



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Politécnica Superior de Gandia

Modificación de la pared interna de un tubo de propileno
para su empleo en la extracción de Bisfenol A

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencias Ambientales

AUTOR/A: Arcas de las Muelas, Laura

Tutor/a: Torres Cartas, Sagrario

Cotutor/a: Meseguer Lloret, Susana

CURSO ACADÉMICO: 2023/2024

RESUMEN

El bisfenol A es un disruptor endocrino ampliamente utilizado en la industria, teniendo una producción anual que supera los 3,8 millones de toneladas y una liberación anual a la atmósfera de 100 toneladas. La exposición a este compuesto puede suponer un riesgo para la salud humana, pudiendo alterar el correcto funcionamiento del sistema endocrino, así como, aumentar el riesgo de desarrollar enfermedades neurológicas y neurovasculares. Sin embargo, se sigue usando hoy en día, debido a las excelentes propiedades físicas, químicas y mecánicas que le proporciona a los plásticos. Este compuesto se encuentra en gran cantidad de matrices, siendo las masas de agua de las más significativas, debido a su gran prevalencia en estas. Actualmente, la Directiva Europea establece leyes para controlar la concentración de este compuesto en las aguas destinadas al consumo humano, para garantizar un agua saludable y limpia. Por ello, es de gran importancia el control y estudio periódico de muestras de agua para controlar este compuesto y asegurar la calidad del agua y salud de las personas, así como colaborar con el avance tecnológico y científico.

En este TFG se han desarrollado unos tubos extractantes modificados con aptámero como sistema de extracción selectivo para la preconcentración y limpieza de muestras acuosas que contengan BPA. Para ello, se han modificado químicamente la pared interna de unos tubos Falcon, tubos de polipropileno de fondo cónico en 2 etapas. En la primera etapa, se ha realizado la vinilización de la pared interna de los tubos mediante la reacción en dos pasos con BZF y EGDMA. En esta etapa, que se realiza en 2 pasos, ha resultado esencial la ausencia total de oxígeno y el mantenimiento de una atmósfera de N₂ en todo el proceso. Posteriormente, en la segunda etapa, se ha enlazado a la pared del tubo vinilizada un aptámero específico para el BPA mediante una reacción click.

Empleando los tubos extractantes modificados con el aptámero del BPA, se han optimizado las distintas etapas del proceso de extracción. Cuando se realiza la extracción de BPA en condiciones óptimas se ha conseguido un factor de concentración del BPA de 20 veces. El procedimiento completo de análisis de BPA desarrollado (Extracción-HPLC-FL) tiene una repetitividad y reproducibilidad inferiores al 10%, su LOD es de 0,10 µg/L y su LOQ es de 0,34 µg/L, límites que aseguran la determinación cuantitativa del BPA a niveles inferiores a los establecidos por la legislación para aguas de consumo (2,5 µg/L). Además, se ha comprobado que los tubos extractantes pueden reutilizarse hasta 30 veces sin que se pierda eficacia en el proceso de extracción. Finalmente, la aplicación del proceso a muestras de agua del grifo y embotellada aditivadas con BPA demostró la exactitud del proceso, indicando que los componentes de la matriz de estas muestras no interfieren en el proceso de extracción de BPA.

Palabras clave

BPA, muestras de agua, tubos de polipropileno, vinilización, aptámeros, extracción en tubos, HPLC-FL.

ABSTRACT

Bisphenol A is an endocrine disruptor widely used in industry, having an annual production that exceeds 3,8 million tons and an annual release into the atmosphere of 100 tons. Exposure to this compound can pose a risk to human health, potentially altering the proper functioning of the endocrine system, as well as increasing the risk of developing neurological and neurovascular diseases. However, it is still used today, due to the excellent physical, chemical and mechanical properties it provides to plastics. This compound is found in a large number of matrices, with water masses being the most significant, due to its great prevalence in them. Currently, the European Directive establishes laws to control the concentration of this compound in water intended for human consumption, to guarantee healthy and clean water. Therefore, the periodic control and study of water samples is of great importance to control this compound and ensure the quality of the water and people's health, as well as to collaborate with technological and scientific advances.

In this TFG, extractant tubes modified with aptamer have been developed as a selective extraction system for the preconcentration and cleaning of aqueous samples containing BPA. To do this, the internal wall of some Falcon tubes, polypropylene tubes with a conical bottom, have been chemically modified in 2 stages. In the first stage, the vinylization of the inner wall of the tubes has been carried out through a two-step reaction with BZF and EGDMA. In this stage, which is carried out in 2 steps, the total absence of oxygen and the maintenance of an N₂ atmosphere throughout the process has been essential. Subsequently, in the second stage, a specific aptamer for BPA has been linked to the vinylized tube wall through a click reaction.

Using extractant tubes modified with the BPA aptamer, the different stages of the extraction process have been optimized. When BPA extraction is carried out under optimal conditions, a BPA concentration factor of 20 times has been achieved. The complete BPA analysis procedure developed (Extraction-HPLC-FL) has a repeatability and reproducibility of less than 10%, its LOD is 0,10 µg/L and its LOQ is 0,34 µg/L, limits that ensure the quantitative determination of BPA at levels lower than those established by legislation for drinking water (2,5 µg/L). In addition, it has been proven that the extractant tubes can be reused up to 30 times without losing effectiveness in the extraction process. Finally, the application of the process to tap and bottled water samples added with BPA demonstrated the accuracy of the process, indicating that the matrix components of these samples do not interfere with the BPA extraction process.

Keywords

BPA, water samples, polypropylene tubes, vinylization, aptamers, tube extraction, HPLC-FL.

ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. El bisfenol A.....	1
1.1.1. Usos del BPA.....	1
1.1.2. Efectos del BPA.....	1
1.1.3. Problemática ambiental.....	2
1.1.4. Legislación BPA.....	3
1.2. Análisis del BPA.....	3
1.2.1. Métodos de extracción: extracción en fase sólida.....	4
1.2.2. Técnica de análisis: cromatografía líquida de alta resolución.....	5
1.2.2.1. Funcionamiento del sistema HPLC.....	6
1.2.3. Tendencia actual de la extracción y análisis del BPA.....	7
1.3. Extracción del BPA mediante aptámeros.....	11
2. Objetivos.....	12
3. Materiales, reactivos, aparatos e instrumentos.....	13
3.1. Materiales y reactivos.....	13
3.2. Aparatos e instrumentos de laboratorio.....	14
4. Métodos.....	14
4.1. Preparación de una disolución de aptámero de BPA tiolado plegado.....	14
4.2. Preparación del de tubos Falcon modificados con el aptámero de BPA.....	16
4.2.1. Modificación de la pared interna de los tubos Falcon.....	16
4.3. Enlazado del aptámero tiolado del BPA a los tubos Falcon vinilizados.....	18
4.4. Extracción del BPA de una disolución empleando los tubos Falcon modificados con aptámeros.....	20
4.5. Procedimiento de análisis de BPA mediante HPLC-FL.....	22
5. Resultados y discusiones.....	22
5.1. Características del proceso de análisis HPLC-FL.....	22
5.1.1. Recta de calibrado.....	22
5.1.2. Figuras de mérito: LOD y LOQ.....	23
5.2. Obtención de los tubos extractantes modificados con el aptámero de BPA.....	24
5.2.1. Etapa de vinilización.....	24
5.2.2. Etapa de enlazado del aptámero de BPA.....	25
5.3. Estudio preliminar de extracción.....	27
5.4. Optimización de las etapas de extracción.....	28
5.4.1. Optimización de la etapa de elución.....	28
5.4.2. Optimización de la etapa de adsorción.....	30
5.5. Características del tubo extractante con aptámero: reusabilidad.....	32
5.6. Características del proceso completo de extracción en tubo-HPLC-FL.....	33
5.6.1. Implicaciones del factor de concentración del proceso de extracción en el análisis.....	33
5.6.2. Figuras de mérito con el proceso completo de extracción en tubo HPLC-FL.....	33
5.7. Aplicación: Análisis de muestras de agua.....	34

6. Conclusiones.....	36
7. Contribución del TFG a los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS).....	37
8. Bibliografía.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química BPA.....	1
Figura 2. Etapas de extracción en fase sólida.....	5
Figura 3. Componentes de un sistema HPLC.....	6
Figura 4. Ejemplo de un cromatograma correspondiente a una mezcla de BPA, BPAF y BPC de 0,05 ppm.....	7
Figura 5. A) Estructura inicial del aptámero, B) estructura del aptámero tras el plegamiento y C) puntos específicos de interacción del BPA con el aptámero.....	12
Figura 6. Calentamiento del aptámero a 95°C en el termoreactor.....	15
Figura 7. Estructuras químicas de la BZF y el EGDMA.....	16
Figura 8. Esquema del proceso de vinilización de los tubos Falcon.....	17
Figura 9. Diferentes etapas del proceso de vinilización de los tubos. A: tubos en la cámara UV sobre plataforma; B: tubos con grumo una vez salidos de la cámara UV; C: tubos vacíos con la pared atacada (mate) tras el ataque.....	18
Figura 10. Unión del aptámero tiolado plegado a la pared interna del tubo modificada previamente con BZF y EGDMA a través de los dobles enlaces libres.....	18
Figura 11. Esquema de reacción “click” entre el aptámero y el grupo vinilo del tubo.....	19
Figura 12. Espectro de absorción de la mezcla de reacción del aptámero a tiempo cero.....	20
Figura 13. Fase de agitación de los tubos en el termobloque en los procesos de carga y elución.....	21
Figura 14. Recta de calibrado del proceso de análisis HPLC-FL.....	23
Figura 15. Esquema de trabajo para la adición de los reactivos de vinilización en atmósfera de N ₂	24
Figura 16. Espectros de absorción realizados a tiempo 0, y a 1h, 2h, 3h, 4h, 5h y 24h durante la reacción click.....	25
Figura 17. Estructura química de un fragmento de cadena de ARN.....	26
Figura 18. Porcentajes de recuperación de BPA para diferentes volúmenes de MeOH en la etapa de elución.....	29
Figura 19. Gráfica representativa de los %Rec de BPA frente al volumen inicial de disolución.....	30
Figura 20. Gráfica del número de usos de los tubos y su correspondiente porcentaje de recuperación.....	32
Figura 21. Cromatogramas de un blanco de metanol, un patrón de 0,03 mg/L de BPA en metanol, y de dos muestras de agua sometidas al proceso de extracción en tubo modificado con aptámero: agua del grifo y mineral.....	35
Figura 22. Cromatogramas de un blanco de agua mineral, un patrón de 0,15 mg/L de BPA en metanol y de la muestra de agua mineral aditivada cuya concentración tras la extracción con los tubos debería ser 0,15 mg/L.....	36

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Métodos de determinación del BPA desarrollados en los últimos 5 años.....	9
Tabla 2. Porcentajes de recuperación para disoluciones acuosas con diferentes concentraciones de BPA.....	28
Tabla 3. Porcentajes de recuperación de BPA para diferentes tiempos de elución.....	30
Tabla 4. Porcentajes de recuperación de BPA para diferentes tiempos de adsorción.....	31
Tabla 5. Repetitividad y reproducibilidad del proceso global de análisis a varios niveles de concentración.....	34

1. Introducción

1.1. El bisfenol A

El bisfenol A (BPA) es un disruptor endocrino ampliamente utilizado en la industria (Ding, C., y col., 2024). Es un xenoestrógeno, uno de los compuestos sintéticos más producidos en el mundo, con una producción anual que supera los 3,8 millones de toneladas y una liberación anual a la atmósfera de 100 toneladas. El BPA es una molécula orgánica a base de carbono con fórmula química $C_{15}H_{16}O_2$, formada por dos grupos fenol funcionales, cuya estructura se muestra en la figura 1 (Costa, H. E., & Cairrao, E., 2024).

