (BPA, DEP y DBP), generaron tiempos de retención de hasta 40 min para DEHP.

Considerando estos resultados, se propuso la aplicación de un gradiente de elución. La composición inicial de la FM (ACN:agua 70%:30% v/v) se seleccionó de forma de lograr la mayor resolución posible de los analitos menos retenidos en un tiempo corto (aproximadamente 4-5 min). Posteriormente se aplicó un gradiente lineal durante 1 min, alcanzando una composición final de FM de alta fuerza eluotrópica, que se mantuvo por 3 min. Bajo estas condiciones cromatográficas, el tiempo total de corrida fue de 9 min. De esta manera, y aun considerando los 5 min necesarios para el reacondicionamiento de la columna, se logró una significativa reducción en el tiempo de análisis total.

En la **Fig. 27** se muestran los cromatogramas de DAD y DFL de una muestra sintética constituida por los analitos estudiados. En los cromatogramas de DAD se puede observar que no se logró una completa resolución entre la banda correspondiente a la inyección, y los dos DEs menos retenidos (BPA y DEP). Si bien esta falta de resolución imposibilita la cuantificación de estos analitos por medio de calibración de orden cero, las diferencias espectrales presentes (**Fig. 27, recuadro**) permiten que dicho solapamiento temporal no represente una dificultad en las predicciones al aplicar métodos multivariados.

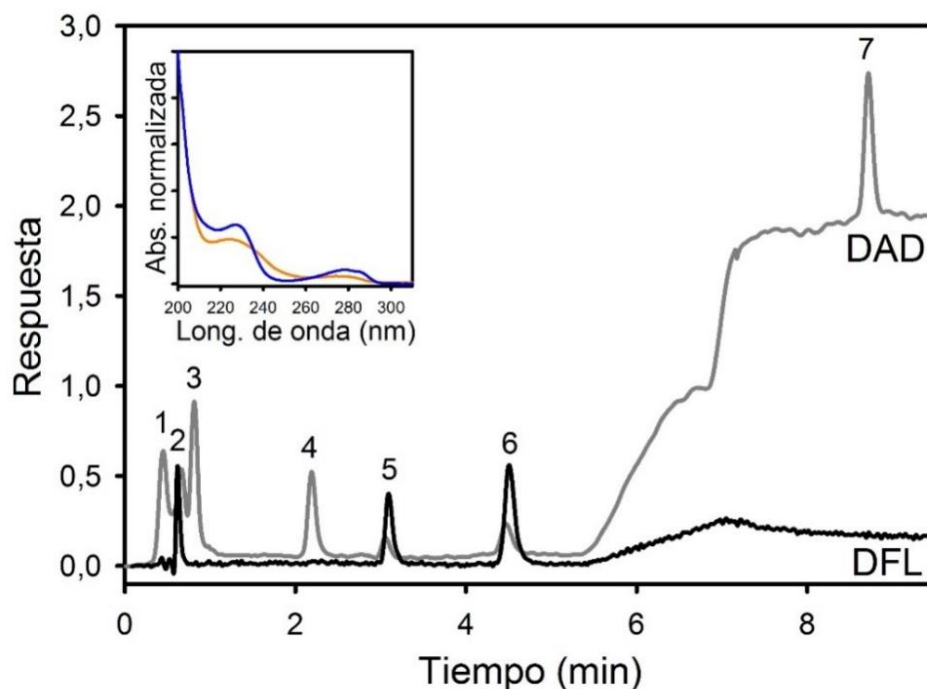


Fig. 27: Cromatogramas de DAD y DFL de una muestra sintética. (1) inyección, (2) BPA, (3) DEP, (4) DBP, (5) OP, (6) NP y (7) DEHP. Recuadro: espectros normalizados de absorbancia de BPA y DEP, en agua:ACN 70%:30% v/v.

Calibración y validación

Con el objeto de validar la calibración de segundo orden construida, se analizó un conjunto de muestras de validación.

En una primera etapa las matrices de CL-DAD y CL-DFL correspondientes a ambos conjuntos de muestras (calibración y validación) se sometieron a un algoritmo de corrección de línea de base mediante cuadrados mínimos asimétricos.¹⁰¹

Los datos provenientes del DAD y DFL se analizaron por separado, ya que la diferencia en tiempos de adquisición entre ambos modos de detección genera diferencias en los perfiles temporales de los analitos.

Existen diferentes algoritmos capaces de procesar datos de segundo orden. Sin embargo, como se mencionó anteriormente (pág. 49), los datos de origen cromatográfico no suelen ser trilineales debido a corrimientos en el modo temporal entre inyecciones sucesivas de la misma muestra. Teniendo en cuenta esta particularidad de los datos analizados, se decidió modelarlos por medio de MCR-ALS, que no requiere de un alineamiento previo de los perfiles cromatográficos. Las matrices aumentadas se construyeron en la dirección temporal (que es el modo en que se pierde la trilinealidad de los datos), a partir de cada una de las muestras de validación y las 12 muestras de calibración.

Es importante tener en cuenta que los ésteres del ácido ftálico analizados poseen el mismo espectro de absorbancia y que los espectros de emisión de fluorescencia de BPA, OP y NP son idénticos. En otras palabras, el procesamiento de los cromatogramas completos llevaría a una selectividad virtualmente nula entre los analitos.

En consecuencia, fue necesario aplicar el algoritmo quimiométrico en intervalos temporales acotados, de forma tal que cada región incluyó únicamente analitos con diferentes perfiles espectrales, como se muestra en la **Fig. 28**.

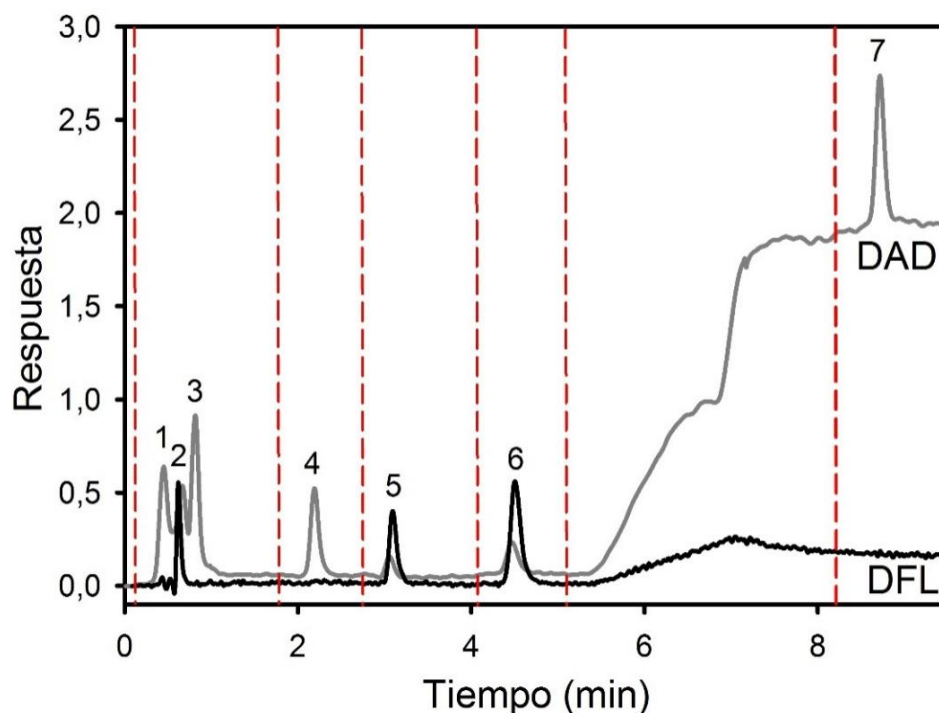


Fig. 28: Cromatogramas de DAD y DFL de una muestra sintética. Los números corresponden a: (1) inyección, (2) BPA, (3) DEP, (4) DBP, (5) OP, (6) NP y (7) DEHP. En líneas punteadas rojas se separan las diferentes regiones temporales empleadas en el procesamiento de los datos.

Estos intervalos temporales, así como los rangos espectrales empleados para cada analito se encuentran detallados en la **Tabla 19**.

Tabla 19: Intervalos temporales y espectrales utilizados en el procesamiento de datos por MCR-ALS.

	Tiempo (min)	Longitud de onda (nm)
DFL		
BPA	0,50–1,85	290–350
OP	2,55–4,15	290–350
NP	4,15–5,00	290–350
DAD		
DEP	0,50–1,85	200–300
DBP	1,85–2,55	200–300
DEHP	8,25–9,10	200–300

Una vez seleccionados los intervalos temporales, se utilizó PCA para determinar el número de componentes en cada uno de ellos, obteniéndose resultados concordantes con el número de constituyentes teóricamente esperados. El programa se inicializó empleando un algoritmo multivariado que extrae el espectro de cada componente puro a partir de una serie de espectros de mezclas de composición variada,⁸¹ y se aplicaron las siguientes restricciones: (1) no negatividad en ambos modos, (2) unimodalidad en cada perfil del modo temporal y (3) correspondencia entre componentes y muestras.⁶⁷ Una vez alcanzada la convergencia por ALS, los analitos se identificaron por sus perfiles espectrales y se cuantificaron por medio de sus correspondientes curvas de calibración pseudo-univariadas.

En la **Fig. 29** se muestran los gráficos de concentración predicha en función de la nominal de los seis DEs en las muestras de validación analizadas, observándose una buena correlación de los datos en todos los casos. El análisis estadístico de los resultados obtenidos se llevó a cabo a través del *test* EJCR. Como se puede visualizar en la **Fig. 29**, el punto ideal (0,1) se encuentra incluido en las elipses de todos los analitos, indicando la exactitud del método propuesto. En el caso de BPA y DEP se puede concluir que el algoritmo MCR-ALS fue capaz de cuantificarlos adecuadamente, a pesar del importante solapamiento temporal y espectral presente.

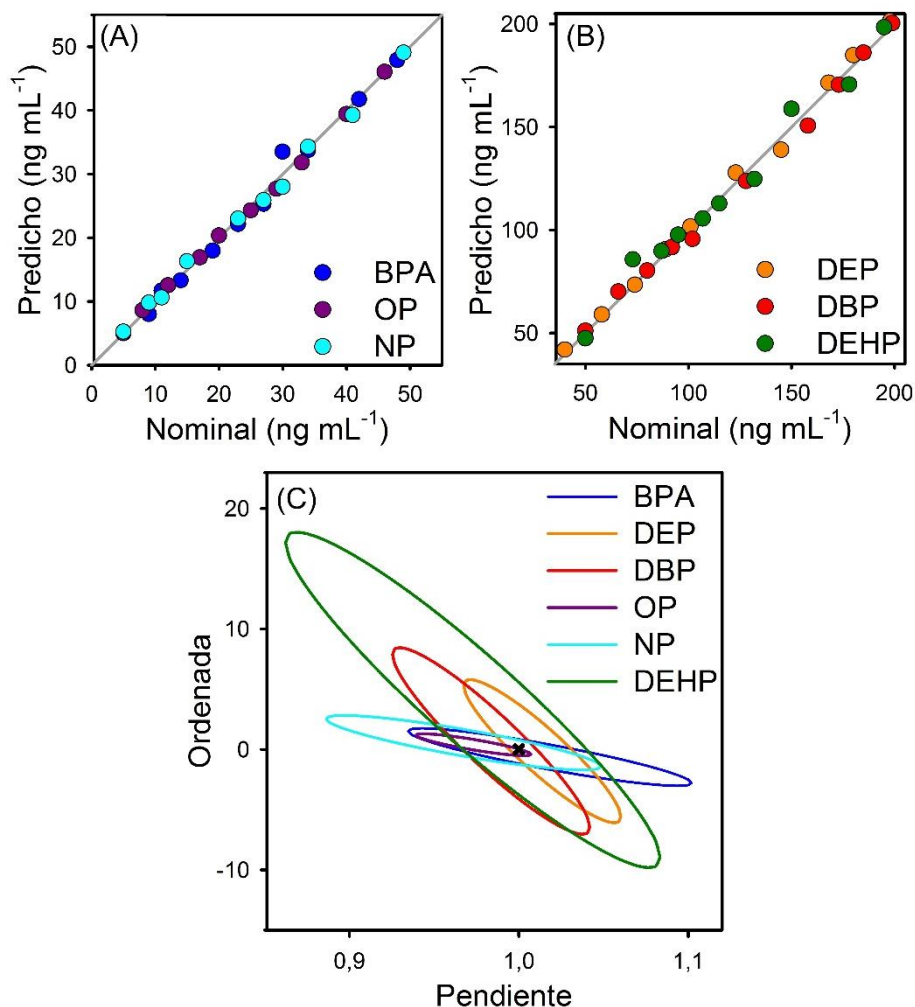


Fig. 29: Gráficos de concentración predicha vs nominal para (A) BPA, OP, NP y (B) DEP, DBP y DEHP. (C) Regiones elípticas (al 95% de confianza) de las pendientes y ordenadas al origen de las regresiones de (A) y (B).

En la **Tabla 20** se muestran las cifras de mérito determinadas para el método propuesto en las muestras de validación, calculadas de acuerdo al método recomendado por la IUPAC.⁹⁴

Como era de esperarse, los LD y REPs obtenidos son menores para los analitos determinados por fluorescencia. Sin embargo, los límites de detección de DEP, DBP y DEHP fueron también muy satisfactorios, encontrándose en el intervalo 10-18 ng mL⁻¹.

Tabla 20: Cifras de mérito de los DEs estudiados en las muestras de validación.

	DFL			DAD		
	BPA	OP	NP	DEP	DBP	DEHP
IC (ng mL ⁻¹)	8,2-50	3,0-50	3,9-50	30-200	36-200	55-200
γ (mL ng ⁻¹)	3,1	5,4	7	2,7	2.7	4.1
LD (ng mL ⁻¹)	2,7	1,0	1,3	9,9	12	18
LC (ng mL ⁻¹)	8,2	3,0	3,9	30	36	55
RMSEP (ng mL ⁻¹)	1,4	0,7	1,0	3,4	3.8	6.2

Muestras reales

El método propuesto se aplicó a la determinación de DEs en diferentes muestras de bebidas, ya sea envasadas en botellas plásticas o latas recubiertas con películas epoxi (agua mineral, gaseosas, jugos, cachaça, aguardiente), o envasadas en botellas de vidrio (vinos y cerveza) pero con un potencial contacto con materiales plásticos en las etapas de producción y transporte.

En muestras alimenticias, la Unión Europea (EU) establece en la Regulación nº 10/2011 un SML (límite de migración específico) de 600, 10, 300 y 1500 ng mL⁻¹ para BPA, DEP, DBP y DEHP, respectivamente.¹²⁹ En los casos de OP y NP, no se informan valores de SML, pero se recomienda un NOAEL (nivel sin efecto adverso observable) de 10 mg kg⁻¹ dia⁻¹ para OP,¹³⁰ y un TDI (ingesta diaria tolerable) de 5 µL kg⁻¹ para NP.¹³¹

De acuerdo a la bibliografía, los DEs pueden encontrarse en bebidas en concentraciones muy variadas dependiendo de la muestra analizada. En

muestras de agua envasada se informan niveles del orden de pg mL^{-1} .¹³² Por otro lado, en gaseosas y jugos se han encontrado concentraciones de hasta 30 ng mL^{-1} .^{132,133} Las concentraciones de BPA halladas en vinos fueron de hasta 2 ng mL^{-1} .¹³⁴ En general, se informan altos niveles de EAFs (1500 ng mL^{-1}),^{135,136} en bebidas alcohólicas que pueden explicarse si se tiene en cuenta la capacidad extractiva de las soluciones etanólicas sobre moléculas de naturaleza lipofílica como los ftalatos estudiados.¹³⁵ Finalmente no se encontraron estudios cuantitativos exhaustivos de OP y NP en muestras de bebidas.

En base a las concentraciones de los analitos en estudio informadas en la literatura y los LC establecidos con el presente método, en algunas de las muestras investigadas fue necesario realizar una pre-concentración por EFS en membranas de C18. Se trataron diferentes cantidades de muestra, dependiendo de su naturaleza, alcanzando factores de pre-concentración en el intervalo 3-40.

La efectividad del método de pre-concentración empleado se evaluó mediante la determinación de la recuperación de los analitos a tres niveles de concentración diferentes, obteniéndose recuperaciones de entre 90 % y 100 % para todos los analitos estudiados. En el caso de las muestras alcohólicas, se eliminó previamente el alcohol por evaporación, de manera de favorecer la retención de los analitos en la membrana de C18.

Es importante notar que si bien las técnicas descritas en la literatura para el tratamiento de muestras de este tipo en general conlleva el uso de

grandes volúmenes de solventes altamente tóxicos (hasta 100 mL), como heptano y diclorometano,^{48,137,138} el método utilizado en este trabajo requirió únicamente de 2 mL de MeOH por muestra.

Una vez pre-concentradas, las doce muestras de bebidas se analizaron por medio del método de segundo orden propuesto.

En la **Fig. 30** se presentan las superficies de contorno de las matrices para los dos detectores empleados, correspondientes a una muestra de calibración (a la izquierda), y dos muestras reales.