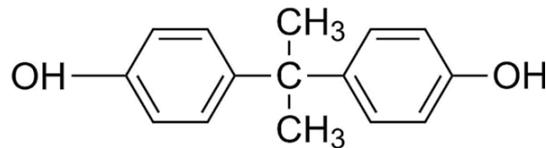


Figura 1. Estructura química BPA (Costa, H. E., & Cairrao, E., 2024).

1.1.1. Usos del BPA

Históricamente, el BPA fue sintetizado en 1891, pero no fue hasta unos cuarenta años después que se descubrieron algunos de sus efectos estrogénicos. Sin embargo, se sigue usando hoy por las excelentes propiedades físicas, químicas y mecánicas que le proporciona a los plásticos, como su baja absorción de humedad, elasticidad y resistencia térmica. El BPA se utiliza principalmente como monómero en la producción de plásticos de policarbonato y resinas epoxi, y como aditivo para la eliminación del exceso de ácido clorhídrico durante la fabricación de cloruro de polivinilo (PVC). También es utilizado en la fabricación de selladores de fisuras dentales, tuberías de suministro de agua, contenedores de alimentos, botellas de agua, revestimientos de tapas de frascos, superficies de latas para aislar los alimentos del metal, evitando así su corrosión, equipos electrónicos, juguetes para niños, papel térmico y otros (Costa, H. E., & Cairrao, E., 2024).

Existen diversas vías de exposición humana a esta sustancia, como la vía oral, la inhalación y la transdérmica, siendo los productos alimenticios la principal fuente de exposición al BPA. Esta exposición puede producirse a través de la reutilización de biberones y utensilios de cocina, como pueden ser envases para la conservación y preparación de bebidas y alimentos, o a través de alimentos enlatados, aunque también puede estar presente en alimentos frescos como la carne, la leche o los huevos, cuando los animales se crían en zonas contaminadas o beben agua contaminada (Konieczna, A., y col., 2015).

1.1.2. Efectos del BPA

Como se ha mencionado, el BPA es un disruptor endocrino, por lo que la exposición a este compuesto puede alterar el correcto funcionamiento del sistema endocrino suponiendo un riesgo para la salud. La exposición al BPA aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades neurológicas, incluidas enfermedades neurovasculares, como accidente cerebrovascular y neurodegenerativas, como Alzheimer y Parkinson. Además, puede producir efectos adversos

en el desarrollo neurológico de los niños, contribuyendo al desarrollo de enfermedades neurológicas graves como trastorno por déficit de atención e hiperactividad, trastorno del espectro autista, depresión, problemas emocionales, ansiedad y problemas cognitivos (Costa, H. E., & Cairrao, E., 2024). Así mismo, puede causar varios trastornos humanos crónicos, como cáncer de mama, insuficiencia espermática masculina y obesidad (Ghahremani, M. H., y col., 2024). Algunos estudios han demostrado también la posible correlación entre la exposición al BPA y el desarrollo de enfermedades reproductivas, como el síndrome de ovario poliquístico y la endometriosis, así como la reducción de la fecundidad y un aumento de la infertilidad. Además, aumenta el riesgo de resultados adversos en el parto (Wang, X., y col., 2022).

Por ello, la investigación tiende hacia el desarrollo de varias alternativas al BPA, como el bisfenol S, el bisfenol F, el bisfenol AF, el bisfenol AP, el bisfenol P y el bisfenol Z. Estos compuestos son estructuralmente similares al BPA y también tienen propiedades de alteración endocrina como el BPA, pero son menos tóxicos. Sin embargo, el BPA aporta mejores propiedades, en la síntesis de materiales plásticos, como una mayor resistencia, alta transparencia, bajo costo y fácil fabricación, por lo que su uso y fabricación aumenta año tras año (Ghahremani, M. H., y col., 2024).

1.1.3. Problemática ambiental

Debido a la magnificación de la producción y uso del BPA, éste se encuentra en muchas matrices ambientales, incluido el aire, el agua, los sedimentos, el suelo, el polvo doméstico y los alimentos, permitiendo su absorción directa o indirecta por los organismos. Sus principales fuentes de emisión son las actividades industriales, agrícolas y domésticas. En la atmósfera, el BPA surge de las actividades industriales, al liberarse como un gas que escapa de las fábricas en las que se fabrica y utiliza, y de la incineración de productos con este compuesto. Sin embargo, el BPA es rápidamente oxidado por grupos hidroxilo, por lo que su vida en el aire es muy corta (Czarny-Krzywińska, K., y col., 2023). También puede dispersarse mediante partículas atmosféricas, como el polvo en interiores y exteriores de oficinas, industrias y hogares, permitiendo su absorción mediante la respiración y el contacto dérmico, especialmente por los trabajadores que trabajan directamente en industrias involucradas en la síntesis de BPA. Por otro lado, el agua se trata del medio donde el BPA tiene una mayor prevalencia, llegando a encontrarse en diferentes cuerpos de agua a nivel global, como efluentes de aguas residuales, aguas superficiales, ríos, aguas subterráneas e incluso aguas costeras de la Antártida, donde puede ser absorbido por plantas y animales. Esto puede dar lugar a su bioconcentración y biomagnificación, resultando en un problema ecológico y de salud para la población. En el suelo, en comparación con la prevalencia del BPA en el agua y el aire, es relativamente menos preocupante. Sin embargo, en los últimos años, la presencia de BPA en el suelo está suponiendo una mayor preocupación. Esto se debe a que el uso de aguas contaminadas con BPA, la deposición atmosférica de BPA y el enriquecimiento por lodos industriales contribuyen al aumento de su concentración en el suelo (Liu, Z. H., y col., 2024).

1.1.4. Legislación BPA

El BPA se autorizó mediante el Reglamento de la Unión Europea 10/2011 de la Comisión, de 14 de enero, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. Si bien esta directiva establecía la cantidad máxima permitida de BPA en alimentos que no tengan un riesgo para la salud en 0,01 mg/Kg (Reglamento 10/2011, 2011).

Posteriormente, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), ha evaluado la toxicidad y posibles efectos en la salud humana de este compuesto en estudios recopilados desde 2013. En la actualidad la Comisión Técnica de Expertos de la EFSA ha reducido la ingesta diaria tolerable (IDT) del bisfenol A, a 0,2 de nanogramos/kg peso corporal y por día (EFSA, 2023).

El Diario Oficial de la Unión Europea (DOUE) publicó la cantidad de BPA máxima permitida establecida por el Reglamento (UE) nº 10/2011, el cual ha prohibido el uso de BPA en biberones y otros materiales como alimentos infantiles entre otros productos ya que el BPA migra de los recubrimientos hacia los productos (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2021).

Según la Directiva (UE) 2020/2184 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2020, las aguas destinadas al consumo humano deben tener una concentración menor a 2,5 µg/L de bisfenol A, para garantizar que sea saludable y limpia (Directiva (UE) 2020/2184, 2020, anexo I, parte B).

Por otro lado, según el Real Decreto 3/2023, del 10 de enero, que establece los criterios técnico-sanitarios de la calidad del agua de consumo, su control y suministro, el BPA es un parámetro de calidad del agua a controlar.

Actualmente el uso del bisfenol A en los barnices y revestimientos destinados a entrar en contacto con los alimentos está regulado mediante el Reglamento (UE) 2018/213 de la Comisión, de 12 de febrero de 2018, por el que se modifica el Reglamento (UE) nº 10/2011 por lo que respecta al uso de dicha sustancia en materiales plásticos en contacto con los alimentos. Éste establece que el uso de BPA como monómero en la fabricación de materiales y objetos plásticos, autorizado por el Reglamento, tiene un límite de migración de 0,6 mg de BPA por kg de alimento. Además, establece que el principio de precaución prohíbe usar BPA en la fabricación de biberones de policarbonato para lactantes.

1.2. Análisis del BPA

El BPA se analiza en muestras complejas, en las que el bisfenol A se encuentra en concentraciones bajas y en presencia de otros compuestos orgánicos. Por ello, en los métodos de determinación de este compuesto siempre se incluye una etapa de extracción del BPA de la matriz de la muestra, que suele servir tanto para concentrar el analito como para limpiar la muestra que se analizará posteriormente mediante un método analítico, generalmente una técnica cromatográfica debido a su capacidad de separación de compuestos en el análisis de muestras complejas.

A continuación, se describen brevemente tanto las técnicas de extracción como la técnica de análisis cromatográfico y se muestran algunos ejemplos de su uso en la determinación de este compuesto.

1.2.1. Métodos de extracción: extracción en fase sólida

La extracción del BPA es la fase más importante en su determinación, ya que permite separar y pre-concentrar el BPA presente en las muestras de agua y, así, al aumentar su concentración, se puede analizar posteriormente con una técnica analítica convencional. Existen diferentes métodos de extracción, como son la extracción en fase sólida (SPE), la extracción sólido-líquido (SLE), la extracción líquido-líquido (LLE), la microextracción en fase sólida (SPME), entre otras. Sin embargo, una de las más utilizadas es la SPE.

La extracción en fase sólida es una técnica empleada en la extracción de analitos presentes en muestras líquidas y la purificación de los extractos obtenidos mediante las distintas técnicas de extracción y concentración (Ochoa Ortega, P., 2016). La SPE se puede utilizar como sistema de limpieza; cuando el analito se encuentra en una mezcla compleja, en la que los componentes de la matriz pueden interferir en el análisis, mediante la separación del analito del resto de compuestos que no nos interesan. Por otro lado, la SPE permite realizar una concentración del analito antes de su análisis (pre-concentración) cuando el analito se encuentra en la muestra en concentraciones demasiado bajas, permitiendo ser analizado mediante técnicas analíticas convencionales (Galán Marrero, B., 2023).