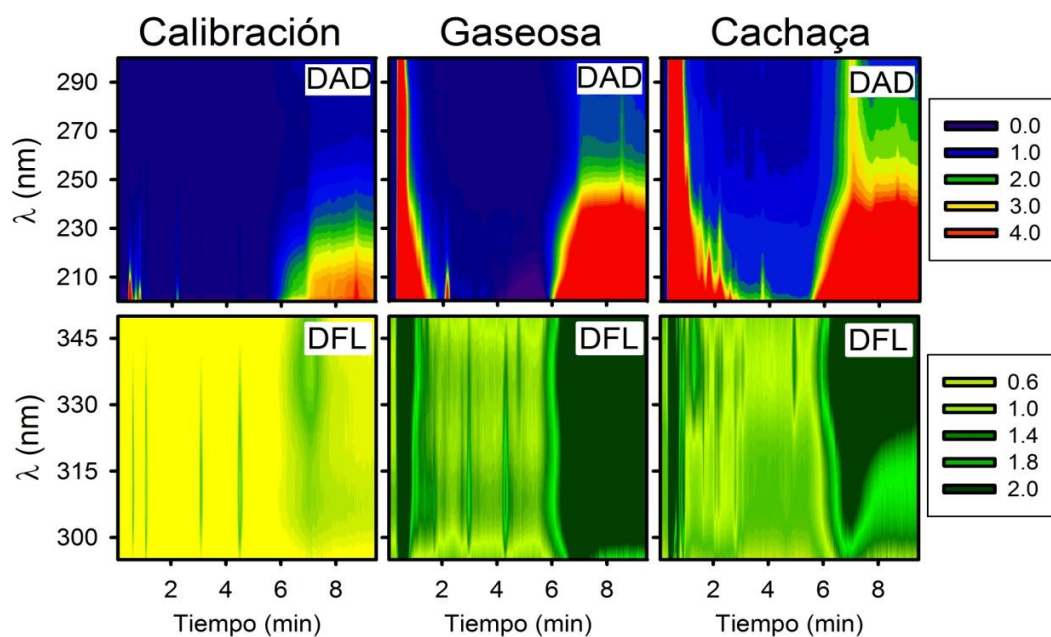


Fig. 30: Gráficos de contorno de DAD y DFL para una muestra de validación y dos muestras reales.

Para ambas muestras de bebidas se observa la presencia de señales interferentes en diferentes regiones de los cromatogramas. Efectivamente, todas las muestras presentaron al menos un interferente coeluyendo con alguno de los analitos estudiados, demostrando la necesidad de aplicar un algoritmo de segundo orden para su cuantificación.

Las matrices CL-DAD y CL-DFL se procesaron mediante MCR-ALS, empleando el modo de inicialización y las restricciones ya aplicadas a las muestras de validación. Además, se aplicó la restricción de correspondencia, es decir, los perfiles de los interferentes en el modo aumentado se forzaron a cero en las muestras de calibrado. De esta manera, el algoritmo fue capaz de recuperar perfiles espectrales satisfactorios, como puede observarse en las Figs. 31 y 32.

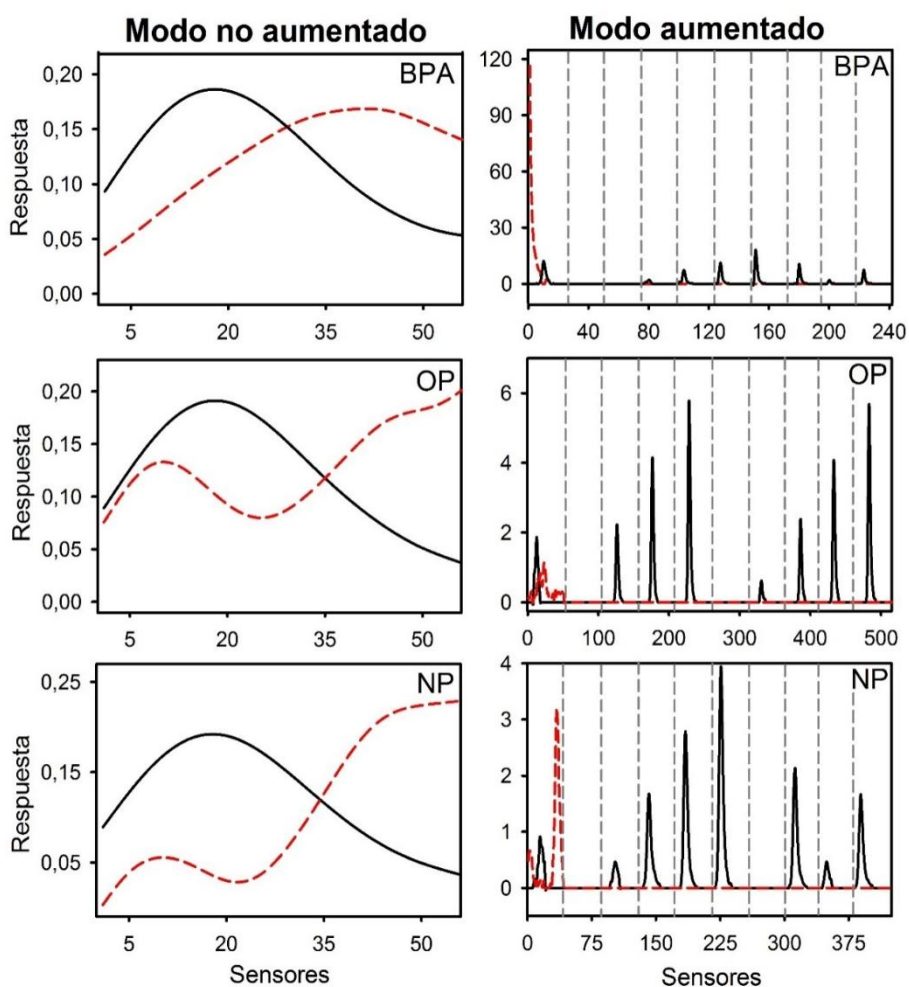


Fig. 31: Perfiles espectrales y temporales aumentados de una muestra incógnita (bebida gaseosa) y 9 muestras de calibrado (separadas por líneas punteadas grises), de BPA, OP y NP estimados por MCR-ALS. Las líneas continuas negras corresponden a los DEs y las líneas rojas discontinuas a los componentes no calibrados.

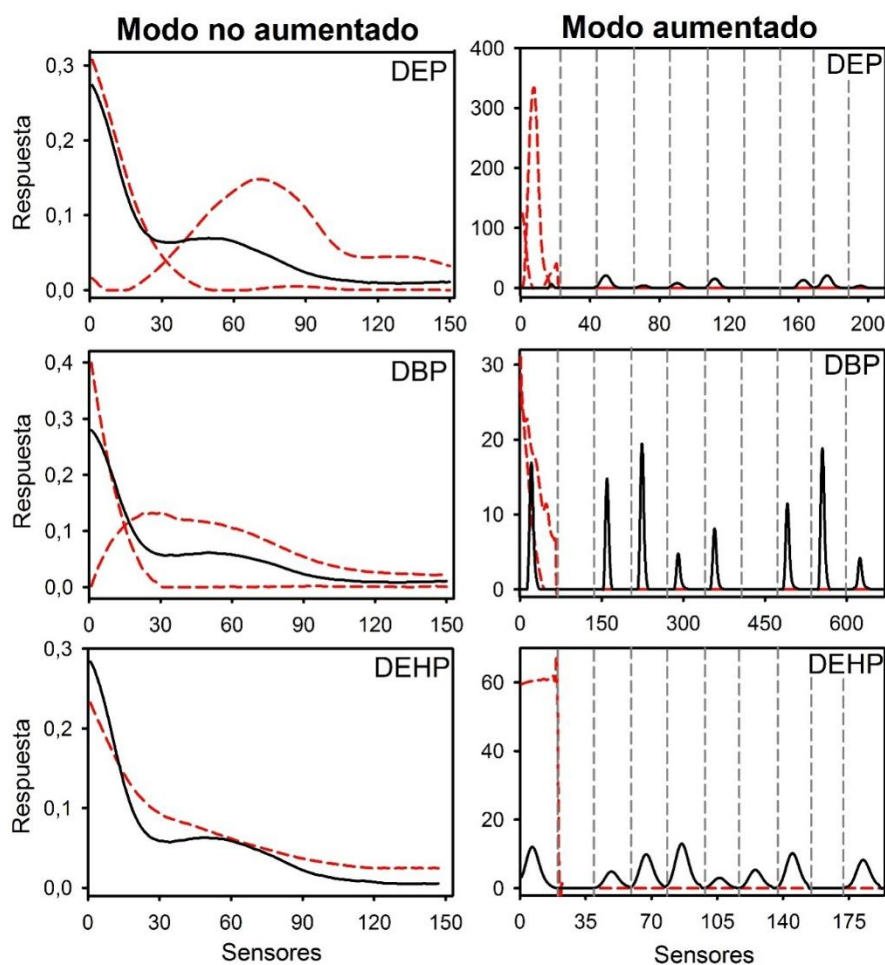


Fig. 32: Perfiles espectrales y temporales aumentados de una muestra incógnita (bebida gaseosa) y 9 muestras de calibrado (separadas por líneas punteadas grises), de DEP, DBP y DEHP estimados por MCR-ALS. Las líneas continuas negras corresponden a los DEs y las líneas rojas discontinuas a los componentes no calibrados.

La **Tabla 21** muestra las concentraciones predichas para los seis analitos en muestras reales, utilizando el método propuesto y el de referencia. Los resultados obtenidos por ambos métodos se compararon por medio de un *test t* de Student por parejas. En todos los casos, los valores de t_{ex} calculados para $n-1$ grados de libertad (donde n es el número de muestras analizadas) a un 95 % de confianza, son menores a los

tabulados (t_{crit}), demostrando que no existen diferencias significativas entre las concentraciones determinadas por ambos métodos.

Tabla 21: Concentraciones de DEs (ng mL^{-1}) en bebidas, utilizando CLAE/MCR-ALS y CG-EM (MR).^a

	BPA		OP		NP		DEP		DBP		DEHP	
	MCR	CG	MCR	CG	MCR	CG	MCR	CG	MCR	CG	MCR	CG
AM	0,47(3)	0,46	0,51(1)	0,44	0,14(1)	0,14	nd	nd	27,3(5)	27,8	8,5(8)	8,7
AM	1,04(2)	1,18	0,44(1)	0,42	0,16(2)	0,13	4,9(2)	4,9	29,5(8)	30,8	12,1(3)	12,5
GL	1,48(8)	1,63	0,74(2)	0,86	0,18(1)	0,19	1,16(8)	1,2	13,9(8)	14,6	7,23(5)	6,8
AT	2,52(2)	2,72	0,96(1)	0,87	0,24(1)	0,26	39,2(1)	40,2	22,4(1)	21,2	14,2(5)	14,2
JM	0,63(2)	0,68	4,4(1)	3,7	0,92(4)	1,01	2,8(2)	2,6	31,3(2)	31,7	21,6(1)	21,3
CR	0,98(2)	0,93	nd	nd	0,49(4)	0,45	4,7(3)	5,2	1,1(1)	1,3	18,2(2)	18,1
CS	55,6(3)	58,7	0,89(4)	0,93	0,77(4)	0,68	nd	nd	74,7(9)	73,1	16,6(5)	16,3
VT	nd	nd	0,77(1)	0,75	1,02(3)	1,03	56,0(3)	57,6	334(1)	343	80,3(9)	81
VT	nd	nd	nd	nd	0,58(6)	0,58	23,6(4)	23,2	39,6(8)	39,1	26,8(1)	26,5
VB	nd	nd	nd	nd	4,3(2)	4,3	nd	nd	32,4(2)	29,4	18,2(5)	18,7
AA	11,8(3)	11,4	nd	nd	1,5(2)	1,6	4,7(4)	5,4	76,6(6)	74,9	28,0(4)	26,8
Caç	110(1)	107	6,78(5)	7,78	14,2(2)	13,2	25,8(8)	26	40,5(1)	42,8	140(1)	137
t_{ex}^b	0,02		0,2		0,92		1,81		1,44		1,13	
t_{crit}^b	2,31		2,37		2,2		2,31		2,2		2,2	

^a Los desvíos estándar de duplicados, en la última cifra, se indican entre paréntesis.

^b Valor calculado (t_{ex}) y tabulado (t_{crit}) para un *test t* de Student de muestras por parejas. Abreviaturas: AA, aguardiente; AM, agua mineral; AT, agua tónica; Caç, cachaça; CR, cerveza rubia; CS, cerveza stout; GL, gaseosa lima-limón; JM, jugo de manzana; VB, vino blanco; VT, vino tinto.

En relación al tipo de muestra investigada, se concluye que las bebidas alcohólicas en general presentan las mayores concentraciones de todos los analitos. Como se mencionó previamente, los elevados niveles de DEs en este tipo de bebidas pueden justificarse considerando la mayor afinidad de compuestos lipofílicos como los DEs estudiados hacia soluciones etanólicas, que favorece la migración de los analitos desde los envases plásticos hacia las bebidas.¹³⁵

Por otro lado, en la mayoría de los casos se midieron concentraciones ligeramente menores de DEs en las muestras de agua envasada que en las de gaseosas y jugos, sugiriendo que la naturaleza levemente ácida de estas últimas podría favorecer la migración de los analitos desde el envase hacia el líquido contenido.

Cabe señalar que en todas las muestras los niveles de BPA y DEHP hallados estuvieron por debajo de los regulados por la EU, mientras que en algunas bebidas las concentraciones de DBP y DEP fueron levemente mayores a las permitidas.

En la **Tabla 22** se presentan las cifras de mérito del método propuesto para las muestras reales analizadas. Los límites de cuantificación, calculados considerando el mayor factor de pre-concentración empleado (factor de pre-concentración = 40), son apropiados para la determinación de los analitos en las muestras estudiadas, pudiendo mejorarse la sensibilidad del método mediante el tratamiento de un mayor volumen de

muestra si fuera necesario. Por otra parte, los valores de los RMSEP sugieren que el método propuesto posee una adecuada precisión.

Tabla 22: Cifras de mérito de los DEs estudiados en las muestras reales.^a

	DFL			DAD		
	BPA	OP	NP	DEP	DBP	DEHP
γ (mL ng ⁻¹)	1,4	2,8	3,4	1,3	0,90	1,1
LD (ng mL ⁻¹)	0,11	0,040	0,060	0,25	0,38	0,30
LC (ng mL ⁻¹)	0,35	0,12	0,18	0,75	1,1	0,89
RMSEP (ng mL ⁻¹)	1,5	0,30	0,40	0,70	3,8	1,0

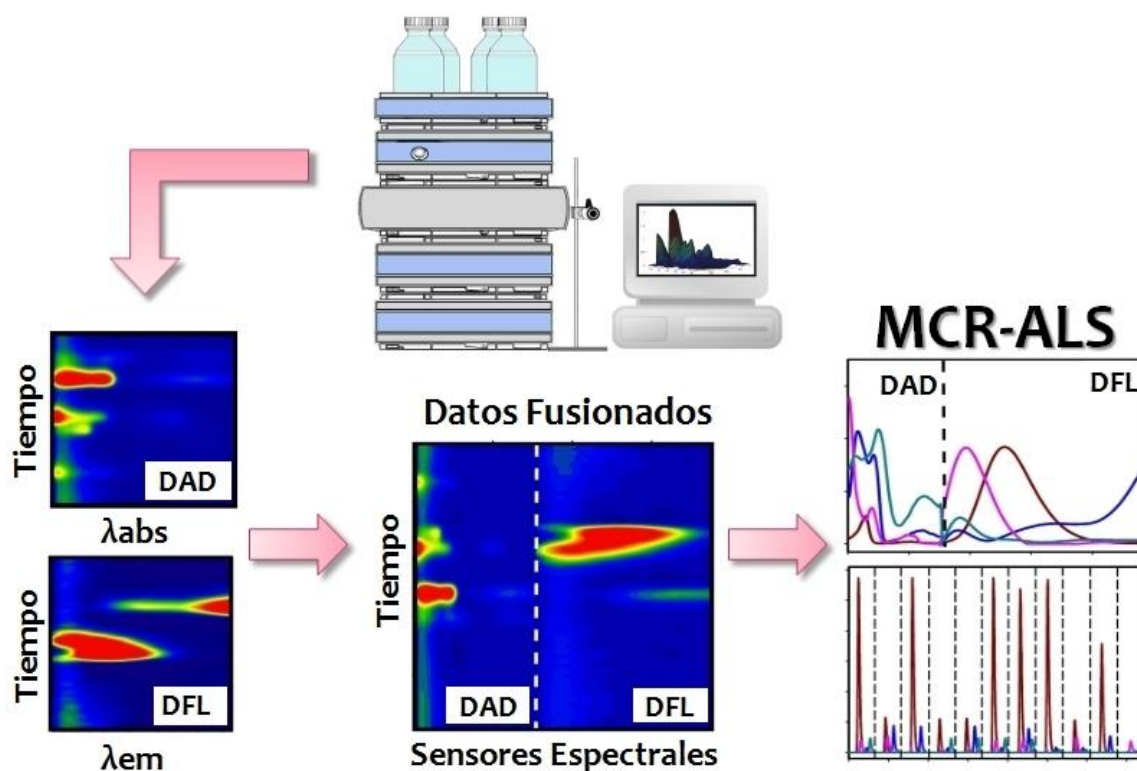
^a Factor de pre-concentración = 40.

Conclusiones parciales

El método desarrollado posibilitó la determinación de seis DEs en una gran variedad de bebidas, en niveles de concentración del orden de las partes por trillón, con un mínimo pre-tratamiento de muestra. El uso de CLAE acoplada a análisis quimiométrico disminuyó el tiempo de análisis y el consumo de solventes, resultando en un método más verde, en comparación con los métodos cromatográficos tradicionales.

La aplicación de MCR-ALS fue esencial para alcanzar la selectividad necesaria, permitiendo resolver el alto grado de solapamiento temporal y espectral entre los analitos, aún en presencia de altas concentraciones de potenciales interferentes propios de las muestras estudiadas.

4.4 Fusión de datos cromatográficos de segundo orden: determinación de DEs en muestras de agua.



Con el objetivo de evaluar las potenciales ventajas de la sinergia y complementariedad de datos provenientes de distintas fuentes se fusionaron, por primera vez, señales cromatográficas de segundo orden (CL-DAD y CL-DFL), obtenidas mediante detección dual, y se procesaron quimiométricamente para la cuantificación de analitos coeluyentes.

Los tres sistemas experimentales investigados incluyeron DEs de diferente origen y naturaleza química, algunos de los cuales presentan propiedades fluorescentes.

En cada sistema se optimizaron las condiciones experimentales de análisis aplicando los principios de la QAV, es decir, minimizando el tiempo de análisis cromatográfico y el consumo de solventes orgánicos.

Una vez obtenidos los datos de segundo orden CL-DAD y CL-DFL, se los fusionó por medio de un protocolo desarrollado en este trabajo, basado en alineamiento optimizado de correlación unidimensional (1D-COW).

Las matrices fusionadas (CL-DAD-DFL) se modelaron mediante el algoritmo MCR-ALS. A modo comparativo, los datos provenientes de los dos detectores empleados se procesaron independientemente, empleando nuevamente MCR-ALS.

La fusión de datos propuesta se empleó en la cuantificación de los DEs pertenecientes a uno de los sistemas experimentales modelo en muestras de aguas ambientales y de consumo.

Datos cromatográficos de segundo orden

Como se discutió en la sección anterior (pág. 138), las condiciones cromatográficas de análisis de los tres sistemas estudiados se optimizaron para lograr el menor consumo de solvente orgánico y minimizar el tiempo de análisis.

En todos los casos se trabajó en régimen isocrático que, además de ser robusto, evita el reacondicionamiento de la columna entre inyecciones sucesivas. Por otro lado, se utilizó un termostizador de columna operando a 35 °C, ya que de esta manera se consigue disminuir la retención de los analitos sin aumentar el contenido de solvente orgánico de la FM.

Estas condiciones cromatográficas, acopladas al uso de una columna de sólo 5 cm de largo y a la aplicación de un flujo relativamente rápido ($1,25 \text{ mL min}^{-1}$) permitieron obtener tiempos de análisis de entre 3 y 3,5 min para los tres sistemas estudiados. Es importante tener en cuenta que al acoplar calibración multivariada al análisis cromatográfico, no es necesaria una resolución completa de los perfiles temporales.

Como se mencionó en la Sección Experimental (pág. 87), el DAD y el DFL se emplearon en simultáneo, de manera de adquirir dos matrices por experimento cromatográfico: CL-DAD y CL-DFL. Las longitudes de onda de trabajo se seleccionaron considerando las regiones de absorbancia y emisión de fluorescencia de los analitos de cada sistema.

Se construyeron dos conjuntos de muestras en cada sistema analizado: uno de calibrado y otro de validación. Dada la necesidad de detectar y cuantificar DEs a niveles muy bajos, se trabajó con intervalos de concentración acotados, sin determinar los límites superiores de los rangos lineales.

Las matrices CL-DAD y CL-DFL se fusionaron mediante el procedimiento ya descrito en la Sección Experimental (pág. 91). Este pretratamiento de los datos permitió compatibilizar el tamaño de las matrices registradas por DAD y DFL, así como también alinear las señales propias de cada analito, presentes en ambos modos de detección, aun en los casos en los que se observaron corrimientos no uniformes a lo largo de los cromatogramas. Dicha alineación fue posible gracias al empleo del

programa 1D-COW, principal diferencia entre la estrategia propuesta en el presente trabajo y el de Peré-Trepat y colaboradores.⁸⁹

En las **Figs. 33, 34 y 35** se muestran los cromatogramas registrados por DAD y DFL, y las superficies de contorno de las matrices CL-DAD y CL-DFL fusionadas para una muestra de calibrado de cada uno de los tres sistemas (**SI, SII y SIII**).

En estas figuras se comparan los cromatogramas y superficies de contorno antes y después de aplicar el tratamiento descrito en la pág. 91, observándose una alineación satisfactoria de las señales medidas por ambos detectores.

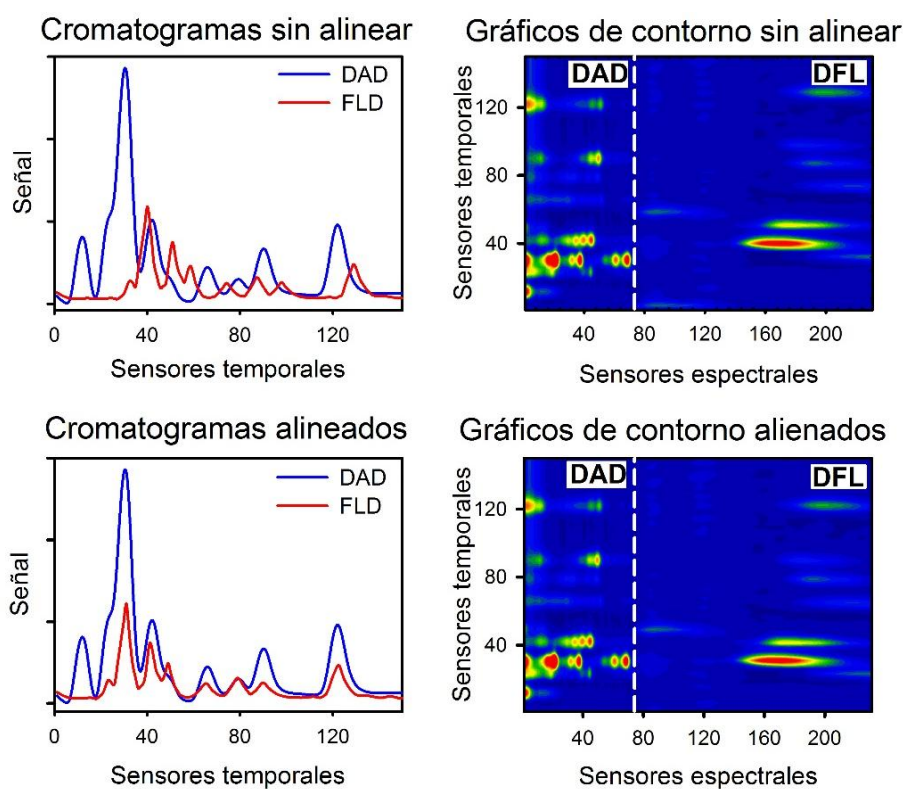


Fig. 33: Cromatogramas DAD ($\lambda_{\text{abs}} = 222 \text{ nm}$) y DFL ($\lambda_{\text{ex}} = 222 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$) para el **SI**, y sus superficies de contorno.

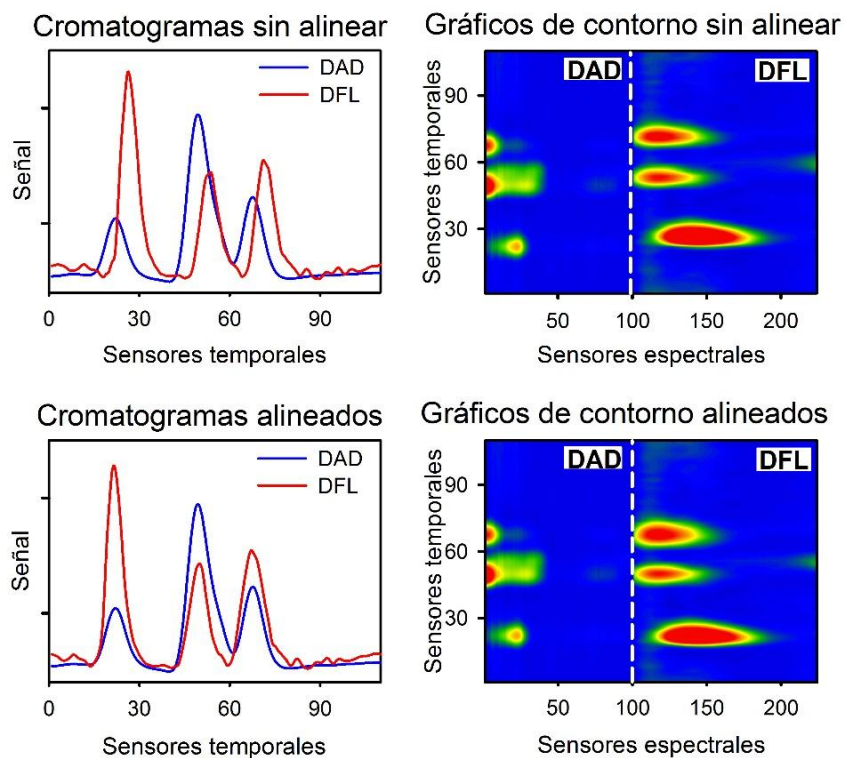


Fig. 34: Cromatogramas DAD ($\lambda_{\text{abs}} = 222 \text{ nm}$) y DFL ($\lambda_{\text{ex}} = 225 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 310 \text{ nm}$) para el SII, y sus superficies de contorno.

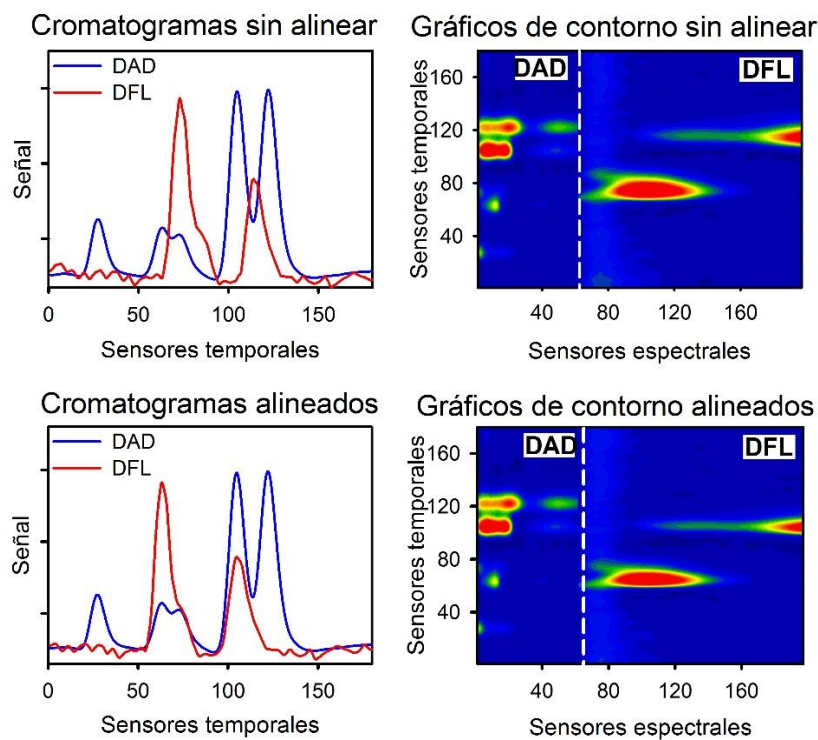


Fig. 35: Cromatogramas DAD ($\lambda_{\text{abs}} = 222 \text{ nm}$) y DFL ($\lambda_{\text{ex}} = 225 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 325 \text{ nm}$) para el SIII, y respectivas superficies de contorno.

Como se explicó previamente, para cada sistema se construyeron tres calibraciones de segundo orden: una a partir de los datos de DAD, otra para los obtenidos por DFL y la restante, con los datos fusionados. Teniendo en cuenta la falta de reproducibilidad de los tiempos de elución de los analitos entre corridas sucesivas, el procesamiento de estos datos se realizó empleando el algoritmo MCR-ALS. Las condiciones de modelado se detallan en la Sección Experimental (pág. 95).

En la **Tabla 23** se especifican el número de componentes, varianza explicada y residuos de ajuste de cada una de las calibraciones construidas para los tres sistemas estudiados.

Tabla 23: Número de componentes estimados (N), residuos de ajuste (S_f) y porcentaje de varianza explicada (VA) en los modelos obtenidos por MCR-ALS para los tres sistemas estudiados.

	DAD			DFL			DAD-DFL		
	N	S_f^a	VA(%)	N	S_f^b	VA(%)	N	S_f^c	VA(%)
SI	12	<0,05	99,4	11	0,15 ^d	92,1	10	<0,1 ^d	96,7
SII	4	<0,05	99,1	3	0,15 ^d	99,7	4	<0,1 ^d	99,4
SIII	6	<0,05	99,2	3	0,15 ^d	98,3	6	<0,1 ^d	99,4

^a en mAU, unidades de mili absorbancia. ^b en unidades arbitrarias de fluorescencia. ^c en unidades arbitrarias de señal. ^d aprox. 1% de la intensidad máxima medida.

Sistema I

Este sistema está compuesto por dos plastificantes xenoestrógenos (NP y DBP) y siete HPAs.

En la **Fig. 36** se muestran dos cromatogramas típicos (absorbancia y fluorescencia) para una muestra de calibrado, los espectros de absorbancia y emisión de fluorescencia de los analitos, y las correspondientes superficies de contorno de las matrices CL-DAD y CL-DFL. En dicha figura se aprecia la baja resolución de las bandas espectrales de los analitos en ambos modos de detección, así como también un alto grado de solapamiento en la dimensión temporal. Como es de esperarse, todos los analitos se detectan en el DAD y sólo los fluorescentes (todos los analitos del sistema a excepción de DBP) se manifiestan en el cromatograma DFL.

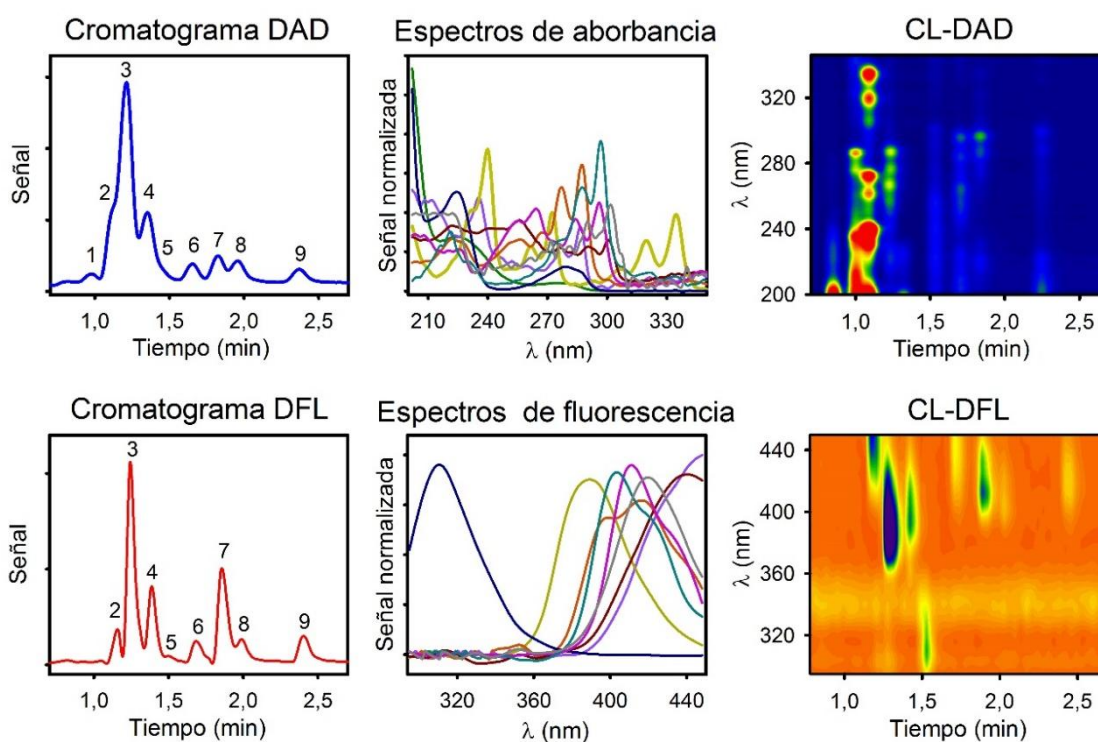


Fig. 36: Cromatogramas de DAD ($\lambda_{\text{abs}} = 222 \text{ nm}$) y DFL ($\lambda_{\text{ex}} = 222 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$) para el SI (izq.), espectros normalizados de absorbancia y emisión de fluorescencia (centro), y sus correspondientes superficies de contorno (derecha). En verde DBP (1), lila: FLT (2), amarillo: PIR (3), naranja: BaA (4), azul marino: NF (5), borgoña: BbF (6), fucsia: BaP (7), celeste: DBA (8) y gris: BghiP (9).

Los analitos DBP (no fluorescente) y NP (poco fluorescente en las condiciones de trabajo) se determinaron únicamente por sus señales en el modo DAD, mientras que los HPAs se cuantificaron utilizando las calibraciones construidas a partir de ambos modos de detección. Además, todos los analitos se determinaron por medio de las calibraciones construidas utilizando datos fusionados. En la **Fig. 37** se muestran los perfiles espectrales y temporales fusionados de los analitos del **SI**, recuperados por MCR-ALS.

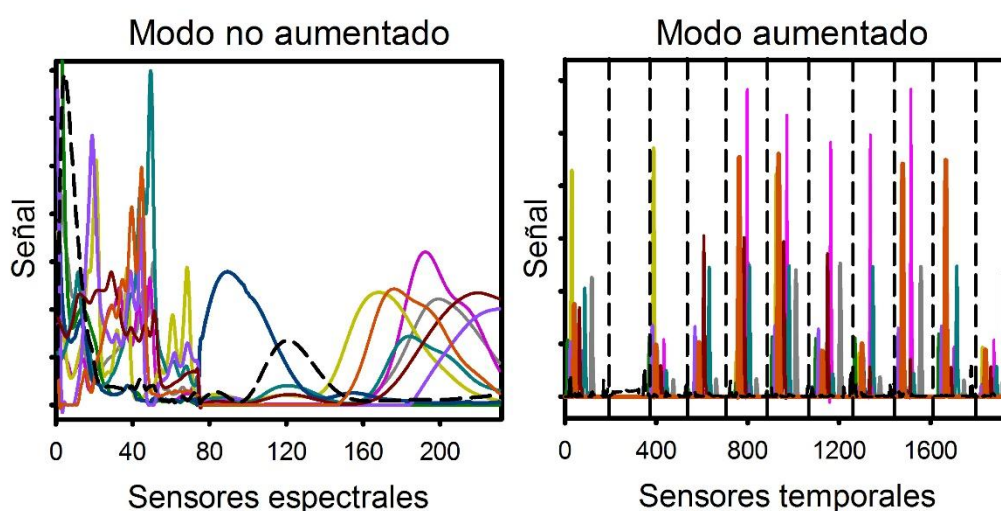


Fig. 37: Perfiles espectrales y temporales modelados por MCR-ALS correspondientes a los datos fusionados del **SI**. En verde DBP, lila: FLT, amarillo: PIR, naranja: BaA, azul marino: NF, borgoña: BbF, fucsia: BaP, celeste: DBA, gris: BghiP, línea negra punteada: interferentes.