El procedimiento de SPE consta de las siguientes cuatro etapas, que también se muestran en la figura 2:

- Acondicionado: se hidrata el sorbente sólido y se deja en las condiciones adecuadas para procesar la muestra. Para ello, tras hidratar el sorbente con un disolvente orgánico como metanol o acetonitrilo, se hace percolar un volumen conocido de un disolvente de propiedades similares a la muestra, normalmente agua, a través del sorbente sólido, que puede estar empaquetado en un cartucho, columna o disco.
- Carga de la muestra: se hace pasar un determinado volumen de muestra a través del sorbente. En esta etapa, el analito queda retenido en el sorbente, y pueden quedar ligeramente retenidos también algunos otros componentes de la matriz de la muestra que presenten afinidad con el sorbente.
- Lavado: se hace pasar un disolvente (muchas veces agua) para favorecer la eliminación de los componentes retenidos que no sean el analito.
- Elución: se extrae el analito adsorbido en el sorbente haciendo pasar un pequeño volumen de disolvente en el que el analito es muy soluble, habitualmente un disolvente orgánico como metanol.

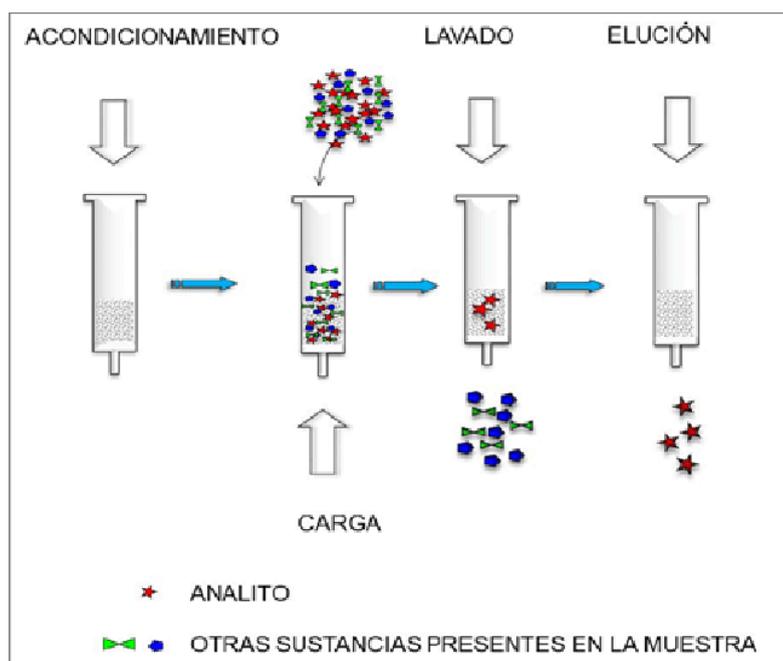


Figura 2. Etapas de extracción en fase sólida (Soledad Rodríguez, B., 2017).

1.2.2. Técnica de análisis: cromatografía líquida de alta resolución

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en inglés “High Performance Liquid Chromatography”, es una técnica de análisis utilizada para separar, identificar y cuantificar los componentes en una mezcla (Pavan M. V. Raja & Andrew R. Barron). Esta técnica de análisis puede emplearse entonces para separar y determinar el BPA contenido en una muestra de agua, ya que su principal propiedad inherente es precisamente determinar compuestos en mezclas acuosas (García de Marina Bayo, A., y col., 2016).

En un sistema de HPLC, se necesita de dos fases para permitir la separación de los compuestos de una mezcla: la *fase móvil*, formada por un líquido (disolvente o mezcla de disolventes), que circula por el sistema de manera constante durante el análisis; y la *fase estacionaria*, formada por un sólido empaquetado en el interior de una columna de acero. Las dos fases poseen una naturaleza (polaridad) opuesta, para evitar que la fase móvil disuelva el relleno de la columna. En el sistema, la fase móvil fluye de manera continuada a través de la fase estacionaria gracias a una bomba de alta presión. La mezcla se inyecta en el sistema y los distintos componentes de la misma se separan por las distintas afinidades entre cada compuesto y la fase móvil y estacionaria.

El sistema de HPLC está compuesto por las siguientes partes (figura 3):

- Recipientes que contienen los disolventes de la fase móvil: normalmente se emplea como fase móvil una mezcla de agua o tampón acuoso con un disolvente orgánico como metanol o acetonitrilo.
- Bomba de alta presión: para hacer circular la fase móvil por todo el sistema y atravesar la fase estacionaria.

- Sistema de inyección o inyector, que introduce un pequeño volumen de la muestra a analizar en el sistema cromatográfico. Los analitos (solutos) son solubles en la fase móvil, pudiendo arrastrarse del inyector a la columna cromatográfica, donde se separan.
- Columna cromatográfica: en su interior se encuentra la fase estacionaria, donde ocurren las interacciones de ambas fases con los distintos componentes de la muestra.
- Detector, que proporciona una señal a lo largo del tiempo de análisis. La señal puede ser absorbancia si se trata de un detector UV-vis o de fila de diodos, emisión de fluorescencia si el detector es un fluorímetro, intensidad de quimioluminiscencia si el detector es un luminómetro, etc.
- Sistema de recogida de datos (ordenador con software adecuado), que permite registrar y guardar un registro de la señal del detector a lo largo del tiempo de análisis, denominado cromatograma.

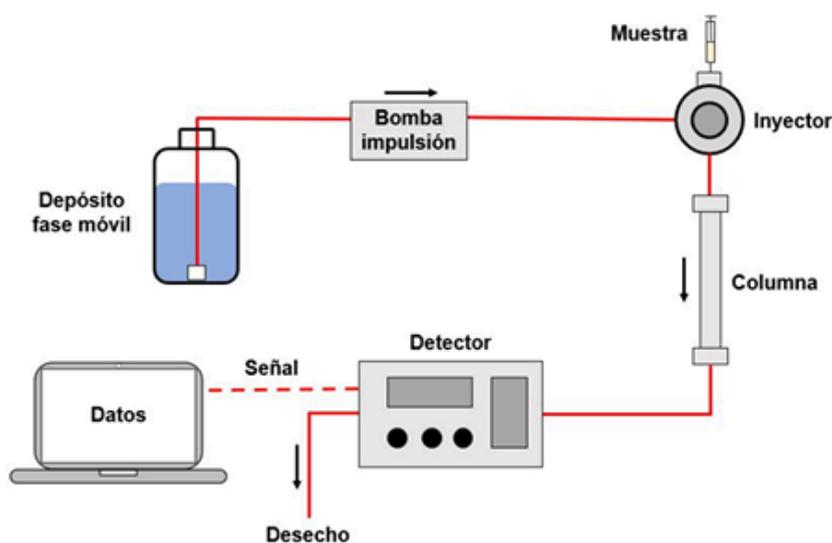


Figura 3. Componentes de un sistema HPLC. Fuente: Sánchez Akum, E. A., 2023.

1.2.2.1. Funcionamiento del sistema HPLC

Antes de utilizar el sistema HPLC es recomendable desgasificar los disolventes que componen la fase móvil mediante ultrasonidos, pues ésta puede contener aire disuelto o microburbujas, que pueden ocasionar perturbaciones en el flujo de la fase móvil e inestabilidad en la señal del detector. Para ello, se realizará un proceso de purga, de cada uno de los canales de la fase móvil. Seguidamente, se realizará el mismo procedimiento con la botella de acetonitrilo. Finalmente, en el panel de control de la bomba se establece la proporción de los disolventes a emplear; y se aumenta el flujo paulatinamente hasta alcanzar la velocidad de flujo deseada.

De esta manera, con la ayuda de la bomba de alta presión se hace pasar la fase móvil por la fase estacionaria. Seguidamente, se inyecta en el sistema cromatográfico la mezcla a estudiar. Así, los componentes de la mezcla se separan gracias a sus interacciones específicas con las fases móvil y estacionaria. Durante el análisis, el sistema de recogida de datos registra la señal del detector a lo largo del tiempo de manera continua, cromatograma (figura 4). En el

cromatograma, cuando un compuesto llega al detector se observa la aparición de un pico cromatográfico en el cromatograma (un aumento de la señal que baja tras salir dicho compuesto de la celda de detección). El tiempo al que se registra el máximo del pico de señal es el tiempo de retención característico de cada compuesto. El área de pico corresponde a la señal de dicho compuesto, que nos servirá para su cuantificación (Sánchez Akum, E. A., 2023).

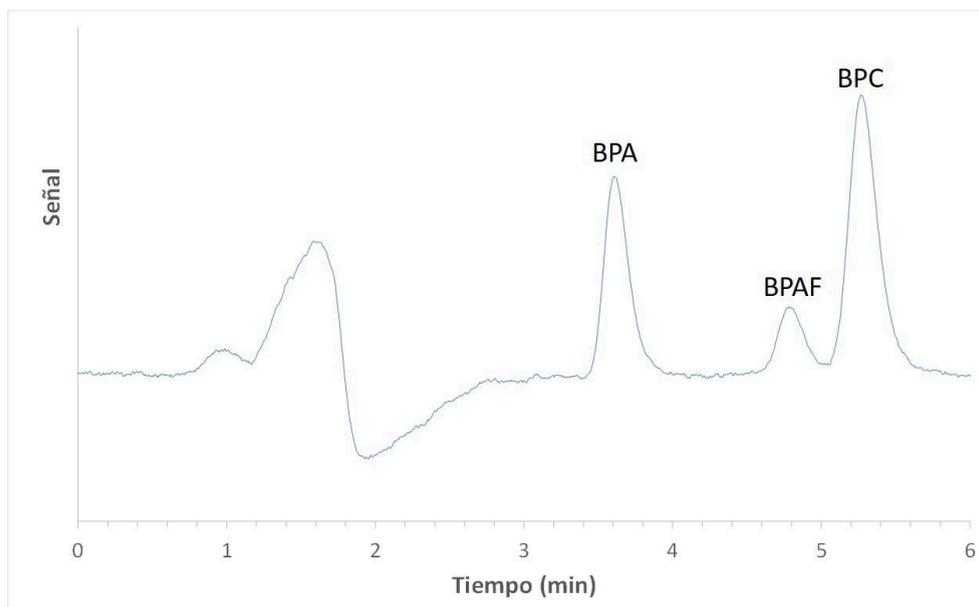


Figura 4. Ejemplo de un cromatograma correspondiente a una mezcla de BPA, BPAF y BPC de 0,05 ppm. Fuente: propia.

1.2.3. Tendencia actual de la extracción y análisis del BPA

La creciente preocupación por el BPA y los estrictos límites legislativos establecidos por la Unión Europea exige el desarrollo de metodologías analíticas precisas y sensibles para la determinación de este compuesto. Normalmente, para el análisis del BPA se utilizan la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o la cromatografía de gases (CG) (Manousi, N., y col., 2023) acoplada a distintos detectores como masas (MS), fluorescencia (FL), diode o UV-vi (Sánchez Akum, E. A., 2023). Sin embargo, debido a que las concentraciones de BPA en las muestras reales son del orden de ppb ($\mu\text{g/L}$), siempre se requiere un paso previo de extracción que permita la limpieza y preconcentración del BPA.