La **Tabla 24** muestra las recuperaciones obtenidas mediante ambos métodos de detección para las muestras de validación, así como las obtenidas con los datos fusionados. Por otro lado, las cifras de mérito de las respectivas calibraciones de segundo orden se presentan en la **Tabla 25**.

Tabla 24: Concentraciones nominales y predichas (ng mL⁻¹) por MCR-ALS de los analitos del SI en las muestras de validación.

	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10
DBP^a										
Nominal	93,0	99,0	82,0	60,0	14,0	58,0	81,0	53,0	75,0	74,0
CL-DAD	94	99	83	56	23	58	82	55	75	77
CL-DAD-DFL	94	98	81	56	23	58	81	51	76	75
FLT										
Nominal	38,0	43,0	24,0	49,0	26,0	6,0	11,0	17,0	45,0	21,0
CL-DAD	36	41	24	49	25	5	10	17	45	20
CL-DFL	32	40	22	44	21	10	9	14	38	9
CL-DAD-DFL	39	41	23	51	28	8	11	17	43	20
PIR										
Nominal	49,0	32,0	45,0	40,0	7,0	42,0	22,0	16,0	28,0	12,0
CL-DAD	48,8	31,8	44,3	40,9	7,1	42,0	21,6	16,1	29,2	12,0
CL-DFL	46	31	44	40	7	42	22	16	28	12
CL-DAD-DFL	49,0	32,0	44,7	39,9	7,0	42,8	21,8	16,5	27,3	11,6
BaA										
Nominal	19,0	37,0	17,0	11,0	9,0	42,0	24,0	22,0	32,0	48,0
CL-DAD	18,7	37,0	17,4	11,1	8,4	42,4	24,8	22,9	32,8	49,2
CL-DFL	21	38	16	10	8	44	23	25	35	50
CL-DAD-DFL	19,0	38,9	17,4	12,4	8,5	41,2	24,2	22,8	34,2	49,4
NP^b										
Nominal	12,0	30,0	42,0	37,0	29,0	9,0	47,0	8,0	32,0	23,0
CL-DAD	14	31	43	39	29	7	48	9	32	20
CL-DAD-DFL	12	30	39	38	30	8	46	8	32	21
BbF										
Nominal	26,0	48,0	11,0	15,0	34,0	45,0	36,0	19,0	40,0	35,0
CL-DAD	29	46	12	16	32	46	35	18	40	36
CL-DFL	21	48	9	12	32	49	31	18	40	34
CL-DAD-DFL	28	47	11	15	32	45	37	19	40	32
BaP										
Nominal	8,0	37,0	6,0	41,0	19,0	36,0	23,0	45,0	49,0	30,0
CL-DAD	8	38	7	42	18	37	23	45	49	30
CL-DFL	7	37	7	44	18	36	23	45	49	30
CL-DAD-DFL	7	37	7	44	18	36	23	45	49	30
DBA										
Nominal	42,0	29,0	19,0	9,0	12,0	21,0	32,0	37,0	45,0	30,0
CL-DAD	42	28	19	9	11	21	32	37	44	30
CL-DFL	38	27	12	11	10	19	24	34	45	25
CL-DAD-DFL	42	27	19	9	11	22	32	38	45	30
BghiP										
Nominal	44,0	14,0	24,0	48,0	28,0	21,0	11,0	7,0	33,0	13,0
CL-DAD	46	15	26	51	27	22	13	8	35	14
CL-DFL	44	8	23	47	25	19	9	11	32	13
CL-DAD-DFL	45	11	26	50	27	20	11	6	32	12

^aNo fluorescente. ^bNP no se determinó por DFL debido a falta de selectividad.

Tabla 25: Cifras de mérito para los analitos no fluorescentes (nf) y fluorescentes (f) del SI, determinados por MCR-ALS a partir de los distintos datos de segundo orden, originales y fusionados.

	nf	f							
	<u>DBP</u>	<u>FLT</u>	<u>PIR</u>	<u>BaA</u>	<u>NP^a</u>	<u>BbF</u>	<u>BaP</u>	<u>DBA</u>	<u>BghiP</u>
CL-DAD									
γ (mL ng ⁻¹)	0,09	0,5	1,6	1,5	0,1	0,6	0,7	0,7	0,4
SEL	0,1	0,2	0,4	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,1
LD (ng mL ⁻¹)	38	7,6	2,3	2,5	26	6,2	5,3	5,0	8,6
REP (%)	7	4	2	3	6	6	2	3	7
CL-FLD									
γ (mL ng ⁻¹)		0,01	0,5	0,2		0,01	0,3	0,03	0,03
SEL		0,03	0,2	0,01		0,001	0,1	0,002	0,002
LD (ng mL ⁻¹)		^b	7,8	16		^b	13	^b	^b
REP (%)		22	4	6		12	8	17	11
CL-DAD-FLD									
γ (mL ng ⁻¹)	0,2	0,4	1,8	1,3	0,3	0,6	0,9	1,0	0,4
SEL	0,4	0,4	0,6	0,4	0,8	0,3	0,3	0,5	0,3
LD (ng mL ⁻¹)	24	8,3	2,1	2,8	11	6,6	4,1	3,6	9,1
REP (%)	7	6	2	5	5	5	4	4	5

^a NP no se determinó por DFL debido a una falta de selectividad. ^b Ver texto

En la **Tabla 25** puede observarse que γ y la SEL calculadas utilizando los datos CL-DAD, con valores en los rangos 0,09-1,6 ng⁻¹ mL y 0,1-0,4, respectivamente, son significativamente mayores a las calculadas a partir de los datos CL-DFL (con rangos de 0,01-0,5 ng⁻¹ mL y 0,001-0,2, respectivamente). Con respecto a los REPs, los obtenidos a partir de los datos de DAD (2-7%) también son notablemente mejores a los obtenidos mediante los datos de DFL, que alcanzan valores de hasta 22%. La menor calidad de los resultados obtenidos con CL-DFL para el SI, evidenciada

tanto en las cifras de mérito como en las predicciones para las muestras de validación, puede justificarse si se tiene en cuenta el alto grado de solapamiento espectral de los HPAs analizados en el modo fluorescente. Los LDs de FLT, BbF, DBA y BghiP predichos a partir de los datos CL-DFL fueron exageradamente elevados y, por lo tanto, no se informan en la **Tabla 25**. Estos altos valores de LD derivan de valores de sensibilidad que, calculados con la fórmula clásica, resultaron anómalamente bajos. Dicho fenómeno se encuentra actualmente en estudio.

Si se analizan las cifras de mérito obtenidas a partir de los datos fusionados, se aprecia un aumento significativo de la selectividad de DBP (de 0,1 a 0,4), demostrando que la fusión permite distinguir con mayor facilidad a este analito de los otros componentes del sistema. Este recurso también produjo una disminución del LD de DBP, de 38 ng mL^{-1} a 24 ng mL^{-1} . Si bien la selectividad de los siete HPAs se mejoró con la fusión, con valores de 0,1-0,4 para los datos CL-DAD; 0,001-0,2 para los datos CL-DFL y 0,3-0,6 para los datos fusionados, no generó grandes cambios en sus LDs, considerando los satisfactorios valores obtenidos a partir de los datos CL-DAD. Por otro lado, se observó un importante aumento en la selectividad de NP (de 0,3 a 0,8), y una disminución de su LD de 26 ng mL^{-1} (CL-DAD) a 11 ng mL^{-1} (CL-DAD-DFL).

Los valores de REP calculados a partir de los datos fusionados (todos menores al 7%) sugieren una buena precisión y exactitud de dicho método.

En la **Fig. 38** se presentan los gráficos de *test* de la región conjunta de confianza,⁹⁶ para los tres modos de detección empleados. Al comparar los resultados de este *test* para CL-DAD con el sistema fusionado se concluye que ambos son exactos y que poseen una precisión similar, ya que las dos elipses contienen el punto ideal (1,0) y sus tamaños son comparables. En cambio, al comparar el sistema CL-DFL con el fusionado se observa que la elipse del primero no contiene al punto ideal y, además, es de un tamaño mayor, indicando menor exactitud y precisión.

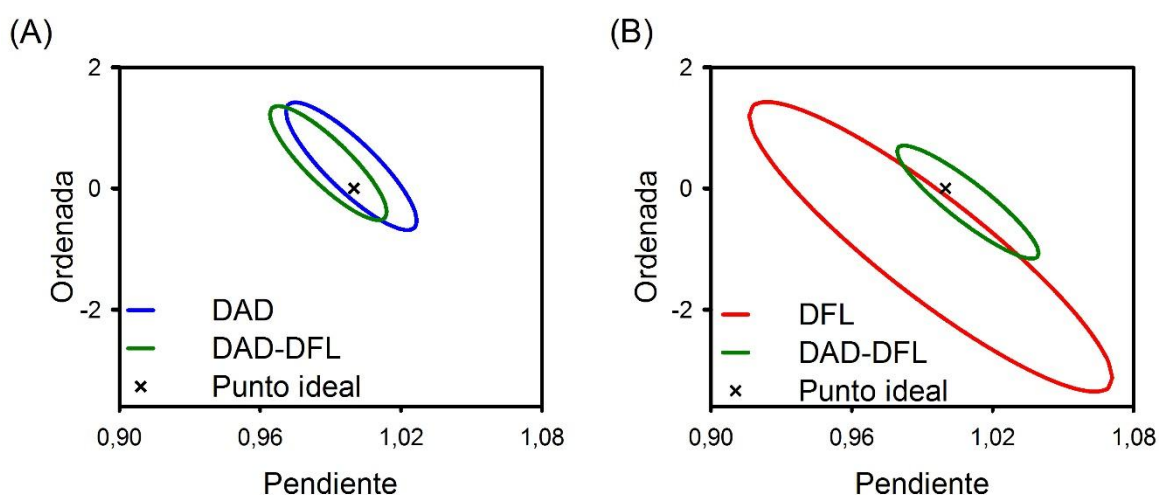


Fig. 38: (A) Elipses obtenidas utilizando CL-DAD y datos fusionados, y (B) utilizando CL-DFL y datos fusionados en el SI. En el primer caso ambas elipses se construyeron para todos los analitos cuantificados por DAD, en el segundo caso tanto la elipse de datos CL-DFL como la de datos fusionados se obtuvieron sólo incluyendo a los analitos que se cuantificaron por fluorescencia.

Sistema II

Este sistema está compuesto por cuatro DEs fluorescentes: CBL, BPA, E2 y NAP.

En la **Fig. 39** se muestran los dos cromatogramas (absorbancia y fluorescencia) para una muestra de calibrado, los espectros de absorbancia y emisión de fluorescencia de los analitos, y las correspondientes superficies de contorno de las matrices CL-DAD y CL-DFL.

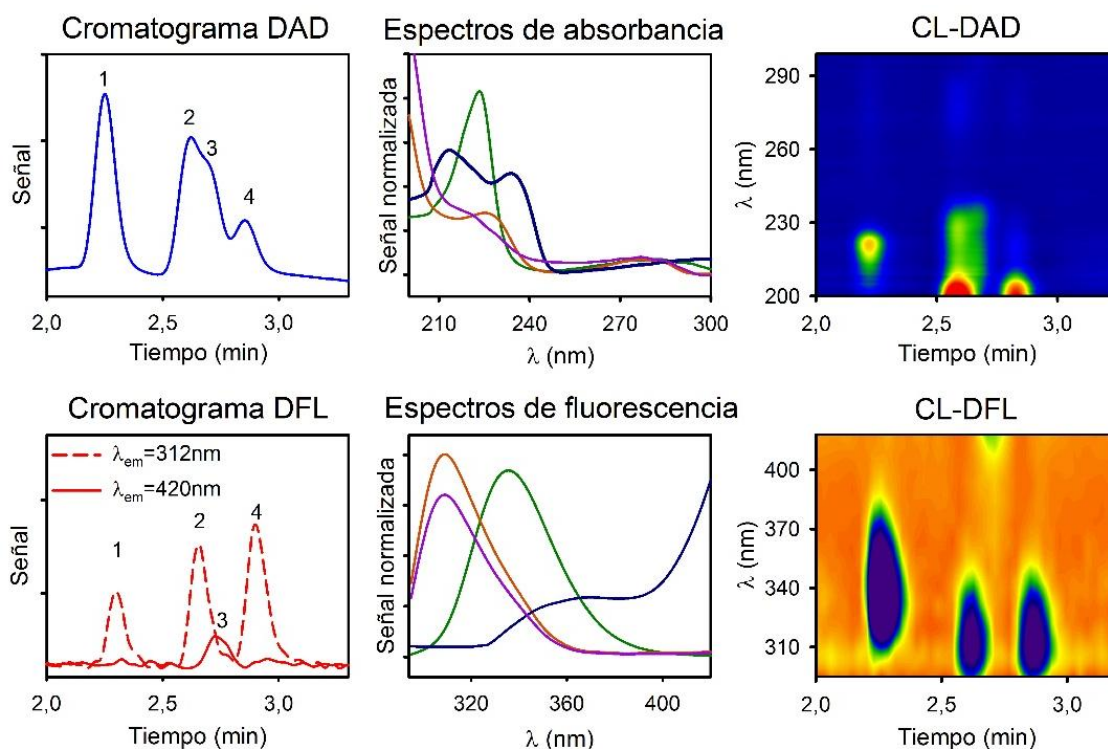


Fig. 39: Cromatogramas de DAD ($\lambda_{abs} = 270\text{ nm}$) y DFL ($\lambda_{ex} = 222\text{ nm}$, $\lambda_{em} = 312\text{ nm}$ línea punteada, $\lambda_{em} = 420\text{ nm}$ en línea continua) para el **SII** (izq.), espectros normalizados de absorbancia y emisión de fluorescencia (centro), y sus correspondientes superficies de contorno (derecha). CBL en verde, (1), BPA en naranja (2), NAP en azul marino (3) y E2 en fucsia (4).

Es importante notar que mientras que CBL y NAP poseen espectros de absorbancia similares, sus espectros de emisión de fluorescencia permiten diferenciarlos, y que CBL exhibe una señal fluorescente muy intensa, aun a bajas concentraciones. Por otro lado, los espectros de emisión de

fluorescencia de BPA y E2 son idénticos, y sus espectros de absorbancia se diferencian levemente en la región 200-240 nm.

En este sistema todos los analitos se cuantificaron mediante las calibraciones de segundo orden construidas a partir de los datos CL-DAD y fusionados. Por otro lado, y debido a una falta de selectividad, los analitos fluorescentes E2 y BPA no se pudieron cuantificar por CL-DFL. En la **Fig. 40** se muestran los perfiles espectrales y temporales fusionados de los analitos de **SII**, recuperados por MCR-ALS.

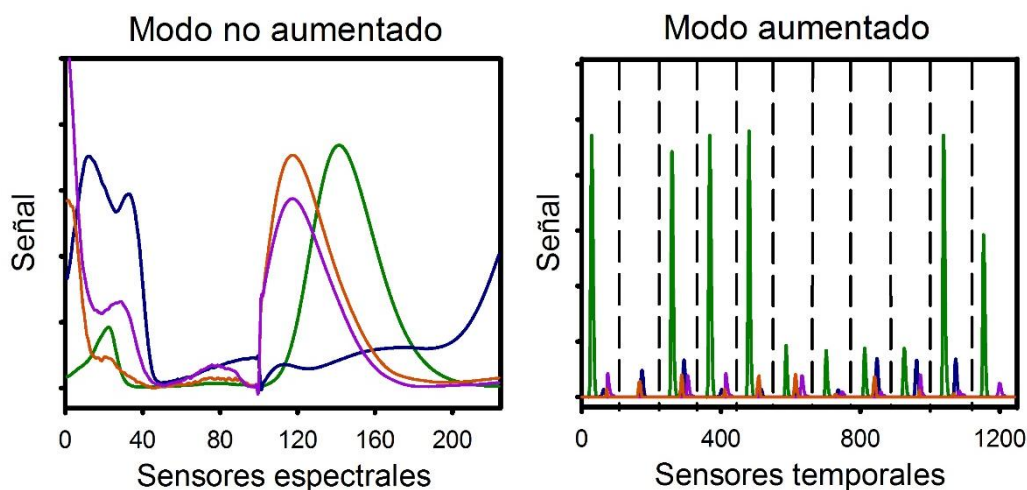


Fig. 40: Perfiles espectrales (izq.) y temporales (der.) modelados por MCR-ALS para los datos fusionados del **SII**. Verde: CBL, naranja: BPA, azul marino: NAP, fucsia: E2.

La **Tabla 26** muestra las recuperaciones obtenidas mediante los dos métodos de detección para las muestras de validación, así como las obtenidas con los datos fusionados. Puede observarse que las predicciones logradas para NAP y CBL empleando ambos detectores (CL-DAD y CL-DFL) son satisfactorias. Por otro lado, para BPA y E2 los valores obtenidos

mediante CL-DAD son aceptables, aunque un poco peores, como resultado del alto grado de solapamiento espectral previamente mencionado.

Tabla 26: Concentraciones nominales y predichas (ng mL^{-1}) por MCR-ALS de los analitos del **SII** en las muestras de validación.

	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10
CBL										
Nominal	39,0	33,0	12,0	31,0	46,0	22,0	19,0	37,0	12,0	7,0
CL-DAD	40,2	34,1	13,4	28,6	46,7	22,5	19,6	38,7	12,6	7,0
CL-DFL	40,8	34,9	13,1	28,8	47,3	22,7	20,0	37,9	11,6	7,0
CL-DAD-DFL	41,2	34,5	12,9	29,1	46,4	21,2	20,7	36,4	13,6	7,3
BPA^a										
Nominal	47,0	15,0	21,0	23,0	8,0	42,0	49,0	34,0	28,0	16,0
CL-DAD	50	16	19	30	11	48	52	37	30	20
CL-DAD-DFL	48	16	20	21	8	43	48	33	31	18
NAP										
Nominal	22,0	14,0	49,0	44,0	16,0	8,0	36,0	19,0	32,0	25,0
CL-DAD	22,7	14,6	49,3	43,6	16,9	10,2	36,3	18,1	31,3	25,2
CL-DFL	24	15	48	43	16	5	36	19	31	24
CL-DAD-DFL	23,3	14,8	49,2	42,8	15,0	8,5	36,2	17,9	30,4	23,9
E2^a										
Nominal	36,0	12,0	22,0	24,0	48,0	15,0	19,0	39,0	26,0	16,0
CL-DAD	35	14	20	18	48	13	13	38	23	16
CL-DAD-DFL	34	13	22	24	49	15	17	41	24	16

^a BPA y E2 no se determinaron por fluorescencia por falta de selectividad.

Por otro lado, las cifras de mérito de las respectivas calibraciones de segundo orden se presentan en la **Tabla 27**. Las selectividades y LDs de CBL

y NAP obtenidas con CL-DAD son significativamente mejores que los correspondientes a BPA y E2. Este resultado está en concordancia con el alto grado de solapamiento presente entre los espectros de absorbancia de BPA y E2.

Por otro lado, se concluye que la fusión de datos no genera mejoras importantes en las cifras de mérito de este sistema.

Tabla 27: Cifras de mérito para los analitos del SII, determinados por MCR-ALS a partir de los distintos datos de segundo orden, originales y fusionados.

	CBL	BPA	NAP	E2
CL-DAD				
γ (mL ng ⁻¹)	4,1	0,5	2,8	0,4
SEL	0,6	0,2	0,4	0,2
LD (ng mL ⁻¹)	1,3	7,2	1,6	11
REP (%)	5	15	4	12
CL-DFL				
γ (mL ng ⁻¹)	9,4		0,7	
SEL	0,8		0,9	
LD (ng mL ⁻¹)	1,0		5,3	
REP (%)	5		5	
CL-DAD-DFL				
γ (mL ng ⁻¹)	13	0,4	1,9	0,3
SEL	0,7	0,2	0,6	0,2
LD (ng mL ⁻¹)	0,9	10	2,2	12
REP (%)	5	6	4	6

En la **Fig. 41** se presentan las gráficas del *test* de la elipse aplicado a las tres calibraciones desarrolladas (CL-DAD, CL-DFL y CL-DAD-DFL). De acuerdo a los resultados de dicho *test* puede concluirse que los tres

métodos son exactos, ya que el punto ideal se encuentra incluido en todas las elipses, pero sus tamaños indican que el método fusionado tiene una precisión levemente mayor. Estos resultados coinciden con los REPs informados en la **Tabla 27** (pág. 168).

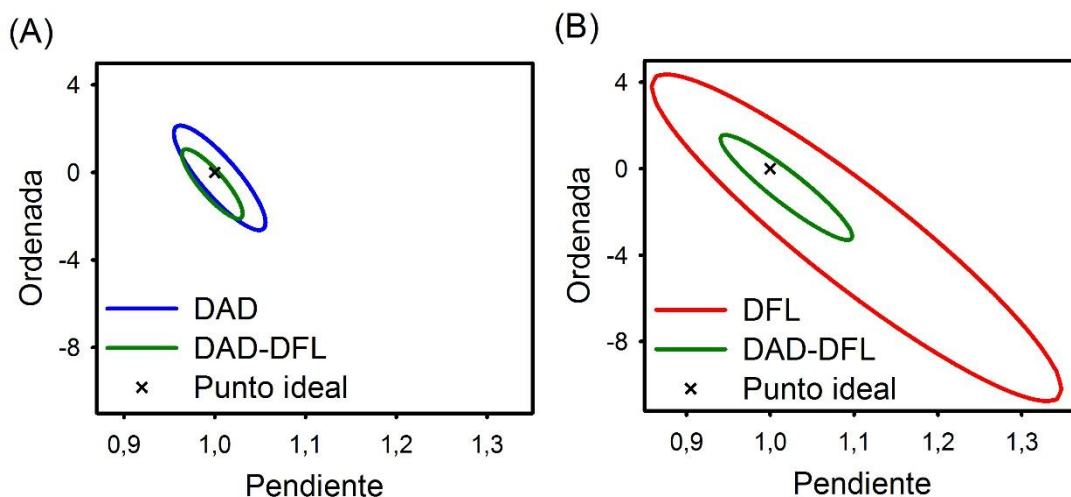


Fig. 41: (A) Elipses obtenidas utilizando DAD y datos fusionados, y (B) utilizando DFL y datos fusionados (der.) en el **SII**. En el primer caso ambas elipses se construyeron para todos los analitos cuantificados por DAD, en el segundo caso tanto la elipse de datos CL-DFL como la de datos fusionados se obtuvieron sólo incluyendo a los analitos que se cuantificaron por fluorescencia.

Sistema III

El **SIII** está compuesto por dos DEs no fluorescentes (DMP y NOR) y tres fluorescentes (CBL, BPA y NAP). En la **Fig. 42** se muestran los dos cromatogramas (absorbancia y fluorescencia) para una muestra de calibrado, los espectros de absorbancia y emisión de fluorescencia de los analitos, y las correspondientes superficies de contorno de las matrices CL-DAD y CL-DFL. Cabe remarcar el alto grado de similitud entre los

espectros de absorbancia de DMP y BPA, así como también el solapamiento temporal entre este último y CBL.

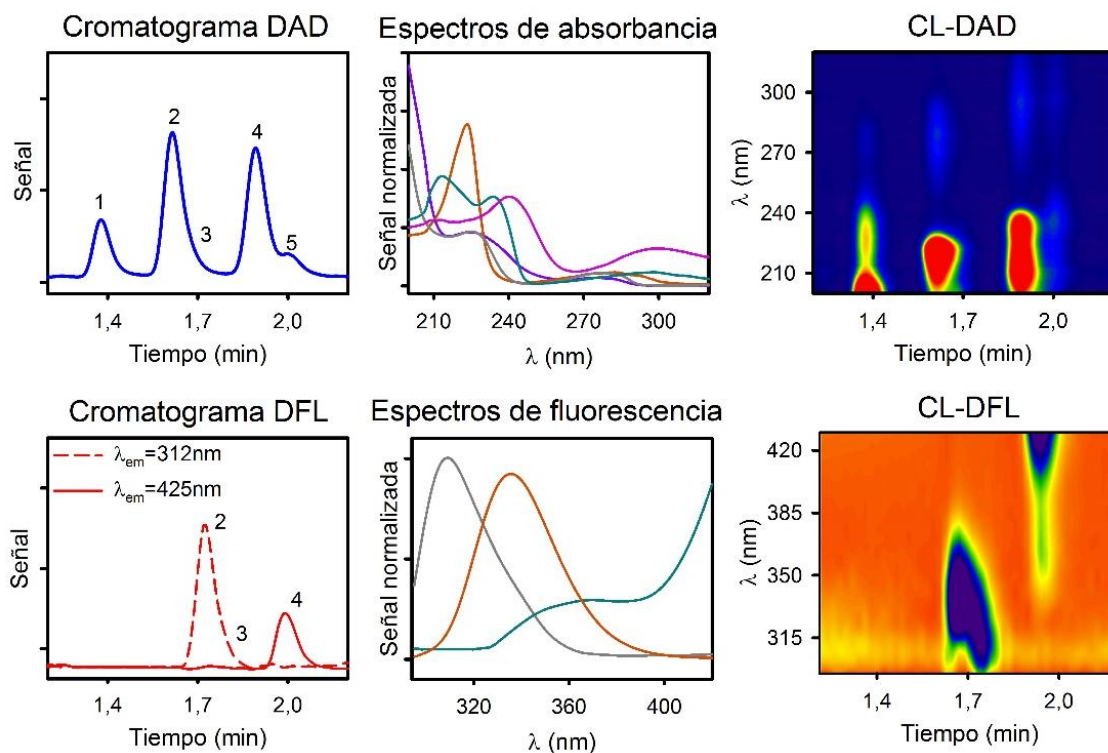


Fig. 42: Cromatogramas de DAD ($\lambda_{\text{abs}} = 222 \text{ nm}$) y DFL ($\lambda_{\text{ex}} = 222 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 312 \text{ nm}$ línea punteada, $\lambda_{\text{em}} = 425 \text{ nm}$ en línea continua) para el SIII (izq.), espectros normalizados de absorbancia y emisión de fluorescencia (centro), y sus correspondientes superficies de contorno (der.). En púrpura (1): DMP, en naranja: CBL (2), en gris: BPA (3), en celeste (4): NAP y en fucsia (5): NOR.

En este caso, los cinco analitos se cuantificaron utilizando los datos de CL-DAD y los datos fusionados. Además, CBL y NAP se cuantificaron por medio de los datos de CL-DFL.

Como puede observarse en la Fig. 43, MCR-ALS logró modelar satisfactoriamente los perfiles del modo espectral fusionado.

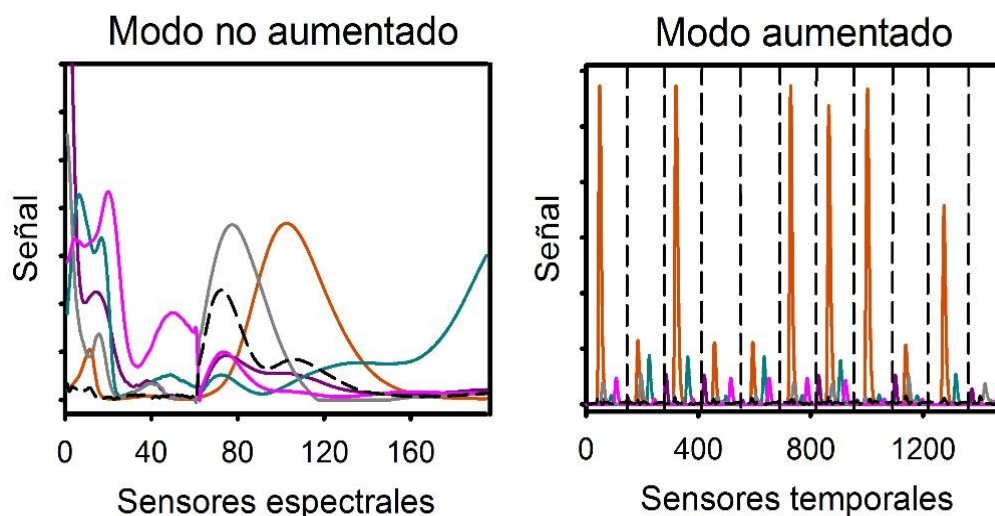


Fig. 43: Perfiles espectrales (izq.) y temporales (der.) modelados por MCR-ALS para los datos fusionados del **SIII**. En púrpura: DMP, en naranja: CBL, en gris: BPA, en cian: NAP, en fucsia: NOR, en negro punteado: interferentes.

Las recuperaciones calculadas para las muestras de validación se exponen en la **Tabla 28**.

El alto grado de solapamiento temporal entre BPA y CBL, sumado a la intensa señal fluorescente de este último, impidieron obtener buenos valores de recuperación de BPA a partir de los datos de CL-DFL.

Por otro lado, en la **Tabla 29** se muestran las cifras de mérito obtenidas para el **SIII** empleando los diferentes tipos de detección y los datos fusionados.

Tabla 28: Concentraciones nominales y predichas (ng mL⁻¹) por MCR-ALS de los analitos del **SIII** en las muestras de validación.

	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10
DMP^a										
Nominal	98,0	47,0	64,0	78,0	25,0	94,0	72,0	87,0	58,0	27,0
CL-DAD	96	46	77	79	25	91	70	76	59	28
CL-DAD-DFL	97	46	68	80	22	95	72	80	57	25
CBL										
Nominal	47,0	25,0	38,0	15,0	21,0	8,0	36,0	11,0	40,0	17,0
CL-DAD	46,1	24,1	35,7	14,9	20,6	8,0	34,5	9,5	42,9	15,4
CL-DFL	45,4	24,3	37,4	14,6	19,6	7,8	34,6	9,4	41,5	14,8
CL-DAD-DFL	47,2	23,7	36,3	13,9	21,9	7,5	34,9	12,7	39,1	16,1
BPA^b										
Nominal	36,0	43,0	26,0	33,0	12,0	42,0	14,0	24,0	18,0	38,0
CL-DAD	34	41	28	31	10	45	15	24	18	36
CL-DAD-DFL	35	40	23	30	11	45	15	22	18	38
NAP										
Nominal	22,0	38,0	29,0	14,0	49,0	42,0	29,0	21,0	34,0	37,0
CL-DAD	21	38	26	14	48	43	30	19	36	35
CL-DFL	22,5	37,8	29,8	14,2	51,2	44,1	28,9	19,0	33,2	37,4
CL-DAD-DFL	22,2	40,0	27,2	14,2	50,2	43,5	28,7	19,0	34,6	36,8
NOR^a										
Nominal	38,0	56,0	95,0	72,0	24,0	97,0	65,0	32,0	15,0	18,0
CL-DAD	38	56	98	72	25	102	70	31	17	20
CL-DAD-DFL	35	53	92	71	20	97	65	33	16	16

^a No fluorescentes. ^b BPA no se determinó por DFL por falta de selectividad.

Tabla 29: Cifras de mérito para los analitos no fluorescentes (nf) y fluorescentes (f) del SIII, determinados por MCR-ALS a partir de los distintos datos de segundo orden, originales y fusionados.

	nf		f		
	DMP	NOR	CBL	BPA ^a	NAP
CL-DAD					
γ (mL ng ⁻¹)	0,1	0,6	1,6	0,2	1,0
SEL	0,1	0,4	0,4	0,1	0,3
LD (ng mL ⁻¹)	28	6,7	2,5	25	4,0
REP (%)	11	5	6	8	7
CL-DFL					
γ (mL ng ⁻¹)			5,4		1,7
SEL			0,8		1,0
LD (ng mL ⁻¹)			1,2		2,4
REP (%)			5		5
CL-DAD-DFL					
γ (mL ng ⁻¹)	0,6	1,0	35	1,0	4,1
SEL	0,4	0,7	0,9	0,4	0,7
LD (ng mL ⁻¹)	6,3	3,7	0,9	3,9	1,3
REP (%)	6	4	4	7	5

^a BPA no se determinó por DFL debido a una falta de selectividad.

Las cifras obtenidas para CBL, NAP y NOR por medio de los datos CL-DAD son satisfactorias, así como también la calidad predictiva de este sistema, evidenciada en los bajos REPs. Cuando los analitos se modelaron utilizando los datos CL-DFL, las cifras de mérito fueron levemente mejores, debido a la mayor sensibilidad del detector de fluorescencia.

Con respecto a las cifras obtenidas utilizando los datos CL-DAD-DFL, se concluye que la fusión tuvo un efecto positivo en la sensibilidad, selectividad y LDs de todos los analitos. Se observan, además, mejoras en los REPs, con valores en el rango 4-7%. La fusión de datos mejoró la

selectividad entre BPA y DMP, y a su vez facilitó el modelado del perfil de BPA, aún en presencia de altas concentraciones de CBL. Mediante el empleo de datos fusionados se logró un aumento significativo de la sensibilidad y selectividad de BPA y DMP (de entre 4 y 6 veces). Se destaca que la aplicación de la fusión en la cuantificación de DMP y BPA fue primordial ya que la baja selectividad entre ambos analitos en el modo espectral absorbancia no permitió obtener buenos resultados mediante los datos de LC-DAD. Además, el LD para DMP ($LD= 6,3 \text{ ng mL}^{-1}$) fue cuatro veces menor al obtenido a partir de los datos de CL-DAD ($LD= 28 \text{ ng mL}^{-1}$), y el LD para BPA ($LD= 3,9 \text{ ng mL}^{-1}$) fue seis veces menor al calculado para CL-DAD ($LD= 25 \text{ ng mL}^{-1}$).

Por otro lado, si bien las cifras obtenidas para CBL, NAP y NOR correspondientes a ambos modos espectrales por separado fueron satisfactorias, el empleo de la fusión permitió mejorar notablemente tanto los LDs como los REPs de dichos analitos.

En la **Fig. 44** se presentan los gráficos EJCR para las predicciones utilizando los tres tipos de datos de segundo orden. Si bien en todos los casos se puede afirmar que los métodos son exactos, ya que todas las elipses contienen al punto ideal (1,0), el uso de datos fusionados produce resultados más precisos, lo cual se evidencia en el menor tamaño de las elipses correspondientes.

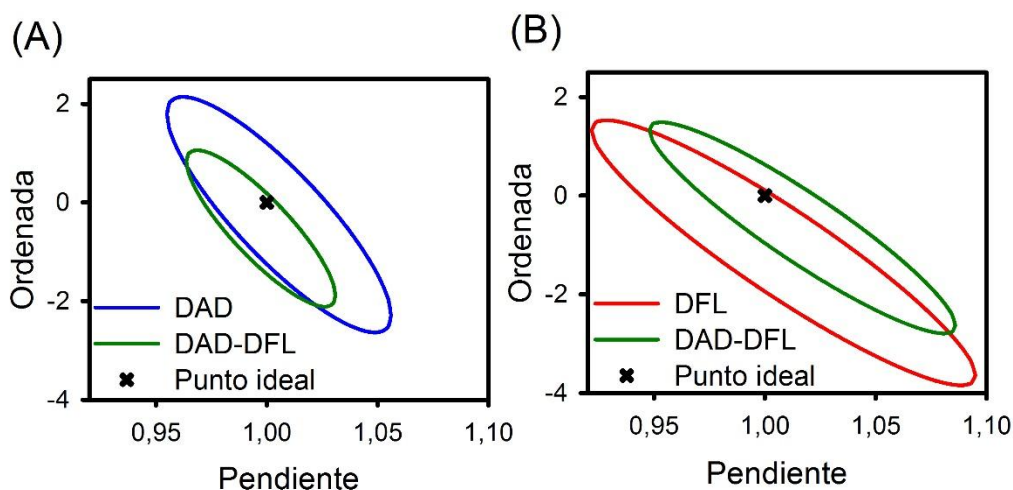


Fig. 44: Elipses obtenidas utilizando DAD y datos fusionados (izq.), y utilizando DFL y datos fusionados (der.) para el **SIII**. En el primer caso ambas elipses se construyeron para todos los analitos cuantificados por DAD, en el segundo caso tanto la elipse de datos CL-DFL como la de datos fusionados se obtuvieron sólo incluyendo a los analitos que se cuantificaron por fluorescencia.