En la siguiente tabla (tabla 1) se recogen ejemplos de diferentes estrategias desarrolladas en los últimos 5 años para la extracción y análisis del BPA de diferentes matrices. Como se observa en la tabla, existe una tendencia hacia el desarrollo de nuevos sistemas de extracción empleando técnicas como la microextracción en jeringa, la extracción en fase sólida magnética (MSPE), la extracción mediante barras agitadoras modificadas (SBSE) o la extracción magnética dispersiva (d-SPE), entre otras. En estas técnicas, la extracción específica del BPA se consigue mediante la modificación de distintos soportes como espumas, nanopartículas (NPs), imanes, microesferas de poliestireno o papel, con sorbentes o

moléculas que permiten la extracción cuantitativa del BPA, como óxidos de grafeno, polímeros de impronta molecular (MIPs) o aptámeros, entre otros.

Así pues, el desarrollo de sorbentes selectivos y específicos sobre distintos soportes adecuados para una extracción efectiva del BPA se considera un reto en el que seguir trabajando en el campo de la química analítica para mejorar la determinación del BPA en matrices complejas.

Como se observa en la tabla 1, estas técnicas de extracción selectivas, en continuo desarrollo, se combinan habitualmente con técnicas de análisis convencionales como HPLC-UV, HPLC-FL o HPLC-MS, permitiendo siempre determinar concentraciones de BPA del orden de ppb.

Tabla 1. Métodos de determinación del BPA desarrollados en los últimos 5 años.

Compuestos analizados	Matriz de análisis	Método de extracción	Método de análisis	[BPA] en las muestras	Referencia
BPA	Agua potable embotellada	Microextracción en jeringa con una espuma recubiertos de un polímero	HPLC-UV	Agua de grifo: 4.5 ± 0.1 , agua con gas: 4.7 ± 0.1 ; agua embotellada en PET: $4,9 \pm 0,2$; almacenada agua en PC: $7,6 \pm 0,3$	Manousi, N., y col., 2023.
BPA	Agua de grifo y agua mineral	MIP sobre soporte papel	Sensor color (teléfono móvil)	Agua de grifo: $1,98 \pm 00.09$ $\mu\text{g/L}$; agua mineral: $1,92 \pm 00.07$ $\mu\text{g/L}$	El Hani, O., y col., 2023.
BPA	Agua embotellada de manantial	Enriquecimiento en la columna cromatográfica	HPLC	No se detectó BPA en ninguna de las muestras	Honeychurch, K. C., 2024.
BPA	Agua embotellada de grifo y de río tratada para consumo humano	MSPE MSPE	HPLC-DAD y HPLC-FL	No se detectó BPA en ninguna de las muestras	Oliveira, R. V. M., y col., 2022.
BPA, BPB, BAF, BPC	Muestras de leche embotellada: entera, semidesnatada y desnatada	MSPE mediante un sorbente basado en NPs de hierro modificadas con redes organometálicas	HPLC-UV	BPA en leche entera: 0,79; en leche semidesnatada: 2,32 ng/mL; en leche desnatada: 4,56. No se detectó BPB, BAF ni BPC en ninguna de las	Wang, Q., y col., 2023.

				muestras	
BPA, BPB, BAF, TBBPA	Agua potable embotellada, de grifo y de río tratada para consumo humano	d-SPE	HPLC-MS/MS	No se detectó BPA en ninguna de las muestras	Song, X. L., y col. 2022.
BPA	Agua desionizada, de grifo, embotellada y agua de embalse	SBSE mediante un imán recubierto de un MIP	HPLC-UV	No se detectó BPA en ninguna de las muestras	Wang, J., y col., 2023.
BPA	Leche, zumo de naranja, agua mineral	Aptasensor colorimétrico sobre NPs de plata	UV-vis	No se detectó BPA en ninguna de las muestras	Jia M. y col., 2020.
BPA	Leche	MSPE con un sorbente basado en NPs de hierro modificada con aptámero	HPLC-FL	No se detectó BPA en ninguna de las muestras.	Xu, Z. y col., 2020.

1.3. Extracción del BPA mediante aptámeros

Como se ha comentado, las matrices naturales son inherentemente complejas, por lo que el BPA puede coexistir con otros compuestos orgánicos que pueden dificultar su identificación. Existen en el mercado distintos cartuchos comerciales con sorbentes poliméricos, como el Strata-X, o hidrofóbicos, como el C18, que permiten la extracción en fase sólida de un amplio espectro de analitos orgánicos, entre ellos, el BPA. El problema del empleo de estos sorbentes es que no son específicos para el BPA, sino que extraen gran cantidad de compuestos orgánicos al mismo tiempo. Este hecho dificulta su uso cuando se trata de matrices complejas, ya que muchos compuestos pueden quedar retenidos en el cartucho, y posteriormente interferir en el análisis del BPA. Por ello, hay un interés creciente en el desarrollo de materiales extractantes específicos que permitan la captura selectiva de este compuesto prioritario de mezclas complejas. En este sentido, el empleo de sorbentes u otros soportes modificados con el aptámero del BPA puede ser una interesante alternativa.

Un aptámero es una secuencia de ADN o ARN de cadena sencilla que adopta la forma de estructuras tridimensionales únicas, lo cual le permite reconocer un blanco específico con gran afinidad (Ospina J.D., 2020). Esta estructura tridimensional tiene diversas interacciones que la estabilizan y le dan la capacidad de distinguir entre moléculas estrechamente relacionadas como isómeros conformacionales, moléculas diana con diferentes grupos funcionales, iones metálicos, proteínas, incluso células cancerígenas (Ibarra, P., y Omar, D., 2022 y Jia, M., y col., 2020).

Algunas características atractivas para trabajar con estas moléculas son su gran estabilidad, la facilidad para sintetizarlos y la posibilidad de poderse modificar químicamente con gran facilidad. Otra de las características de los aptámeros a tener en cuenta es que se pueden utilizar en cualquier matriz, para analizar una sustancia específica.

La obtención del aptámero específico para un determinado compuesto en una determinada matriz se realiza mediante un proceso iterativo de selección (protocolo SELEX) a partir de un amplio rango de secuencias de DNA o RNA. El aptámero específico más selectivo para enlazar el BPA empleado en el análisis del BPA es una secuencia de 63 bases (CCGGTGGGTGGTCAGGTGGGATAGCGTTCCGCGTATGGCCCAGCGCATCACGGGTTCGCACCA) (Jo, M. y col., 2011).

En la figura 5 se muestra una simulación, realizada por Deiminiat, B., y col. (Deiminait, B., y col., 2017), de cómo el aptámero interacciona de manera específica con el BPA (Apt-BPA). En la figura 5-A se muestra la estructura lineal del aptámero (sin plegar); en la figura 5-B se muestra el aptámero plegado, y en la figura 5-C se observa la estructura plegada del aptámero en su interacción con el BPA. Según indican Deiminiat, B., y col., a partir del análisis estructural del aptámero se han establecido que hasta 6 moléculas de BPA pueden ser adsorbidas sobre el aptámero.

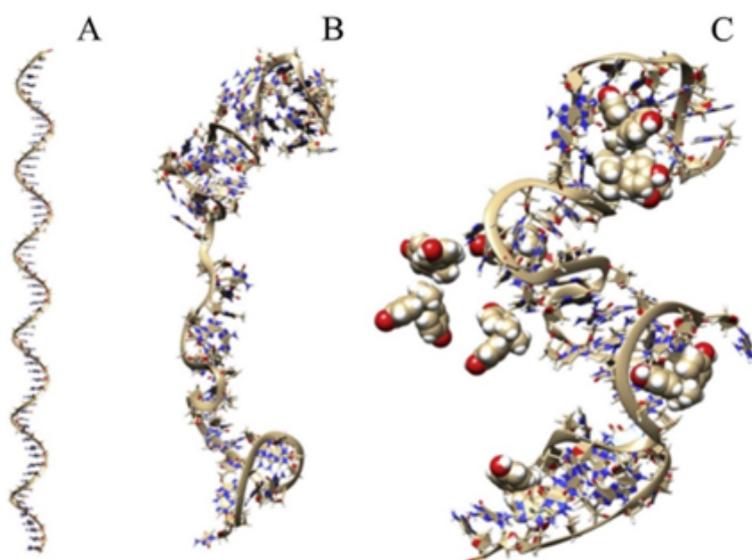


Figura 5. A) Estructura inicial del aptámero, B) estructura del aptámero tras el plegamiento y C) puntos específicos de interacción del BPA con el aptámero (Publicada con permiso de Elsevier, (Deiminiat, B., y col., 2017).

Las cadenas de aptámero pueden, además, modificarse químicamente de forma que, en uno de sus extremos terminales, se añade una cadena hidrocarbonada corta con un grupo funcional reactivo, como un tiol (-SH), un grupo amino (-NH₂) o un grupo carboxilo (-COOH), entre otros. La presencia de estos grupos funcionales permite enlazar el aptámero sobre un soporte afín. Así, por ejemplo, cuando el grupo terminal del aptámero es el tiol, éste puede enlazarse a un polímero con dobles enlaces mediante la reacción denominada “click” (Torres, S., y col., 2023).

En este TFG se ha desarrollado un sistema de extracción específico para el BPA enlazando el aptámero de BPA sobre la pared interna de un tubo de polipropileno de fondo cónico (tubo Falcon) que ha sido previamente modificado para que el aptámero pudiera unirse a la pared. Tras aplicar las reacciones de ataque del tubo que consiguen su vinilización, así como la reacción de unión entre el aptámero de BPA y el tubo atacado, se han optimizado las distintas etapas del proceso de extracción de BPA empleando este tubo extractante modificado con aptámero. El análisis de BPA en las distintas condiciones ensayadas se ha llevado a cabo mediante HPLC-FL. La metodología propuesta, *extracción en tubo-HPLC-FL*, se ha aplicado al análisis de BPA en muestras de agua.

2. Objetivos

La creciente preocupación por la presencia del bisfenol A en el medio que nos rodea, debido a sus efectos sobre la salud, ha generado un interés creciente en el desarrollo de materiales extractantes específicos, que permitan la captura selectiva de este compuesto, facilitando su análisis. El objetivo de este Trabajo de Fin de Grado (TFG) ha sido desarrollar un material de

extracción específico para el BPA basado en el uso de su aptámero correspondiente. Para conseguir este objetivo, se tienen los siguientes objetivos secundarios:

- Preparar tubos de polipropileno modificados y enlazar el aptámero específico de BPA.
- Optimizar todas las etapas implicadas en el proceso de extracción de BPA con los tubos desarrollados.
- Emplear el método de extracción optimizado junto a HPLC-FL para la extracción y análisis de BPA en los extractos y en las muestras de agua.