Muestras reales

Teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos en la fusión de datos para el **SIII**, se decidió emplear este sistema para realizar un estudio de recuperación en muestras reales de aguas (pozo, río y red). Debido a la presencia de interferentes propios de las matrices analizadas, MCR-ALS requirió uno o dos componentes adicionales para modelar adecuadamente cada una de las muestras, obteniéndose una varianza explicada mayor a 99% en todos los casos. A modo comparativo, en la **Fig. 45** se muestran las superficies de contorno de las matrices fusionadas para una muestra de calibrado y una muestra de agua de red, de similar concentración para los cinco analitos estudiados.

Por otro lado, en la **Tabla 30** se detallan las recuperaciones obtenidas para muestras reales, empleando las señales de absorbancia y fluorescencia individuales y los datos fusionados.

Tabla 30: Concentraciones nominales y predichas (ng mL^{-1}) por MCR-ALS de las muestras reales (MR) adicionadas con los analitos del SIII.^a

	Muestras adicionadas					
	MR1 ^d	MR2 ^d	MR3 ^d	MR4 ^e	MR5 ^e	MR6 ^f
DMP^b						
Nominal	47,0	62,0	120,0	93,0	50,0	100,0
CL-DAD	43(10)	68(8)	92(8)	82(10)	52(10)	77(8)
CL-DAD-DFL	52(3)	67(3)	118(5)	92(3)	50(3)	95(3)
CBL						
Nominal	17,0	23,0	7,0	26,0	15,0	20,0
CL-DAD	15,8(7)	21,2(7)	7,2(7)	29,5(8)	14,0(8)	17,0(7)
CL-DFL	15(1)	21(1)	7(1)	28(1)	14(1)	18(1)
CL-DAD-DFL	17,0(5)	21,7(3)	6,7(3)	26,5(5)	15,2(5)	19,3(5)
BPA^c						
Nominal	50,0	53,0	32,0	70,0	63,0	42,0
CL-DAD	52(8)	60(8)	35(8)	51(13)	40(10)	38(7)
CL-DAD-DFL	50(2)	55(3)	32(2)	70(3)	62(3)	39(2)
NAP						
Nominal	17,0	22,0	37,0	13,0	17,0	67,0
CL-DAD	20(3)	15(2)	32(2)	10(3)	13(3)	62(2)
CL-DFL	18(3)	16(3)	27(3)	14(3)	18(3)	62(3)
CL-DAD-DFL	16,8(7)	18,7(7)	34,7(5)	12,8(5)	15,7(7)	65,8(5)
NOR^b						
Nominal	117,0	93,0	33,0	43,0	57,0	137,0
CL-DAD	122(3)	97(3)	38(3)	42(3)	52(3)	140(3)
CL-DAD-DFL	122(3)	95(3)	35(3)	43(3)	54(3)	132(2)

^a Desvíos estándar en la última cifra entre paréntesis. ^b No fluorescente. ^c BPA no se determinó por fluorescencia debido a una falta de selectividad. ^d Agua de pozo. ^e Agua de red. ^f Agua de río.

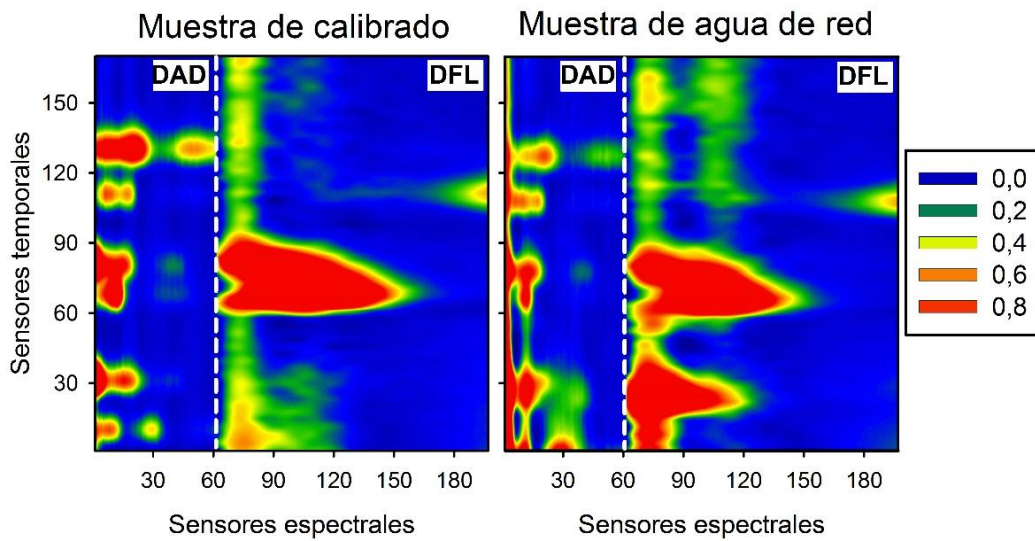


Fig. 45: Superficies de contorno fusionadas para una muestra de calibrado y una muestra de agua de red.

En la **Fig. 46** muestra el gráfico de concentraciones predichas mediante los datos fusionados *versus* concentraciones nominales para las seis muestras analizadas, observándose una buena correlación de los datos para todos los analitos.

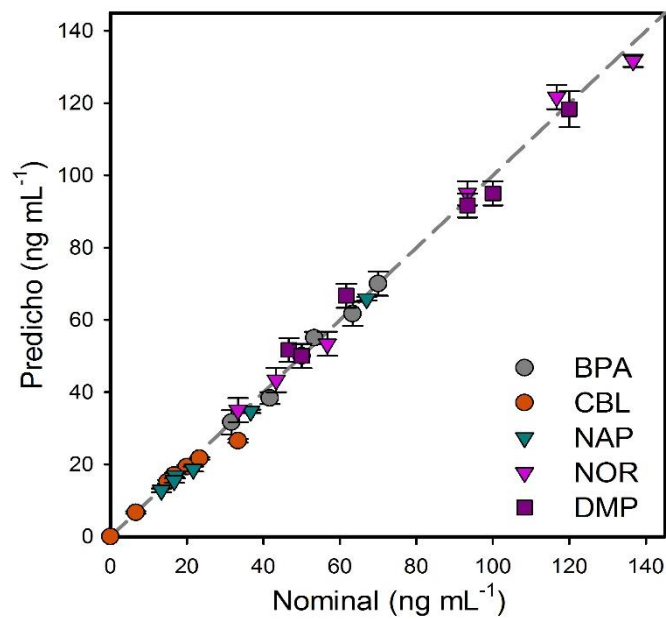


Fig. 46: Gráfica de valores predichos *vs* nominales para las muestras reales, obtenidos a partir de los datos de segundo orden fusionados.

Finalmente, en la **Fig. 47** se presentan las gráficas para el *test* de la elipse para los tres tipos de datos estudiados (CL-DAD, CL-DFL y CL-DAD-DFL). Nuevamente se concluye que si bien en los tres casos se comprueba la exactitud del método, el menor tamaño de la elipse correspondiente a la calibración obtenida con los datos fusionados indica que esta última es significativamente más precisa.

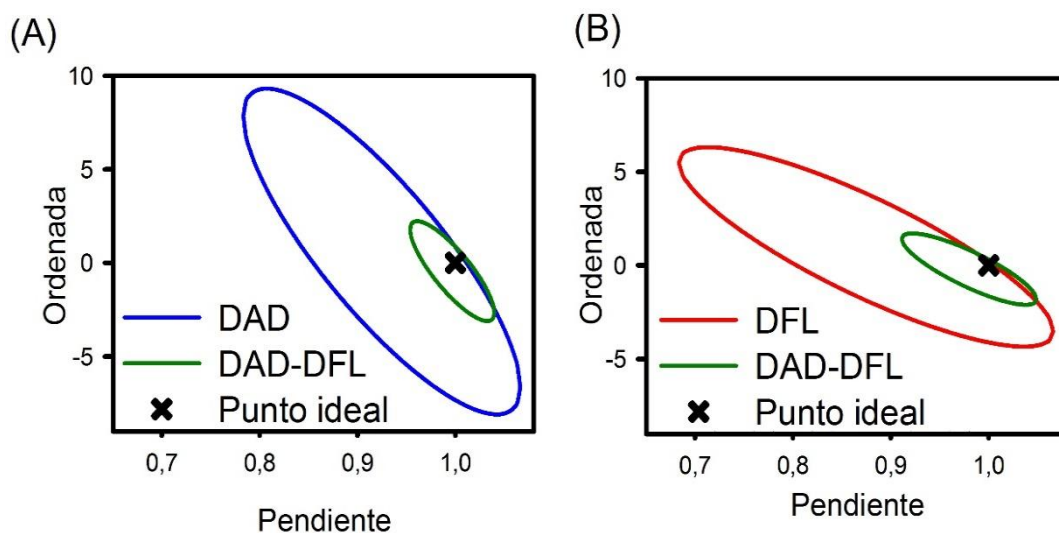


Fig. 47: Elipses obtenidas para las muestras reales, utilizando DAD y datos fusionados (A), y utilizando DFL y datos fusionados (B). En el primer caso ambas elipses se construyeron para todos los analitos cuantificados por DAD, en el segundo caso tanto la elipse de datos CL-DFL como la de datos fusionados se obtuvieron sólo incluyendo a los analitos que se cuantificaron por fluorescencia.

Conclusiones Parciales

La estrategia de fusión propuesta proporciona una forma útil y confiable de mejorar la calidad analítica de los resultados en el análisis de datos de segundo orden de origen cromatográfico.

El protocolo propuesto para la fusión de los datos permitió compatibilizar matrices de diferentes tamaños, y alinear las señales de los analitos medidas en ambos detectores, aun en presencia de corrimientos variables a lo largo del cromatograma.

El beneficio de la fusión se comprobó tanto en muestras sintéticas de validación como en matrices reales, cuando los analitos no se pueden cuantificar a partir de detectores individuales y en casos de baja selectividad.

Se debe destacar que este recurso sumó ventajas a las ya adquiridas con el acoplamiento de la cromatografía con detección dual y el análisis quimiométrico.



CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de tesis se evaluaron estrategias analíticas basadas en fluorescencia molecular y cromatografía de líquidos (CLAE) acopladas a calibración de orden superior, con el objetivo de abordar el desafío actual que representa para la química analítica el desarrollo de metodologías que no contaminen el ambiente que se pretende proteger.

En este sentido, considerando los beneficios ofrecidos por los medios organizados a las técnicas luminiscentes en relación al aumento de sensibilidad y selectividad de estos métodos y a su compatibilidad con sistemas acuosos, en una primera etapa se estudiaron las propiedades fluorescentes de disruptores endócrinos derivados de plásticos en presencia de ciclodextrinas (CDs) y medios micelares. Específicamente, se demostró que las bajas intensidades de fluorescencia de bisfenol A (BPA), octilfenol (OP) y nonilfenol (NP) se incrementaron en presencia de β -CD nativa y β -CDs sustituidas. Este comportamiento es resultado de la formación de complejos de inclusión que desfavorecen los procesos de desactivación no radiante. Empleando métodos espectroscópicos y cálculos semiempíricos, se determinaron las estequiometrías, posibles geometrías y estabildades de los complejos formados. Por otro lado, se mejoraron los límites de detección fluorimétricos mediante la formación de complejos disruptor endócrino-CD en solución acuosa.

A partir de los resultados obtenidos, se propuso un método espectrofluorimétrico de segundo orden para la determinación simultánea

de NP y BPA en materiales plásticos, registrando matrices de excitación-emisión de fluorescencia en presencia de metil- β -CD. El tratamiento computacional de los datos utilizando el algoritmo U-PLS/RBL permitió la determinación de los analitos a niveles de partes por billón, sin necesidad de etapas de pre-concentración, aún en presencia de altas concentraciones de potenciales interferentes.

En la siguiente etapa, se desarrolló un método cromatográfico con detección dual (espectrofotométrica y espectrofluorimétrica) para la determinación de BPA, OP, NP y tres ésteres del ácido ftálico (dietilftalato, dibutilftalato y dietilhexilftalato) en bebidas envasadas en recipientes plásticos o que tuvieron contacto con este tipo de materiales durante el proceso de elaboración. Los analitos se cuantificaron de acuerdo a su señal más conveniente (absorbancia o emisión de fluorescencia), empleando calibración de segundo orden. En este caso los datos registrados correspondieron a matrices tiempo de elución-longitud de onda de absorbancia y tiempo de elución-longitud de onda de emisión fluorescente. El procesamiento de los datos mediante MCR-ALS permitió resolver el solapamiento temporal y espectral de los analitos, en presencia de constituyentes propios de las muestras analizadas, simplificando considerablemente el tratamiento previo y disminuyendo el tiempo de análisis y el volumen de solvente, en comparación con los métodos cromatográficos habitualmente empleados en este tipo de análisis. Los

resultados se validaron exitosamente frente a un método de referencia utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Con el propósito de evaluar las potenciales ventajas de la sinergia y complementariedad de datos provenientes de distintas fuentes, se fusionaron por primera vez datos cromatográficos de segundo orden obtenidos mediante el análisis por CLAE con detección dual (por arreglo de diodos y fluorescente) y se procesaron quimiométricamente para la cuantificación de analitos coeluyentes pertenecientes a tres sistemas experimentales modelo constituidos por disruptores endócrinos. Esta estrategia permitió mejorar notablemente las cifras de mérito y la calidad predictiva de las calibraciones construidas, en comparación con el análisis independiente de los datos obtenidos por ambos modos de detección. Las mejoras más significativas se observaron en aquellos casos en los que un único modo de detección no brindó la selectividad necesaria para modelar adecuadamente al analito en cuestión. Esta ventaja se evidenció tanto en muestras sintéticas como en el análisis de muestras reales, abriendo un nuevo abanico de posibilidades para el tratamiento de datos provenientes de distintas fuentes y que aún no han sido explorados con este recurso.

Finalmente, y en concordancia con los objetivos planteados, podemos enunciar que en todos los sistemas estudiados la implementación de nuevas estrategias experimentales, sumadas al tratamiento quimiométrico de los datos permitió simplificar significativamente el pre-tratamiento de las muestras y los requisitos de medida de los perfiles espectrales y

temporales durante la adquisición de las señales. Como consecuencia, se logró reducir el consumo de solventes tóxicos, la producción de desechos contaminantes y el tiempo total de análisis, con un concomitante ahorro de energía y trabajo experimental, posibilitando el desarrollo de métodos alineados con los principios de la química analítica verde y la mejora de sus propiedades analíticas básicas: precisión, sensibilidad y selectividad.



RESUMEN

RESUMEN

Los contaminantes emergentes son sustancias que no integran naturalmente los ecosistemas, y que al encontrarse biodisponibles pueden producir efectos adversos en los seres vivos. Se detectan con frecuencia en aguas naturales y suelo y, si bien su presencia debe controlarse en forma estricta, su regulación legal es incompleta. Dentro de ellos se incluyen a los disruptores endócrinos (DEs), moléculas de origen natural o artificial con propiedades hormono-miméticas, que aún a muy bajas dosis pueden interferir con la síntesis, almacenaje, transporte, y acción de hormonas naturales.

Los DEs presentes en el ambiente son de variada naturaleza química y provienen de diferentes fuentes tales como productos farmacéuticos, productos de cuidado e higiene personal, compuestos sintéticos derivados de polímeros, pesticidas, compuestos naturalmente presentes en plantas, organometálicos, compuestos producidos en la combustión incompleta de materia orgánica, entre otros.

Recientemente, en un gran número de publicaciones se ha informado la presencia de DEs en alimentos, en envases plásticos e incluso en muestras de orina humana, demostrando, por un lado, el alto grado de exposición del hombre a dichas sustancias, y a su vez, la fuerte necesidad de desarrollar métodos analíticos para su detección y cuantificación a niveles de vestigios en una gran variedad de matrices.

En el presente trabajo de tesis se proponen estrategias y metodologías analíticas para la determinación de DEs en matrices de interés alimenticio y ambiental. Los métodos propuestos están basados en el análisis quimiométrico de datos multivariados de origen espectroscópico y/o cromatográfico, siguiendo dos objetivos primordiales:

- Obtener métodos sensibles, exactos y precisos, que permitan determinar los compuestos de interés a niveles de vestigios, con un mínimo pre-tratamiento de las muestras, aún en presencia de potenciales interferentes.

- Desarrollar dichos métodos bajo los principios de la química analítica verde, es decir reduciendo o eliminando el uso o generación de productos o reactivos peligrosos para la salud humana o el ambiente.

En la primera etapa de este trabajo se estudiaron DEs derivados del fenol: bisfenol A (BPA), empleado en la manufactura de polímeros policarbonatos y resinas epoxy, 4-octilfenol (OP) y 4-nonilfenol (NP), ambos precursores en la manufactura de surfactantes no iónicos, detergentes hogareños y pesticidas. Se evaluaron sus propiedades espectrofluorimétricas en presencia de medios organizados y la posibilidad de que estas señales permitan desarrollar metodologías analíticas amigables con el ambiente. Se demostró que las señales fluorescentes de los analitos estudiados en agua aumentan significativamente en presencia de β -ciclodextrinas nativas y modificadas, sugiriendo la formación de complejos de inclusión. Se determinaron las estequiometrías de los

complejos formados, sus constantes de equilibrio en medio acuoso, y se propusieron posibles estructuras de dichos complejos, evaluándose las variables fisicoquímicas que influyen en la calidad de las señales luminiscentes. A partir de los resultados obtenidos se establecieron las condiciones de trabajo óptimas para la determinación espectrofluorimétrica de BPA, OP y NP, se construyeron las respectivas curvas de calibración univariadas y se calcularon las correspondientes cifras de mérito.