3. Materiales, reactivos, aparatos e instrumentos

3.1. Materiales y reactivos

A continuación se detallan todos los materiales específicos y reactivos químicos utilizados en el desarrollo del proyecto:

- Acetona
- Acetonitrilo (ACN)
- Aptámero del BPA tiolado
- Azobisisobutironitrilo (AIBN)
- Benzofenona (BZF)
- Bisfenol A (BPA)
- Cloruro de magnesio ($MgCl_2$)
- Cloruro potásico (KCl)
- Cloruro sódico (NaCl)
- Dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA)
- Etanol
- Metanol (MeOH)
- N_2 (gas)
- Tris (hidroximetil) amonometano (Tris)
- Tris (2-carboxietil) (TCEP)
- Tubos Falcon de polipropileno de 15 mL

- Disolución 91,59 μM de aptámero de BPA tiolado en Tris 10 mM y agua libre de DNA
- Disolución de BZF al 5% preparada en MeOH, desgasificado pasando N_2 durante 10 min.
- Disolución EGDMA al 15% preparado en MeOH, desgasificado pasando N_2 durante 10 min.
- Disoluciones patrón de BPA en agua y metanol a partir de la disolución madre de BPA en ACN
- Disolución de TCEP 350 mM en agua libre de DNA
- Disolución Tris 250 mM a pH 7,4 en agua libre de DNA
- Tampón de enlazado (en inglés, binding buffer, BB): 25 mM Tris pH 8, 100 mM NaCl, 25 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$.

3.2. Aparatos e instrumentos de laboratorio

A continuación, se detallan los aparatos de laboratorio e instrumentos de análisis que se han utilizado en el laboratorio para la realización de este proyecto:

- Agitador magnético
- Agitador vórtex
- Balanza analítica y granatario
- pH-metro
- Termobloque agitador para tubos Falcon
- Cámara UV con lámparas de 254 nm
- Espectrofotómetro UV-vis de fila de diodos
- Espectrofotómetro de ICP-MS
- Cromatógrafo de líquidos de alta eficacia (HPLC) Jasco provisto de una bomba cuaternaria, inyector automático, horno para columna y detector de fluorescencia. La cromatografía era una columna C18 Avantor de 3,6 μm de tamaño de poro, 4,6 mm de diámetro interno y 10 cm de longitud

4. Métodos

A continuación se describen los métodos empleados en el desarrollo de este TFG para los siguientes procedimientos experimentales:

- Preparación de una disolución de aptámero de BPA tiolado (Apt-SH) plegado a partir del aptámero de BPA comercial
- Modificación de los tubos Falcon con el aptámero del BPA
- Extracción del BPA de una disolución acuosa empleando los tubos Falcon
- Análisis del BPA presente en el extracto

4.1. Preparación de una disolución de aptámero de BPA tiolado plegado

El aptámero que se recibe en el laboratorio, tras su compra, es un sólido (0,8 mg de aptámero comercial Apt-S-S-R) que viene en un vial, el cual se ha de disolver para poder utilizarse. Además, en la preparación de la disolución del aptámero se ha de romper el enlace S-S del aptámero comercial, quedando libre el grupo tiol (-SH). Finalmente, el aptámero tiolado (Apt-SH) se ha de plegar. Todas las disoluciones empleadas en estos procesos se han preparado en agua libre de DNA.

En primer lugar, se ha de disolver el aptámero comercial siguiendo las instrucciones del fabricante:

- Centrifugar el aptámero a 10.000 rpm durante 3 min
- Añadir al vial 0,406 mL de agua
- Agitar la disolución con el vórtex durante 4 min. Con ello, se obtiene una disolución de aptámero 100 μM

En segundo lugar, se procede a la ruptura del enlace -S-S- y formación del aptámero tiolado, empleando una disolución del reactivo TCEP, que ha de estar en una concentración 100 veces superior a la del aptámero, en el medio y el pH adecuados. El procedimiento es el siguiente:

- Añadir al vial en el que se encuentra el aptámero: 17,5 μL de Tris-HCl 250 mM, pH 7,4 y 12,5 μL de TCEP 350 mM.
- Agitar la mezcla de reacción con el vórtex.
- Mantener la mezcla de reacción durante 2h a temperatura ambiente en oscuridad, para que se produzca la ruptura del enlace S-S.

Tras ese proceso, tenemos en el vial una disolución de aptámero tiolado (Apt-SH) con una concentración de 93,1 μM , con una estructura desplegada. A continuación, el aptámero tiolado debe plegarse para obtener la conformación adecuada en la que puede interaccionar de forma adecuada con el BPA. Para realizar el plegamiento del aptámero, se han de seguir los siguientes pasos:

1. Calentar la disolución de Apt-SH en el termoreactor a 95°C por 10 minutos (figura 6)
2. Enfriar la disolución a 4°C durante 10 minutos (en nevera)

Con esto, se obtiene una disolución de aptámero tiolado plegado correctamente. Una vez plegado el aptámero, la disolución de Apt-SH 93,12 μL se conserva en el congelador hasta su uso.



Figura 6. Calentamiento del aptámero a 95°C en el termoreactor.

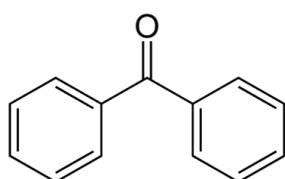
4.2. Preparación del de tubos Falcon modificados con el aptámero de BPA

La modificación de la pared interna de los tubos Falcon se realizó sobre la parte baja del tubo (0,5 mL, zona cónica). La preparación de tubos Falcon modificados con aptámero requiere de 2 etapas:

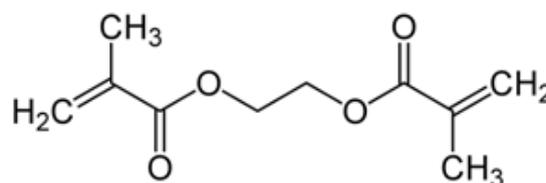
- En la primera etapa, se ha de modificar químicamente la pared interna de los tubos Falcon de forma que queden en la pared grupos funcionales de tipo vinilo (dobles enlaces).
- En la segunda etapa, se ha de enlazar el aptámero tiolado del BPA a los dobles enlaces generados en la etapa previa sobre la pared interna del tubo.

4.2.1. Modificación de la pared interna de los tubos Falcon

Como se ha comentado, para poder utilizar los tubos de propileno como sistema de extracción del BPA, primero se debe atacar su pared interna en un proceso denominado “vinilización”. Tras este proceso quedan en la pared interna del tubo grupos funcionales tipo vinilo (dobles enlaces). La vinilización se realiza en 2 etapas consecutivas en las que se emplean los reactivos benzofenona (BZF) y etilenglicoldimetacrilato (EGDMA) (figura 7) en presencia de luz ultravioleta y en ausencia de oxígeno.



Benzofenona



EGDMA

Figura 7. Estructuras químicas de la BZF y el EGDMA. Fuente: Wikipedia.

En el proceso de modificación de los tubos, en primer lugar, se introduce la disolución de BZF en los tubos de propileno que, en presencia de luz ultravioleta (UV) y en atmósfera N₂, reacciona con la pared interna del tubo y genera radicales libres. En la segunda etapa de la reacción se introduce la disolución de EGDMA que, en presencia de la luz UV y en atmósfera de N₂, se unirá por uno de sus dobles enlaces a los radicales libres de la pared del tubo dejando libre en el otro extremo de la molécula un grupo vinilo. Tras esta etapa, se han generado los grupos vinilo necesarios para que el aptámero tiolado del BPA pueda anclarse posteriormente a la pared del tubo en la siguiente etapa. En la figura 8 se muestra un esquema de las reacciones de ataque del tubo de polipropileno en el proceso de vinilización.

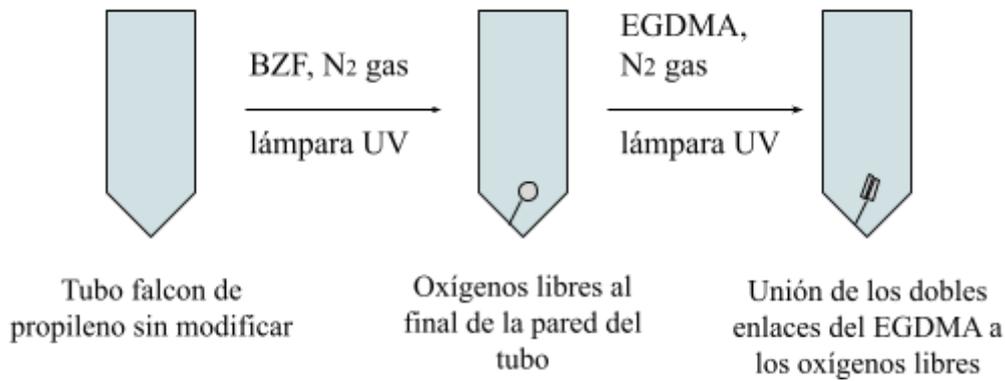


Figura 8. Esquema del proceso de vinilización de los tubos Falcon. Fuente: propia.

A continuación, se detallan los pasos del procedimiento experimental de vinilización de un tubo:

- Lavar los tubos Falcon con:
 - 0,5 mL de etanol, por duplicado
 - 0,5 mL de acetona, por duplicado
- Secar el tubo con N₂ durante 3 min.
- Cerrar el tubo con un tapón con 2 agujeros. Seguir pasando N₂ al tubo durante 3 min más.
- Añadir 0,5 mL de disolución de BZF al 5% en Metanol previamente desgasificada con N₂, por uno de los agujeros de la tapa. Durante el proceso de adición de la BZF se mantiene la atmósfera de N₂ en el interior del tubo.
- Desgasificar la disolución durante 1 min más y cerrar rápidamente ambos agujeros con Bluetack para evitar la entrada de oxígeno.
- Introducir el tubo cerrado en cámara UV con lámparas de 254 nm durante 30 min, colocando una plataforma para que la luz irradie directamente sobre la disolución (a unos 5 cm), como se observa en la figura 9-A.
- Tras la irradiación, vaciar la BZF del tubo, secarlo con N₂ durante 3 min y cerrarlo con tapón de dos agujeros. Seguir pasando N₂ al tubo durante 3 min más.
- Añadir 0,5 mL de disolución EGDMA al 15% en MeOH desgasificada previamente por uno de los agujeros de la tapa, manteniendo la entrada de N₂ en el tubo
- Desgasificar por 1 minuto más y tapar ambos agujeros rápidamente con Bluetack para evitar la entrada de oxígeno.
- Introducir de nuevo el tubo a la cámara de UV e irradiar durante 30 min.
- Una vez se saca el tubo de la cámara en esta segunda etapa, se ha de observar que ha habido reacción. Esto se observa porque en la disolución aparece un grumo (figura 9-B).
- Finalmente, el tubo se lava con MeOH (0,5 mL x 10 veces) y se deja secar al aire. Tras el proceso completo, la pared interna del tubo se observa mate, lo que indica el correcto ataque a los tubos (figura 9-C).

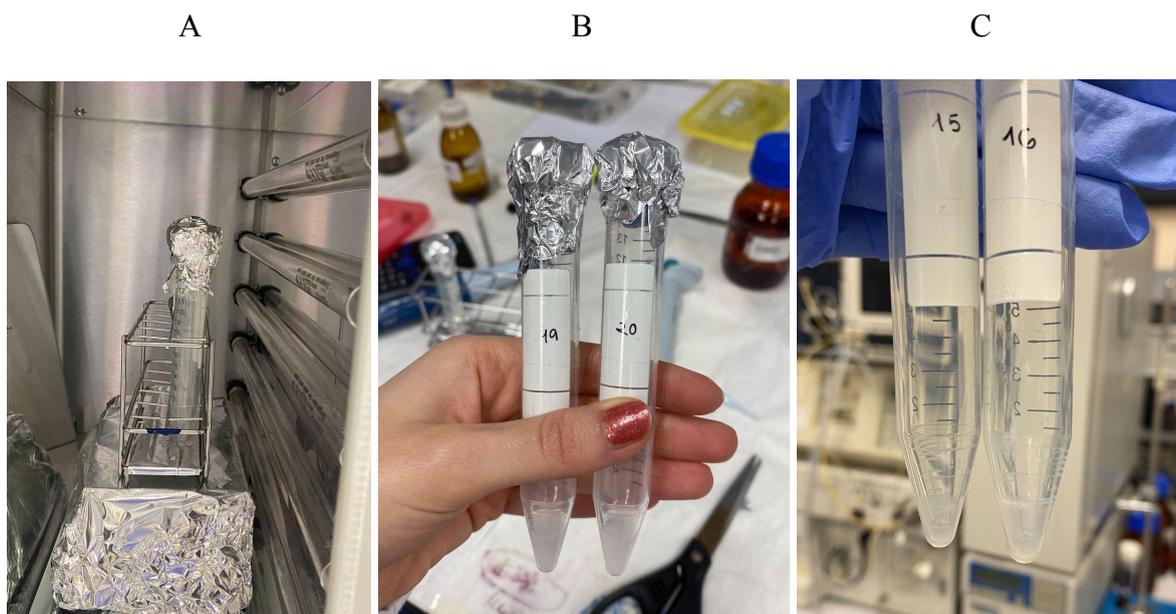


Figura 9. Diferentes etapas del proceso de vinilización de los tubos. A: tubos en la cámara UV sobre plataforma; B: tubos con grumo una vez salidos de la cámara UV; C: tubos vacíos con la pared atacada (mate) tras el ataque.

4.3. Enlazado del aptámero tiolado del BPA a los tubos Falcon vinilizados

Para permitir la captura selectiva del BPA, se une a la pared interna del tubo de polipropileno vinilizado el aptámero que puede interactuar específicamente con el BPA gracias a su plegamiento tridimensional. La unión se realiza entre el doble enlace de la pared del tubo modificada y el grupo tiol del aptámero (figura 10).



Figura 10. Unión del aptámero tiolado plegado a la pared interna del tubo modificada previamente con BZF y EGDMA a través de los dobles enlaces libres. Fuente: propia.

Esta reacción entre el doble enlace y un grupo tiol, denominada reacción “click”, tiene lugar a 55°C en presencia de un iniciador (AIBN) y 5 horas de reacción (figura 11). Tras la reacción, el aptámero estará químicamente enlazado a la pared del tubo Falcon.

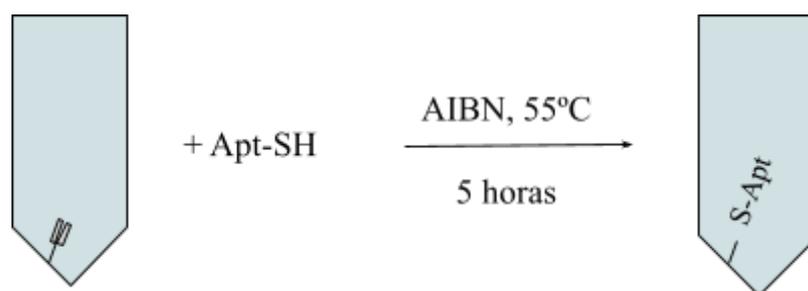


Figura 11. Esquema de reacción “click” entre el aptámero y el grupo vinilo del tubo. Fuente: propia.

El procedimiento experimental a seguir para que se produzca la reacción es el siguiente:

1. Preparar una mezcla de reacción que contiene: 8,2 mg de AIBN; 0,450 mL de ACN; 0,450 mL de agua DNA-free y 22,5 μ L de disolución de aptámero plegado 93 μ M.
2. Añadir 0,250 mL de la disolución preparada al tubo Falcon vinilizado y mantener a 55°C en agitación durante 5 h en el termobloque.
3. Tras las 5h de reacción, lavar los tubos con metanol (0,5 mL x 3), agua (0,5 mL x 3) y BB (0,5 mL x 3). Los tubos se dejan en BB hasta su utilización como dispositivo de extracción.

Comprobación de la reacción de unión del BPA mediante espectrofotometría UV-vis:

Para comprobar la unión del aptámero a la pared del tubo se siguieron 2 estrategias:

- La primera consiste en hacer un ensayo de la reacción en la que se ataca uno de los tubos Falcon vinilizados con 1 mL de disolución de aptámero (en lugar de 0,25 mL). En este proceso, se sacaron fracciones de 150 μ L cada hora desde tiempo de reacción 0 a tiempo de reacción 5 horas, y se midió el espectro de absorbancia de la disolución de mezcla de reacción con cada fracción empleando un espectrofotómetro de fila de diodos y una celda de 100 μ L. Una disminución en la señal de absorbancia a 260 nm (característica del aptámero, figura 12) a lo largo de la reacción confirmaría la disminución del aptámero en la disolución de reacción y, por tanto, su unión a la pared del tubo.

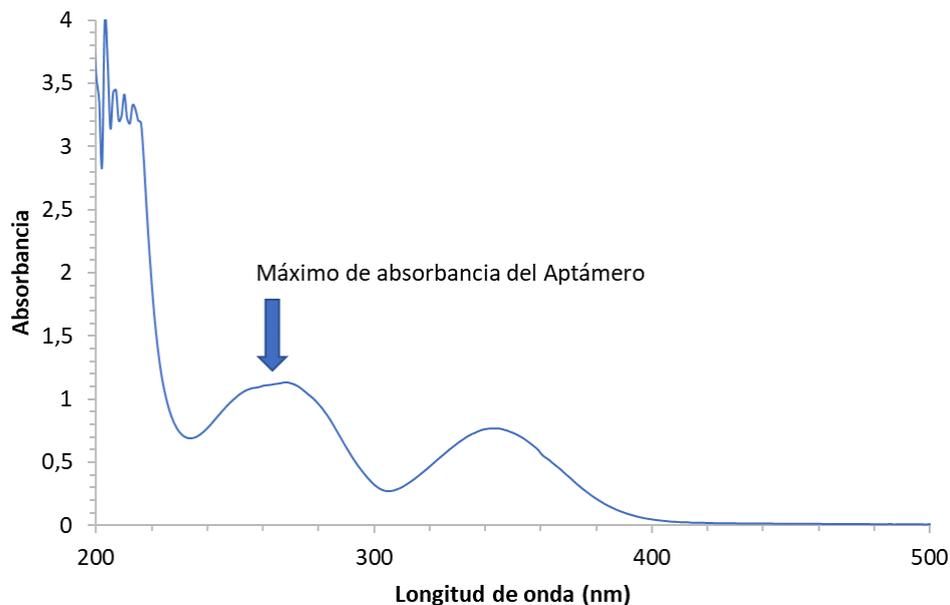


Figura 12. Espectro de absorción de la mezcla de reacción del aptámero a tiempo cero.
Fuente: propia.

- La segunda estrategia consiste en analizar el contenido de fósforo en la pared de un tubo original (sin ataque) y de un tubo tras la reacción click de unión del aptámero. Para hacer dicho análisis, se cortó un fragmento de cada uno de los tubos, de aproximadamente 0,5 x 0,5 cm, y se hizo un análisis de P mediante ICP-MS. El aumento en la concentración de P en la superficie del tubo al que se aplicó la reacción click indicaría la presencia del aptámero enlazado al tubo.

4.4. Extracción del BPA de una disolución empleando los tubos Falcon modificados con aptámeros

El proceso de extracción mediante los tubos Falcon modificados con aptámero consta de cinco pasos: acondicionado de los tubos, carga de la muestra, lavado y secado del tubo y elución. Esto permite extraer el BPA presente en la disolución con el aptámero unido a la pared interna de los tubos y su elución a un medio más afín, para analizar la cantidad de BPA extraído con HPLC.

En la fase de acondicionado, se realiza primero una correcta limpieza de los tubos para eliminar rastro de compuestos que puedan interferir en los resultados, y posteriormente se crea un medio óptimo para la adsorción del BPA en el aptámero. La fase de carga o de absorción consiste en la adición de una disolución de BPA, el cual se une al aptámero enlazado a la pared del tubo. A continuación, en la fase de lavado y secado se elimina cualquier rastro de la disolución anterior. Por último, en la fase de elución, se adiciona un volumen de MeOH, ya que, al tratarse de un medio más afín para el BPA, éste pasa del aptámero al disolvente. El extracto obtenido deberá filtrarse antes de proceder a su análisis mediante HPLC con detección fluorescente.

En este TFG se han optimizado las distintas etapas del procedimiento de extracción de BPA con los tubos modificados con aptámero. En el proceso de extracción óptimo, los pasos a realizar son los siguientes:

- Acondicionado del tubo: se introducen en el tubo 0,5 mL de una disolución de BB, se agitan durante 30 s en el vórtex, y se tira a residuos. Así, el aptámero se encuentra en un medio idóneo para la extracción de BPA.
- Carga: se introducen 5 mL de patrón acuoso de BPA y se mantienen en agitación durante 15 min a 600 rpm. En este paso el BPA interacciona con el aptámero de la pared del tubo y queda allí retenido. Pasados los 15 min de agitación, se descarta la disolución (figura 13).
- Lavado: se introducen 0,5 mL de agua Milli-Q en el tubo se agitan durante 30 segundos en el vórtex y se tira el disolvente de lavado.
- Secado: se seca cuidadosamente el tubo con papel sin tocar la parte atacada del fondo, donde está enlazado el BPA.
- Elución: se introducen 0,25 mL de MeOH en el tubo y se agitan durante 5 min a 600 rpm (figura 13). El MeOH al entrar en contacto con el BPA unido al aptámero en la pared del tubo, lo separa y lo libera a la disolución debido a que se trata de un medio más óptimo para el BPA. La fracción de elución se filtra mediante filtros de PTFE de 0,22 μm y se introduce en un cono de vidrio en el interior de un vial para HPLC, para su posterior análisis.