En una segunda etapa, la alta sensibilidad de la fluorescencia en medios organizados combinada con la selectividad de la calibración multivariada se emplearon para la determinación de NP y BPA en muestras de plásticos, mediante la obtención de matrices excitación-emisión de fluorescencia en presencia de metil- β -ciclodextrina. Los datos se analizaron aplicando diferentes algoritmos de segundo orden, obteniendo las mejores predicciones mediante U-PLS/RBL (cuadrados mínimos parciales desdoblados acoplados a bilinearización residual). Los resultados obtenidos se validaron frente a un método de referencia utilizando cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE). El método propuesto permitió alcanzar límites de detección del orden de las partes por billón, sin necesidad de etapas de pre-concentración, aún en presencia de altas concentraciones de interferentes y con un importante solapamiento espectral. De esta manera, se evitó el uso de grandes cantidades de

solventes orgánicos y técnicas separativas, resultando ser una técnica rápida, sensible, sencilla y verde.

Posteriormente, se desarrolló un método cromatográfico con detección dual de arreglo de diodos y fluorescencia para la determinación de BPA, OP, NP y de ésteres del ácido ftálico (dietilftalato, dibutilftalato y dietilhexilftalato). Estos ésteres son DEs que se usan como plastificantes en la producción de polietileno, cloruro de polivinilo y otros materiales sintéticos, y no presentan propiedades fluorescentes. Siguiendo los principios de la química analítica verde, las condiciones experimentales se optimizaron minimizando el consumo de solventes orgánicos y el tiempo de análisis, aún en detrimento de la resolución. En consecuencia, y con el fin de remediar la pérdida parcial de resolución en los cromatogramas, se propuso una calibración multivariada. Se obtuvieron datos de segundo orden del tipo tiempo de elución-longitud de onda de absorbancia y tiempo de elución-longitud de onda de emisión de fluorescencia. De esta manera, los analitos se detectaron por medio de la señal más conveniente, de acuerdo a sus propiedades espectroscópicas. Las matrices se procesaron con el algoritmo MCR-ALS (resolución multivariada de curvas mediante mínimos cuadrados alternantes). El método propuesto se empleó en la cuantificación de DEs en bebidas envasadas en recipientes plásticos o que tuvieron contacto con este tipo de materiales durante el proceso de elaboración (gaseosas, jugos, agua mineral, vinos, cervezas y bebidas blancas). Los resultados se validaron frente a un método de referencia

utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se determinaron las cifras de mérito, observando que los límites de cuantificación logrados son adecuados para la determinación de los analitos en las muestras estudiadas. La aplicación de análisis multivariado permitió resolver el solapamiento temporal y espectral entre las señales de los analitos, aún en presencia de potenciales interferentes propios de las muestras analizadas, simplificando considerablemente el tratamiento previo y disminuyendo el tiempo de análisis y el volumen de solvente, en comparación con los métodos cromatográficos tradicionales.

Finalmente, se fusionaron por primera vez datos cromatográficos de segundo orden (tiempo de elución-longitud de onda de absorción y tiempo de elución-longitud de onda de emisión de fluorescencia), obtenidos mediante el análisis por CLAE con detección dual y se procesaron quimiométricamente para la cuantificación de analitos coeluyentes. Los sistemas experimentales incluyeron DEs de diferente origen y naturaleza química (agroquímicos, hormonas, plastificantes e hidrocarburos policíclicos aromáticos), algunos de los cuales presentan propiedades fluorescentes. En cada caso, se optimizaron las condiciones experimentales de análisis aplicando nuevamente los principios de la química analítica verde. Una vez obtenidos los datos de segundo orden, se los fusionó por medio de un protocolo desarrollado en esta tesis, basado en alineamiento optimizado de correlación unidimensional. Las matrices fusionadas se modelaron mediante MCR-ALS. Además, los datos provenientes de ambos

detectores se procesaron independientemente, empleando el mismo algoritmo. Se compararon las cifras de mérito correspondientes a los datos fusionados y sin fusionar, observándose que la fusión permitió obtener importantes mejoras respecto al uso de un único detector en los tres sistemas estudiados. Las ventajas más significativas se obtuvieron en aquellos casos en los que un único modo de detección no brindó la selectividad necesaria para modelar adecuadamente al analito en cuestión. Además, en todos los sistemas se logró una disminución en los límites de detección y una mejora en la calidad predictiva, evidenciada en los bajos errores relativos de predicción alcanzados. Estas mismas ventajas de la fusión se verificaron en muestras reales, mediante un estudio de recuperación en muestras de aguas ambientales adicionadas.

En conclusión, las nuevas estrategias experimentales, sumadas al tratamiento quimiométrico de los datos, permitieron el desarrollo de métodos alineados con los principios de la química analítica verde, a la vez que se mejoraron significativamente sus propiedades analíticas básicas: precisión, sensibilidad y selectividad.



REFERENCIAS

REFERENCIAS

- 1- Susarla, S.; Medina, V.F.; McCutcheon, S.C. (2002). Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol. Eng.* **18**, 647-658.
- 2- Richardson, S.D.; Ternes, T.A. (2011). Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.*, **83**, 4614-4648.
- 3- Chang, H.-S.; Choo, K.-H.; Lee, B.; Choi, S.-J. (2009). The methods of identification, analysis, and removal of endocrine disrupting compounds (EDCs) in water. *J. Hazard. Mater.* **172**, 1-12.
- 4- Guo, Y.; Zhang, Z.; Liu, L.; Li, Y.; Ren, N.; Kannan, K. (2012). Occurrence and Profiles of Phthalates in Foodstuffs from China and Their Implications for Human Exposure. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 6913-6919.
- 5- Xu, D.; Deng, X.; Fang, E.; Zheng, X.; Zhou, Y.; Lin, L.; Huang, Z. (2014). Determination of 23 phthalic acid esters in food by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1324**, 49-56.
- 6- Jen, J.F.; Liu, T.C. (2006). Determination of phthalate esters from food-contacted materials by on-line microdialysis and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1130**, 28-33.
- 7- Lacroix, M.Z.; Puel, S.; Collet, S. H.; Corbel, T.; Picard-Hagen, N.; Toutain, P.L.; Gayraud, V. (2011). Simultaneous quantification of bisphenol A and its glucuronide metabolite (BPA-G) in plasma and urine: applicability to toxicokinetic investigations. *Talanta* **85**, 2053-9.
- 8- Ballesteros-Gómez, A.; Rubio, S. (2011). Recent Advances in Environmental Analysis. *Anal. Chem.* **83**, 4579-4613.
- 9- Olivieri, A.C. (2008). Analytical Advantages of Multivariate Data Processing. One, Two, Three, Infinity? *Anal. Chem.* **80**, 5713-5720.
- 10- Anastas, P.T.; Warner, J.C. (1998). Green Chemistry: Theory and Practice. Oxford University Press, Oxford, Inglaterra.
- 11- Gałuszka, A.; Migaszewski, Z.; Namieśnik, J. (2013). The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends Anal. Chem.* **50**, 78-84.
- 12- Molina-Díaz, A.; García-Reyes J.F.; Gilbert-López, B. (2010). Solid-phase spectroscopy from the point of view of green analytical chemistry. *TrAC Trends Anal. Chem.* **29**, 654-666.
- 13- López-Darias, J.; Germán-Hernández, M.; Pino, V.; Alfonso, A.M. (2010). Dispersive liquid-liquid microextraction versus single-drop microextraction for the determination of several endocrine-disrupting phenols from seawaters. *Talanta* **80**, 1611-1618.
- 14- Benmansour, B.; Stephan, L.; Cabon, J.-Y.; Deschamps, L.; Giamarchi, P. (2011). Spectroscopic properties and laser induced fluorescence determination of some EDC. *J. Fluoresc.* **21**, 843-850.

- 15- Zhou, Q.; Gao, Y.; Xie, G. (2011). Determination of bisphenol A, 4-n-nonylphenol, and 4-tert-octylphenol by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography-fluorescence detector. *Talanta* **85**, 1598-1602.
- 16- LaFleur, A.D.; Schug, K. (2011). A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. *Anal. Chim. Acta* **696**, 6-26.
- 17- Ramírez-Sánchez, I.M.; Martínez-Austria, P.; Quiroz-Alfaro, M.A.; Bandala, E.R. (2015). Efectos de los estrógenos como contaminantes emergentes en la salud y el ambiente. *Tecnol. Cienc. Agua*, **6**, 31-42.
- 18- Pérez, R.L.; Escandar, G.M. (2016). Multivariate calibration-assisted high-performance liquid chromatography with dual UV and fluorimetric detection for the analysis of natural and synthetic sex hormones in environmental waters and sediments. *Environ. Pollut.* **209**, 114-122.
- 19- Zhang, L.; Cheng Er, J.; Xu, W.; Qin, X.; Samanta, A.; Jana, S.; Ken Lee, C.; Chang, Y. (2014). "Orange alert": A fluorescent detector for bisphenol A in water environments. *Anal. Chim. Acta* **815**, 51-56.
- 20- Villar-Navarro, M.; Ramos-Payán, M.; Fernández-Torres, R.; Callejón-Mochón, M.; Bello-López, M.Á. (2013). A novel application of three phase hollow fiber based liquid phase microextraction (HF-LPME) for the HPLC determination of two endocrine disrupting compounds (EDCs), n-octylphenol and n-nonylphenol, in environmental waters. *Sci. Total Environ.* **443**, 1-6.
- 21- Heudorf, U.; Mersch-Sundermann, V.; Angerer, J. (2007). Phthalates: toxicology and exposure. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **210**, 623-634.
- 22- Vandenberg, L.N.; Chahoud, I.; Heindel, J.J.; Padmanabhan, V.; Paumgartten, F.J.R.; Schoenfelder, G. (2010). Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A. *Environ. Health Perspect.* **118**, 1055-1070.
- 23- Raecker, T.; Thiele, B.; Boehme, R.M.; Guenther, K. (2011). Endocrine disrupting nonyl- and octylphenol in infant food in Germany: considerable daily intake of nonylphenol for babies. *Chemosphere* **82**, 1533-1540.
- 24- Guart, A.; Bono-Blay, F.; Borrell, A.; Lacorte, S. (2011). Migration of plasticizers phthalates, bisphenol A and alkylphenols from plastic containers and evaluation of risk. *Food Addit. Contam.* **28**, 676-685.
- 25- Caliman, F.A.; Gavrilesco M. (2009). Pharmaceuticals, personal care products and endocrine disrupting agents in the environment - A review. *Clean-Soil, Air, Water* **37**, 277-303.
- 26- Food and Agriculture Organization, International code of conduct on the distribution and use of pesticides, Organización de Naciones Unidas (2002) Roma, Italia (FAO 2002).
- 27- Public Health Impact of Pesticides use in Agriculture. Geneva 1990. World Health Organization.
- 28- WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009. World Health Organization 2010.

29- Wilson, W.B.; Alfarhani, B.; Moore, A.F.T.; Bisson, C.; Wise, S.A.; Campiglia, A.D. (2016). Determination of high-molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons in high performance liquid chromatography fractions of coal tar standard reference material 1597a via solid-phase nanoextraction and laser-excited time-resolved Shpol'skii spectroscopy. *Talanta* **148**, 444-453.

30- Wenzl, T.; Simon, R.; Kleiner, J.; Anklam, E. (2006). Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. *TrAC Trends Anal. Chem.* **25**, 716-725.

31- IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>> (consultada noviembre 2017).

32- Zhang, Y.; Dong, S.; Wang, H.; Tao, S.; Kiyama, R. (2016). Biological impact of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons (ePAHs) as endocrine disruptors. *Environ. Pollut.* **213**, 809-824.

33- <<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/priority-pollutant-list-epa.pdf>> (consultada noviembre 2017).

34- <<https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-11/documents/pah-rpfs.pdf>> (consultada noviembre 2017).

35- Bortolato, S.A.; Arancibia, J.A.; Escandar, G.M. (2008). Chemometrics-assisted excitation-emission fluorescence spectroscopy on nylon membranes. Simultaneous determination of benzo[a]pyrene and dibenz[a,h]anthracene at parts-per-trillion levels in the presence of the remaining EPA PAH priority pollutants as interferences, *Anal. Chem.* **80**, 8276-8286.

36- Harris, D.C. (2001). Análisis químico cuantitativo, segunda edición, Reverté, Barcelona, España.

37- Szejtli, J. (1998). Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev.* **98**, 1743-1754.

38- Li, S.; Purdy, W.C. (1992). Cyclodextrins and their applications in analytical chemistry. *Chem. Rev.* **92**, 1457-1470.

39- Escandar, G.M.; Olivieri, A.C. (2001). Luminescence Techniques in Pharmaceutical Analysis. Recent Advances in Experimental Methods and Chemometric Applications. En *New Advances in Analytical Techniques*, Taylor & Francis, Londres, Inglaterra.

40- Sanramé, C.N.; de Rossi, R.H.; Argüello, G.A. (1996). Effect of β -Cyclodextrin on the excited state properties of 3-substituted indole derivatives. *J. Phys. Chem.* **100**, 8151-8156.

41- Sadlej-Sosnowska, N. (1997). Fluorometric determination of association constants of three estrogens with cyclodextrins. *J. Fluoresc.* **7**, 195-200.

42- Tablet, C.; Matei, I.; Hillebrand, M. (2012). The Determination of the Stoichiometry of Cyclodextrin Inclusion Complexes by Spectral Methods: Possibilities and Limitations. En *Stoichiometry and Research- The importance of Quantity in Biomedicine*, InTech, Rijeka, Croacia.

43- Carabajal, M.D.; Arancibia, J.A.; Escandar, G.M. (2017). Excitation-emission fluorescence-kinetic data obtained by Fenton degradation. Determination of heavy-

polycyclic aromatic hydrocarbons by four-way parallel factor analysis. *Talanta* **165**, 52-63.

44- Pérez, R.L.; Escandar, G.M. (2013). Spectrofluorimetric study of estrogen-cyclodextrin inclusion complexes in aqueous systems. *Analyst* **138**, 1239-1248.

45- Del Olmo, M.; Zafra, A.; Gonzalez-Casado, A.; Vilchez, J.L. (1998). The use of β -CD inclusion complexes for the analysis of BPA residues in water by spectrofluorimetry. *Int. J. Environ. Sci.* **69**, 99-110.

46- Kitano, H.; Endo, H.; Gemmei-Ide, M.; Kyogoku, M. (2003). Inclusion of Bisphenols by Cyclodextrin Derivatives. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **47**, 83-90.

47- Yano, K.; Hirosawa, N.; Sakamoto, Y.; Katayama, H.; Moriguchi, T. (2002) Phthalate Levels in Beverages in Japan and Korea. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **68**, 463-469.

48- Guo, Z.; Wei, D.; Wang, M.; Wang, S. (2010) Determination of Six Phthalic Acid Esters in Orange Juice Packaged by PVC Bottle Using SPE and HPLC-UV: Application to the Migration Study. *J. Chromatogr. Sci.* **48**, 760-765.

49- Martini, E.; Tomassetti, M.; Campanella, L. (2015). Determination of traces of several pesticides in sunflower oil using organic phase immunoelectrodes (OPIEs). *Talanta* **132**, 503-512.

50- Pacioni, N.; Sueldo Ocello, V.N.; Lazzarotto, A.; Veglia, A. (2008). Spectrofluorimetric determination of benzoimidazolic pesticides: Effect of p-sulfonatocalix[6]arene and cyclodextrins. *Anal. Chim. Acta* **624**, 133-140.

51- Hongkun, L.; Jiajia, G.; Pinga, H.; Lurui, L.; Minwei, Z.; Fengrui, G.; Chunyan, S.; Qian, Z. (2011). Visual detection of organophosphorus pesticides represented by mathamidophos using Au nanoparticles as colorimetric probe. *Talanta* **87**, 93-99.

52- Ragavan, K.V.; Rastogi, N.K.; Thakur, M.S. (2013). Sensors and biosensors for analysis of bisphenol-A. *TrAc Trends Anal. Chem.* **52**, 248-260.

53- Andreu, V.; Ferrer, E.; Rubio, J.L.; Font, G.; Picó, Y. (2007). Quantitative determination of octylphenol, nonylphenol, alkylphenol ethoxylates and alcohol ethoxylates by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry in soils treated with sewage sludges. *Sci. Total Environ.* **378**, 124-129.

54- Li, J.; Cai, Y.; Shi, Y.; Mou, S.; Jiang, G. (2008). Analysis of phthalates via HPLC-UV in environmental water samples after concentration by solid-phase extraction using ionic liquid mixed hemimicelles. *Talanta* **74**, 498-504.

55- Mercer, G.E.; Hurlbut, J.A. (2004). A multiresidue pesticide monitoring procedure using gas chromatography/mass spectrometry and selected ion monitoring for the determination of pesticides containing nitrogen, sulfur, and/or oxygen in fruits and vegetables. *Journal of AOAC* **87**, 1224-1236.

56- Li, D.; Park, J. (2001). Silyl Derivatization of Alkylphenols, Chlorophenols, and Bisphenol A for Simultaneous GC/MS Determination. *Anal. Chem.* **73**, 3544-3550.

57- Ballesteros, O.; Zafra, A.; Navalón, A.; Vilchez, J.L. (2006). Sensitive gas chromatographic-mass spectrometric method for the determination of phthalate esters, alkylphenols, bisphenol A and their chlorinated derivatives in wastewater samples. *J. Chromatogr. A* **1121**, 154-162.