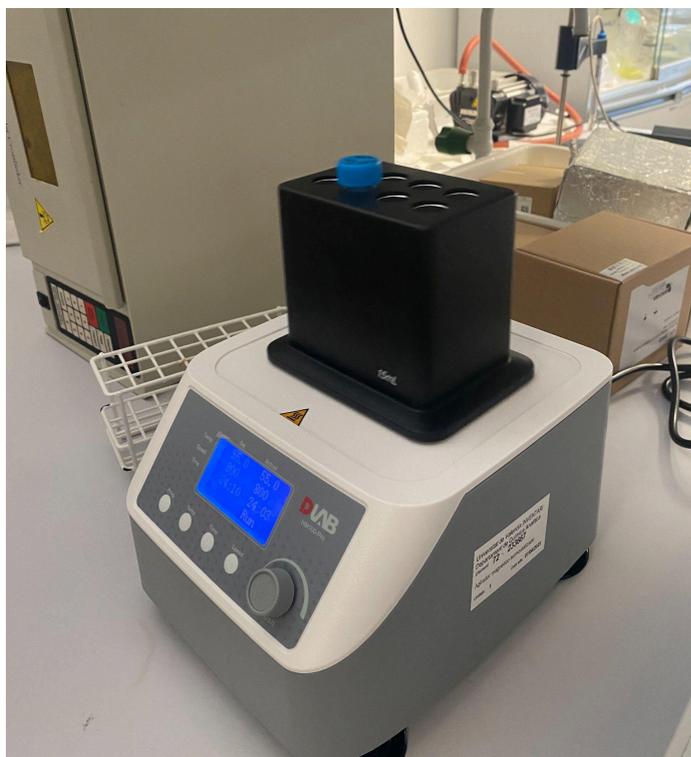


Figura 13. Fase de agitación de los tubos en el termobloque en los procesos de carga y elución.

Tras el proceso de extracción, el tubo debe lavarse para su reutilización. Esta etapa es importante para eliminar todo posible rastro de los compuestos anteriores y dejarlo en un medio adecuado para su conservación/reutilización. El tubo usado, se lava primero con 0,5 mL MeOH (1 min de agitación), para asegurarse de que cualquier posible resto de BPA se elimine. A continuación, se lava 2 veces con 1 mL de agua Milli-Q, y dos veces con 0,5 mL de BB, agitando con el vórtex durante 30 segundos en cada lavado. El tubo se conserva en la última disolución de BB hasta su siguiente uso.

4.5. Procedimiento de análisis de BPA mediante HPLC-FL

Los extractos obtenidos tras los procesos de extracción, así como una serie de patrones de calibración de BPA en MeOH, se analizan mediante cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un detector de fluorescencia.

En el método de análisis cromatográfico, la fase móvil fue 50% ACN, 50% Agua, la velocidad de flujo de la fase móvil fue de 1,2 mL/min, y el volumen de inyección fue de 10 μ L. La columna cromatográfica empleada fue una Avantor C18 (100 x 4,6 mm), y se mantuvo en el horno de columnas a 32°C durante todo el proceso de medida. En el detector de fluorescencia se programó una $\lambda_{exc} = 282$ nm, y $\lambda_{em} = 308$ nm (ganancia 1000) para la detección de BPA.

Para cada patrón y para los extractos de análisis, el sistema de recogida de datos registra la señal de intensidad de fluorescencia emitida a lo largo del tiempo (cromatograma). Al $t_r = 2,2$ min, se observó un pico cromatográfico correspondiente a BPA. El área de pico de las disoluciones patrón de BPA se midió para obtener la recta de calibrado, *Área de pico vs Concentración de BPA*. El área del pico obtenida en cada uno de los ensayos de extracción realizados se midió para la cuantificación del BPA en cada caso.

5. Resultados y discusiones

5.1. Características del proceso de análisis HPLC-FL

En este apartado se describen las características del procedimiento cromatográfico de análisis que se ha empleado en la determinación de BPA en los extractos de metanol: recta de calibrado, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ).

5.1.1. Recta de calibrado

Para obtener la recta de calibrado se realizaron ocho disoluciones patrón de BPA en MeOH entre 0,01 y 0,3 mg/L.

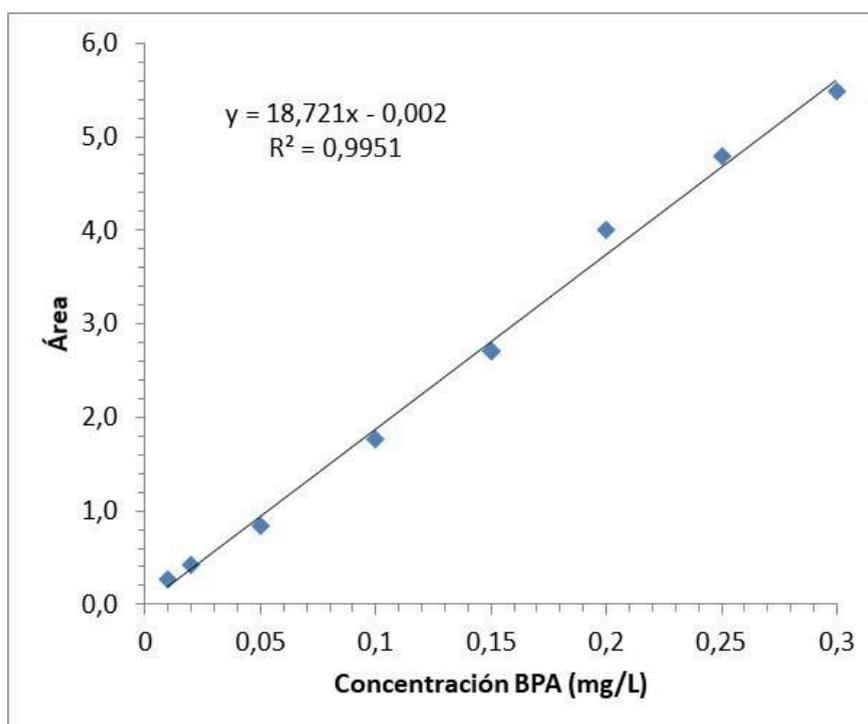


Figura 14. Recta de calibrado del proceso de análisis HPLC-FL. Fuente: propia.

La recta de calibrado (figura 14) es la ecuación que relaciona el área de pico de BPA con la concentración de BPA (mg/L) en las disoluciones patrón. La ecuación de la recta obtenida (ecuación 1) nos permitirá conocer la concentración de BPA en las disoluciones de extracto estudiadas.

$$A = (18,722 \pm 0,5) \times C_{\text{BPA}} - (0,00 \pm 0,08) \quad \text{Ecuación 1}$$

Por otro lado, el coeficiente de correlación entre los puntos de la recta es $r^2 = 0,9951$. Este valor permite evaluar la bondad de ajuste del modelo de regresión al conjunto de datos tomados e indica el porcentaje de variabilidad explicado por el modelo de regresión. Cuanto más cerca de 1,0 se encuentre este valor, mejor es el ajuste del modelo. Por tanto, se puede concluir que este modelo de regresión lineal presenta una muy buena relación entre los datos de Área de pico y concentración de BPA obtenidos

5.1.2. Figuras de mérito: LOD y LOQ

Otros parámetros de interés en el método de análisis son los límites de detección y cuantificación, LOD y LOQ respectivamente. El LOD es la concentración más pequeña que se puede observar en el sistema cromatográfico, y el LOQ es la concentración más pequeña que se puede cuantificar, y por ello, incorporar en el calibrado. El LOD, que corresponde a una señal 3 veces superior al ruido de fondo, se estableció experimentalmente mediante el análisis cromatográfico de varios patrones de BPA de pequeña concentración, entre 0,5 y 5 $\mu\text{g/L}$, y fue de 2 $\mu\text{g/L}$. Por ello, teniendo en cuenta que el LOQ es 10 veces el ruido de fondo, se puede obtener el valor del LOQ de 6,7 $\mu\text{g/L}$.

5.2. Obtención de los tubos extractantes modificados con el aptámero de BPA

5.2.1. Etapa de vinilización

Como se ha comentado en la metodología, para obtener los tubos extractantes modificados con el aptámero de BPA, se requiere una primera etapa en la que se ha de conseguir la vinilización de la pared interna de los tubos Falcon de polipropileno empleando 2 reacciones consecutivas con BZF y EGDMA. Tras la realización de varios intentos en diferentes tubos obtener una vinilización correcta, se ha llegado a la conclusión de que la total ausencia de oxígeno en todo el proceso de vinilización es esencial. Esto se debe a que, al tratarse de reacciones que contienen radicales libres éstos pueden reaccionar fácilmente con el oxígeno del aire, por lo que es esencial mantener la atmósfera de N₂ en todo el proceso de reacción.

Por ello, es de suma importancia establecer una serie de pautas que permitan desplazar el oxígeno presente en el entorno de los tubos y en las disoluciones de BZF y EGDMA, lo que requiere trabajar en atmósfera de N₂ (figura 15) durante todo el proceso. Por una parte, para que los reactivos BZF y EGDMA estén también libres de oxígeno antes de ser introducidos en los tubos, estos son burbujeados con N₂ antes del trasvase de cualquier volumen de disolución desde el recipiente original a los tubos. Por otra parte, tras el lavado de los tubos previo a las reacciones que darán lugar a la vinilización éstos son secados con una corriente de N₂ durante 3 minutos. A continuación, mientras pasa N₂ por el tubo, se añade la disolución de reactivo (BZF o EGDMA), y se mantiene el flujo de N₂ durante 2 minutos más. Finalmente, los agujeros de las tapas de los tubos que permiten el paso de N₂ y la introducción de los reactivos se han de cerrar perfectamente con *Bluetack*, para evitar la entrada de oxígeno en el tubo y proceder a la reacción con BZF o EGDMA en la lámpara UV durante la media hora de atmósfera de N₂.

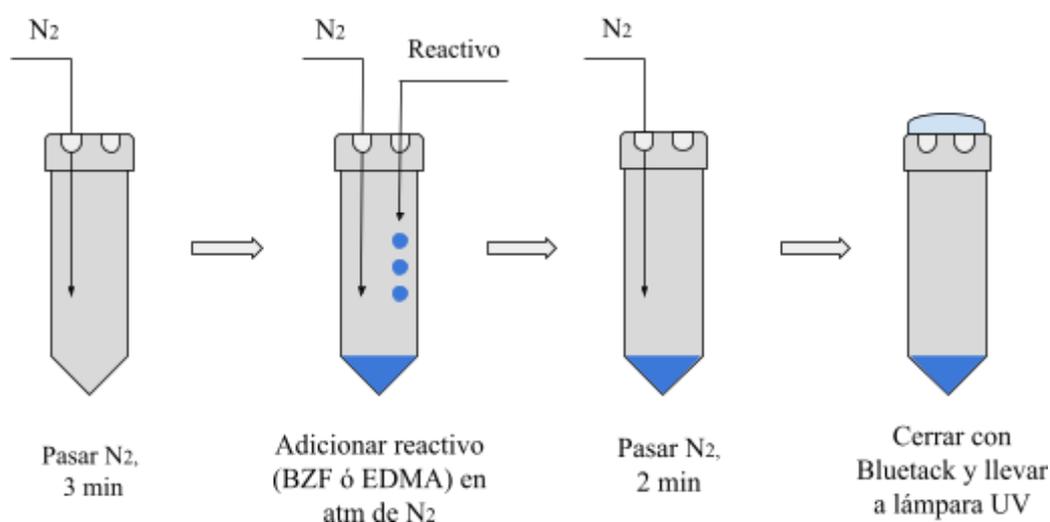


Figura 15. Esquema de trabajo para la adición de los reactivos de vinilización en atmósfera de N₂. Fuente: propia.