- 58- Albero, B.; Sanchez-Brunete, C.; Tadeo, J.L. (2003). Determination of organophosphorous pesticides in fruit juices by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 6915- 6921
- 59- Paloluoglu, C.; Bayraktar, H.; Aktan, M.; Turalioglu, F.S.; Gaga, E.E. (2016). Atmospheric concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in an urban traffic site in Erzurum, Turkey. *Stoch. Environ. Res. Risk Assess.*, **30**, 1223-1234.
- 60- Lung, S.C.C.; Liu, C.H. (2015). Fast analysis of 29 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and nitro-PAHs with ultra-high performance liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization-tandem mass spectrometry. *Sci. Rep.* **5**, 12992.
- 61- Brereton, R.G. (2003). *Chemometrics. Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, John Wiley y Sons, Chichester, Inglaterra.
- 62- Escandar, G.M.; Faber, N.M.; Goicoechea, H.C.; Muñoz de la Peña, A.; Olivieri, A.C.; Poppi, R.J. (2007). Second and third-order multivariate calibration: Data, algorithms and applications. *TrAC Trends Anal. Chem.* **26**, 752-765.
- 63- Bro, R. (1998). *Multi-way analysis in the food industry*. Tesis doctoral, Universidad de Amsterdam, Países Bajos.
- 64- Olivieri, A.C.; Escandar, G.M. (2014). *Practical three-way calibration*, Elsevier, Waltham, EE.UU.
- 65- Tomasi, G.; Savorani, F.; Engelsen, S.B. (2011). Icoshift: An effective tool for the alignment of chromatographic data. *J. Chromatogr. A* **1218**, 7832-7840.
- 66- Culzoni, M.J.; Schenone, A. V.; Llamas, N.E.; Garrido, M.; Di Nezio, M.S.; Fernández Band, B.S.; Goicoechea, H.C. (2009). Fast chromatographic method for the determination of dyes in beverages by using high performance liquid chromatography-Diode array detection data and second order algorithms. *J. Chromatogr. A* **1216**, 7063-7070.
- 67- Tauler, R.; Maeder, M.; de Juan A. (2009). *Multiset data analysis: extended multivariate curve resolution*, en: *Comprehensive Chemometrics*, S. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), Elsevier, Oxford, Inglaterra.
- 68- Bro, R. (1997). PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **38**, 149-171.
- 69- Paatero, P. (1997). A weighted non-negative least squares algorithm for three-way 'PARAFAC' factor analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **38**, 223-242.
- 70- Sanchez, E.; Kowalski, B.R. (1986). Generalized rank annihilation factor analysis. *Anal. Chem.* **58**, 496-499.
- 71- <<http://www.models.kvl.dk/source/>> (consultada noviembre 2017).
- 72- Bro, R.; Kiers, H.A.L. (2003). A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models. *J. Chemom.* **17**, 274-286.
- 73- Wold, S.; Geladi, P.; Esbensen, K.; Øhman, J. (1987). Multiway principal components and PLS analysis. *J. Chemometrics* **1**, 41-56.

- 74- Haaland, D.M.; Thomas, E.V. (1988). Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. *Anal. Chem.* **60**, 1193-1202.
- 75- Øhman, J.; Geladi, P.; Wold, S. (1990). Residual bilinearization. Part 1: theory and algorithms. *J. Chemom.* **4**, 79-90.
- 76- Olivieri, A.C. (2005). On a versatile second-order multivariate calibration method based on partial least-squares and residual bilinearization: Second-order advantage and precision properties. *J. Chemom.* **19**, 253-265.
- 77- Bortolato, S.A.; Arancibia, J.A.; Escandar, G.M.; Olivieri, A.C. (2007). Improvement of residual bilinearization by particle swarm optimization for achieving the second-order advantage with unfolded partial least-squares. *J. Chemom.* **21**, 557-566.
- 78- Bro, R. (1996). Multi-way calibration. Multi-linear PLS, *J. Chemom.* **10**, 47-61.
- 79- de Juan, A.; Casassas, E.; Tauler, R. (2000). Soft Modeling of Analytical Data, en: Encyclopedia of Analytical Chemistry, Wiley, Nueva York, EE.UU.
- 80- Windig, W.; Guilment, J. (1991). Interactive Self-Modeling Mixture Analysis. *Anal. Chem.* **63**, 1425-1432.
- 81- Windig, W.; Stephenson, D.A. (1992). Self-Modeling Mixture Analysis of 2Nd-Derivative Near-Infrared Spectral Data Using the SIMPLISMA Approach. *Anal. Chem.* **64**, 2735-2742.
- 82- Sequaris, J.-M.L.; Koglin, E. (1987). Evolving Factor Analysis for the Resolution of Overlapping Chromatographic Peaks. *Anal. Chem.* **59**, 527-530.
- 83- Borràs, E.; Ferré, J.; Boqué, R.; Mestres, M.; Aceña, L.; Busto, O. (2015). Data fusion methodologies for food and beverage authentication and quality assessment-A review. *Anal. Chim. Acta* **891**, 1-14.
- 84- Rodriguez-Mendez, M.L.; Apetrei, C.; Gay, M.; Medina-Plaza, C.; de Saja, J.A.; Vidal, S.; Cheynier, V. (2014). Evaluation of oxygen exposure levels and polyphenolic content of red wines using an electronic panel formed by an electronic nose and an electronic tongue. *Food Chem.* **155**, 91-97.
- 85- Casale, M.; Oliveri, P.; Casolino, C.; Sinelli, N.; Zunin, P.; Armanino, C.; Lanteri, S. (2012). Characterisation of PDO olive oil Chianti Classico by non-selective (UV-visible, NIR and MIR spectroscopy) and selective (fatty acid composition) analytical techniques. *Anal. Chim. Acta* **712**, 56-63.
- 86- Ruiz-Altisent, M.; Lleó, L.; Riquelme, F. (2006). Instrumental quality assessment of peaches: Fusion of optical and mechanical parameters. *J. Food Eng.* **74**, 490-499.
- 87- Downey, G.; Briandet, R.; Wilson, R.H.; Kemsley, E.K. (1997). Near- and Mid-Infrared Spectroscopies in Food Authentication: Coffee Varietal Identification. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4357-4361.
- 88- Cozzolino, D.; Smyth, H.E.; Lattey, K.A.; Cynkar, W.U.; Janik, L.; Damberg, R.G. (2006). Combining mass spectrometry based electronic nose, visible-near infrared spectroscopy and chemometrics to assess the sensory properties of Australian Riesling wines. *Anal. Chim. Acta.* **563**, 319-324.

- 89- Peré-Trepat, E.; Tauler, R. (2006). Analysis of environmental samples by application of multivariate curve resolution on fused high-performance liquid chromatography-diode array detection mass spectrometry data. *J. Chromatogr. A* **1131**, 85-96.
- 90- De Luca, M.; Ragno, G.; Ioele, G.; Tauler, R. (2014). Multivariate curve resolution of incomplete fused multiset data from chromatographic and spectrophotometric analyses for drug photostability studies. *Anal. Chim. Acta* **837**, 31-37.
- 91- Mas, S.; Tauler, R.; de Juan, A. (2011). Chromatographic and spectroscopic data fusion analysis for interpretation of photodegradation processes. *J. Chromatogr. A* **1218**, 9260-9268.
- 92- Danzer, K.; Currie, L.A. (1998). Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration *Pure Appl. Chem.* **70**, 993-1014.
- 93- Olivieri, A.C.; Faber, K. (2012). New developments for the sensitivity estimation in four-way calibration with the quadrilinear parallel factor model. *Anal. Chem.* **84**, 186-193.
- 94- Olivieri, A.C. (2014). Analytical figures of merit: From univariate to multiway calibration. *Chemical Reviews*, **114**, 5358-5378.
- 95- Clayton, C.A.; Hines, J.W.; Elkins, P.D. (1987). Detection limits with specified assurance probabilities, *Anal. Chem.* **59**, 2506-2514.
- 96- González, A.G.; Herrador, M.A.; Asuero, A.G. (1999). Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays. *Talanta* **48**, 729-736.
- 97- <<http://www.iquir-conicet.gov.ar/descargas/mvc2.rar>> (consultada en noviembre 2017).
- 98- Ibañez, G.A.; Escandar, G.M.; Olivieri, A.C. (2007). Formation constants of copper (II)-salicylic acid complexes from multi-wavelength spectrophotometric pH titration data analyzed by alternating least-squares including Newton-Raphson and Gauss-Newton procedures. *Chem. Educ* **12**, 22-28.
- 99- <<http://www.models.life.ku.dk/go?filename=WarpingTB.zip>> (consultada en noviembre 2017).
- 100-Hagestuen, E.D.; Arruda, A.F.; Campiglia, A.D. (2000). On the improvement of solid-phase extraction room-temperature phosphorimetry for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Talanta* **52**, 727-737.
- 101-Eilers, P.H.C.; Currie, I.D.; Durbán, M. (2006). Fast and compact smoothing on large multidimensional grids. *Comput.Stat. Data Anal.* **50**, 61-76.
- 102-Tomasi, G.; Van Den Berg, F.; Andersson, C. (2004). Correlation optimized warping and dynamic time warping as preprocessing methods for chromatographic data. *J. Chemom.* **18**, 231-241.
- 103-Nielsen, N.P.V; Carstensen, J. M.; Smedsgaard, J. (1998). Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping. *J. Chromatogr. A* **805**, 17-35.

- 104-Neves, A.C. de O.; Tauler, R.; de Lima, K.M.G. (2016). Area correlation constraint for the MCR-ALS quantification of cholesterol using EEM fluorescence data: A new approach. *Anal. Chim. Acta* **937**, 21-28.
- 105-Szejtli, J. (2004). Past, present and future of cyclodextrin research. *Pure Appl. Chem.* **76**, 1825-1845.
- 106-Chelli, S.; Majdoub, M.; Jouini, M.; Aeiayach, S.; Maurel, F.; Chane-Ching, K.I.; Lacaze, P.-C. (2007). Host-guest complexes of phenol derivatives with β -cyclodextrin: an experimental and theoretical investigation. *J. Phys. Org. Chem* **20**, 30-43.
- 107-Arancibia, J.A.; Escandar, G.M. (1999). Complexation study of diclofenac with [small beta]-cyclodextrin and spectrofluorimetric determination. *Analyst*, **124**, 1833-1838.
- 108-Yang, Z.-X.; Chen, Y.; Liu, Y. (2008). Inclusion complexes of bisphenol A with cyclomaltoheptaose (beta-cyclodextrin): solubilization and structure. *Carbohydr. Res.* **343**, 2439-2442.
- 109-Bonenfant, D.; Niquette, P.; Mimeault, M.; Furtos-Matei, A.; Hausler, R. (2009). UV-VIS and FTIR spectroscopic analyses of inclusion complexes of nonylphenol and nonylphenol ethoxylate with beta-cyclodextrin. *Water Res.* **43**, 3575-3581.
- 110-Xue, J.; Li, D.; Qu, L.; Long, Y. (2013). Surface-imprinted core-shell Au nanoparticles for selective detection of bisphenol A based on surface-enhanced Raman scattering. *Anal. Chim. Acta* **777**, 57-62.
- 111- Lisboa, N.S.; Fahning, C.S.; Cotrim, G.; dos Anjos, J.P.B.; de Andrade, J.B.; Hatje, V.; da Rocha, G.O. (2013). A simple and sensitive UFLC-F method for EDC determination in marine waters. *Talanta* **117**, 168-175.
- 112- Guilbault, G.G. (1990). General Aspects of Luminescence Spectroscopy. En *Practical Fluorescence*, segunda edición. Taylor & Francis, Nueva York, EE.UU.
- 113- Olivieri, A.C.; Escandar G.M.; Muñoz de la Peña, A. (2011). Second-order and higher order multivariate calibration methods applied to non-multilinear data using different algorithms. *TrAC Trends Anal. Chem.* **30** 607-617.
- 114- Allegrini, F.; Olivieri, A.C., (2014). IUPAC-Consistent approach to the Limit of Detection in Partial Least-Squares Calibration. *Anal. Chem.* **86**, 7858-7866.
- 115- Biles, J.E.; McNeal, T.P.; Begley, T.H.; Hollifield, H.C. (1997). Determination of Bisphenol-A in Reusable Polycarbonate Food-Contact Plastics and Migration to Food-Simulating Liquids. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 3541-3544.
- 116- Nerín, C.; Fernández, C.; Domeño, C.; Salafranca, J. (2003). Determination of Potential Migrants in Polycarbonate Containers Used for Microwave Ovens by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet and Fluorescence Detection. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 5647-5653.
- 117- Wong, K.O.; Leo, L.W.; Seah, H. L. (2005). Dietary exposure assessment of infants to bisphenol A from the use of polycarbonate baby milk bottles. *Food Addit. Contam.* **22**, 280-288.
- 118- Haishima, Y.; Hayashi, Y.; Yagami, T.; Nakamura, A. (2001). Elution of bisphenol-A from hemodialyzers consisting of polycarbonate and polysulfone resins. *J. Biomed. Mater. Res.* **58**, 209-215.

- 119-Zhang, Y.; Cheng, Y.; Zhou, Y.; Li, B.; Gu, W.; Shi, X.; Xian, Y. (2013). Electrochemical sensor for bisphenol A based on magnetic nanoparticles decorated reduced graphene oxide. *Talanta* **107**, 211-218.
- 120- Borraccetti, M.D.; Damiani, P.C.; Olivieri, A.C. (2009). When unfolding is better: unique success of unfolded partial least-squares regression with residual bilinearization for the processing of spectral-pH data with strong spectral overlapping. Analysis of fluoroquinolones in human urine based on flow-injection pH-modulated synchronous fluorescence data matrices. *Analyst* **134**, 1682-1691.
- 121-Pagani, A.P.; Ibañez, G.A. (2014). Second-order multivariate models for the processing of standard-addition synchronous fluorescence-pH data. Application to the analysis of salicylic acid and its major metabolite in human urine. *Talanta* **122**, 1-7.
- 122-Ballesteros-Gómez, A.; Rubio, S.; Pérez-Bendito, D. (2009). Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. *J. Chromatogr. A* **1216**, 449-469.
- 123-Sun, Y.; Wada, M.; Kuroda, N.; Hirayama, K.; Nakazawa, H.; Nakashima, K. (2001). Simultaneous Determination of Phenolic Xenoestrogens by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Anal. Sci.* **17**, 697-702.
- 124-<<http://www.mindfully.org/Plastic/PVC-Wrap-Detecting-Nonylphenol.htm>> (consultada en noviembre 2017).
- 125-Inoue, K.; Kondo, S.; Yoshie, Y.; Kato, K.; Yoshimura, Y.; Horie, M.; Nakazawa, H. (2001). Migration of 4-nonylphenol from polyvinyl chloride food packaging films into food simulants and foods. *Food Addit. Contam.* **18**, 157-164.
- 126-Li, J.; Cai, Y.; Shi, Y.; Mou, S.; Jiang, G. (2008). Analysis of phthalates via HPLC-UV in environmental water samples after concentration by solid-phase extraction using ionic liquid mixed hemimicelles. *Talanta* **74**, 498-504.
- 127-Ranjbari, E.; Reza, M. (2012). Magnetic stirring-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of phthalate esters in drinking and environmental water samples. *Talanta* **100**, 447-453.
- 128-Thompson, J.W.; Kaiser, T.J.; Jorgenson, J.W. (2006). Viscosity measurements of methanol-water and acetonitrile-water mixtures at pressures up to 3500 bar using a novel capillary time-of-flight viscometer. *J. Chromatogr. A* **1134**, 201-209.
- 129-Commission Regulation (EU) No.10/2011 of 14 January 2011 on Plastic Materials and Articles Intended to Come into Contact with Food. <<http://www.eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/HTML/?uri=CELEX:32011R0010&from=ES>> (consultada en noviembre 2017).
- 130-Ademollo, N.; Ferrara, F.; Delise, M.; Fabietti, F.; Funari, E. (2008). Nonylphenol and octylphenol in human breast milk. *Environ. Int.* **34**, 984-987.
- 131-Danish E.P.A. Toxicological Evaluation and Limit Values for Nonylphenol, Nonylphenol ethoxylates, Tricresyl, phosphates and Benzoic acid. <<http://www.statensnet.dk/pligtarkiv/fremvis.pl?vaerkid%46944&reprid%40&filid%422#non8.1>> (consultada en noviembre 2017).

- 132-Luo, Y.-B.; Yu, Q.-W.; Yuan, B.-F.; Feng, Y.-Q. (2012). Fast microextraction of phthalate acid esters from beverage, environmental water and perfume samples by magnetic multi-walled carbon nanotubes. *Talanta* **90**, 123-131.
- 133-Shao, B.; Han, H.; Hu, J.; Zhao, J.; Wu, G.; Xue, Y.; Ma, Y.; Zhang, S. (2005). Determination of alkylphenol and bisphenol A in beverages using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **530**, 245-252.
- 134-Brenn-Struckhofova, Z.; Cichna-Markl, M. (2011). Determination of bisphenol A in wine by sol-gel immunoaffinity chromatography, HPLC and fluorescence detection. *Food Addit. Contam.* **23**, 1227-1235.
- 135- Fan, Y.; Liu, S.; Xie, Q. (2014). Rapid determination of phthalate esters in alcoholic beverages by conventional ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography. *Talanta* **119**, 291-298.
- 136-Del Carlo, M.; Pepe, A.; Sacchetti, G.; Compagnone, D.; Mastrocola, D.; Cichelli, A. (2008). Determination of phthalate esters in wine using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.* **111**, 771-777.
- 137-Casajuana, N.; Lacorte, S. (2003). Presence and release of phthalic esters and other endocrine disrupting compounds in drinking water. *Chromatographia* **57**, 649-655.
- 138-Kozyrod, R.P.; Ziariaris, J. (1989). A survey of plasticizer migration into foods. *J. Food Prot.* **52**, 578-580.