5.2.2. Etapa de enlazado del aptámero de BPA

Una vez vinilizada la pared interna de los tubos, se realiza la unión del aptámero a los dobles enlaces mediante la reacción “click”, lo que permitirá la adsorción selectiva de BPA en los procesos de extracción. Como se ha comentado, esta reacción se produce en presencia de AIBN a 55°C durante 5 horas. Para comprobar que el aptámero se ha enlazado correctamente a la pared vinilizada del tubo, se realizaron dos procedimientos:

- medida de la absorbancia a 260 nm de la disolución de reacción “click”
- medida del porcentaje de fósforo en la pared del tubo tras la reacción “click”

En el primero de los procedimientos de comprobación, se midió la absorbancia de la disolución de la reacción “click” a 260 nm, longitud de onda de absorción máxima del aptámero, mediante un espectrofotómetro UV-vis. La absorbancia de la disolución se midió a tiempo cero, cuando la reacción aún no ha comenzado, cada hora durante 5 horas, y a las 24 horas. Para que se pueda demostrar la unión correcta del aptámero a la pared del tubo, la absorbancia de la disolución a 260 nm debería ir disminuyendo con el tiempo, debido a que el aptámero va desapareciendo de la disolución conforme se va enlazando a la pared interna del tubo atacado. Sin embargo, como se observa en la figura 16, la absorbancia a dicha longitud de onda aumenta en vez de disminuir debido a la presencia de una reacción secundaria en el proceso de reacción cuyo producto da una banda de absorbancia en la misma zona que la longitud de onda máxima del aptámero. Por tanto, este estudio no permitió demostrar la unión del aptámero a la pared atacada del tubo de propileno, por lo que fue necesaria la realización de otro estudio diferente para comprobarlo.

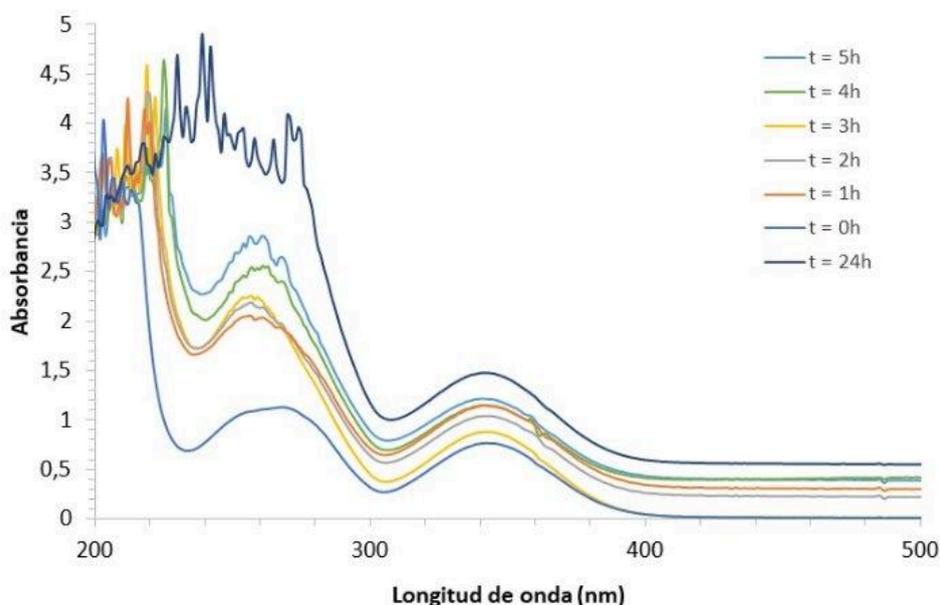


Figura 16. Espectros de absorción realizados a tiempo 0, y a 1h, 2h, 3h, 4h, 5h y 24h durante la reacción click. Fuente: propia.

Por ello, para poder demostrar la unión del aptámero a la pared del tubo, se realizó una medida del porcentaje de fósforo en la pared interna del tubo tras realizarse la reacción “click” ya que la presencia de fósforo se relaciona con la presencia del aptámero, puesto que lo contiene en su estructura química (figura 17). Como en un fragmento de ARN, en el aptámero las bases están unidas a un eje formado por ribosa y fosfato, unidos de forma alternante, por lo que la presencia de fósforo sobre la pared interna del tubo es una buena media de la presencia de aptámeros enlazados.

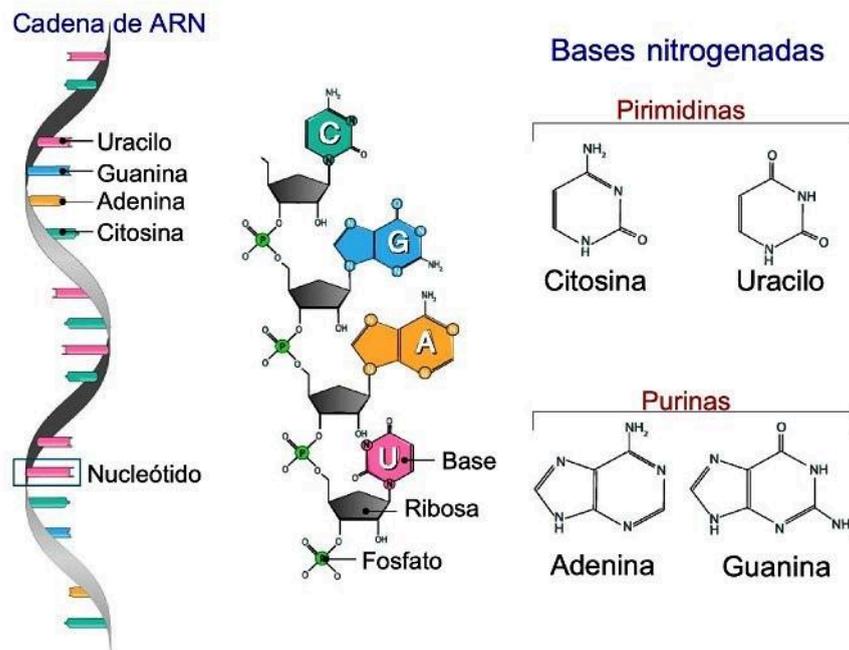


Figura 17. Estructura química de un fragmento de cadena de ARN. Fuente: enciclopedia significados.

Para hacer dicha medida, se cortó un fragmento de un tubo en el que se había realizado la reacción “click” de adición del aptámero durante 5 h de reacción, y otro fragmento de un tubo de referencia, que no había sido sometido a ningún tratamiento. Estos se mandaron a la Sección de Espectroscopía Atómica de la UV (Servicio Central de Soporte a la Investigación Experimental, SCSIE) para que realizaran un análisis de la concentración de fósforo por ICP-MS. Los resultados que se obtuvieron en el estudio fueron los siguientes:

Tubo sin modificar: [P] $1,36 \pm 0,05$ mg/Kg

Tubo con Aptámero: [P] $9,59 \pm 0,09$ mg/Kg

Como se puede observar, el tubo con aptámero tiene 7 veces más fósforo que el tubo de referencia, que no ha sido modificado. Este estudio demuestra que el aptámero ha quedado unido químicamente a la pared interna del tubo vinilizado.

5.3. Estudio preliminar de extracción

En el estudio preliminar, se realizaron pruebas de extracción de BPA con los tubos modificados con aptámero a distintos niveles de concentración y también se realizó la extracción con los tubos de referencia (sin modificar).

Los tubos extractantes modificados con aptámero y los tubos de referencia (sin modificar) se usaron para la extracción de una disolución acuosa de BPA de 0,3 mg/L con un procedimiento básico en el que 1 mL de disolución de BPA se ponía en agitación en el tubo durante 30 min y, tras lavar el tubo con 0,5 mL de agua y secarlo por dentro, se eluyó el BPA retenido en el tubo con 1 mL de metanol durante 15 minutos. El extracto filtrado se analizó mediante HPLC y se dedujo el porcentaje de recuperación de BPA.

Para deducir el porcentaje de recuperación de BPA (%Rec) en los ensayos de extracción, se midió el área de pico obtenida en los extractos y se interpoló en la recta de calibrado de patrones. A continuación, se calculó el porcentaje de recuperación de BPA como la concentración de BPA en el extracto deducida con el calibrado ($C_{\text{BPA en el extracto}}$) entre la concentración de BPA teórica en la disolución final de extracción ($C_{\text{BPA teórica final}}$) por 100 (Ecuación 2):

$$\%Rec = \frac{C_{\text{BPA en extracto}}}{C_{\text{BPA teórica final}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Cabe resaltar que en los procesos de extracción combinados con cromatografía se consideran cuantitativos porcentajes de recuperación de BPA (%Rec) entre 75-120%.

En nuestro primer ensayo, el porcentaje de recuperación de BPA empleando los tubos modificados con aptámero fue del $(93,5 \pm 1,9)\%$, mientras que con los tubos de referencia no se recuperó nada de BPA ya que no tenían puntos donde unirse en la etapa de absorción. Con este resultado, se considera que los tubos extractantes preparados pueden ser una alternativa prometedora para la extracción del BPA.

Además, con las mismas condiciones de extracción de partida y los tubos modificados con aptámero, se realizaron otras 3 series de extracción por triplicado empleando disoluciones de BPA de concentraciones menores, 0,045, 0,075 y 0,1 mg/L, para comprobar si la extracción era efectiva a concentraciones más bajas en estas condiciones. Como se observa en la tabla 2, se obtienen buenas recuperaciones para todas las concentraciones estudiadas, lo que corrobora el buen funcionamiento de los tubos como sistema de extracción para distintas concentraciones de BPA en estas condiciones preliminares.

Tabla 2. Porcentajes de recuperación para disoluciones acuosas con diferentes concentraciones de BPA.

Concentración BPA (mg/L)	%Rec \pm s
0,045	86 \pm 2
0,075	86 \pm 1
0,1	83 \pm 2
0,3	93 \pm 2

5.4. Optimización de las etapas de extracción

El objetivo en la optimización del proceso de extracción es establecer las mejores condiciones de extracción que permitan, por una parte, obtener el mayor factor de concentración posible, que se conseguirá empleando el mayor volumen de muestra y el menor volumen de eluyente y, por otra parte, que el proceso de extracción sea lo más corto posible evaluando los tiempos de adsorción y elución. Se considerará la condición óptima aquella a partir de la cual se obtengan porcentajes de recuperación de BPA superiores al 80%.

Con los tubos extractantes modificados con aptámero, se procedió a optimizar las distintas etapas de la fase de extracción del BPA siguiendo un protocolo similar al que se emplea con SPE. En la optimización, se evaluaron diferentes parámetros como son: el volumen inicial de muestra, el volumen final o de elución y el tipo de disolvente, el tiempo de absorción, el tiempo de elución y la temperatura de absorción. Cada estudio se realizó por triplicado.

Las condiciones de partida del estudio de optimización fueron similares a las del estudio preliminar: temperatura ambiente, 1 mL de disolución de BPA de 0,15 mg/L y 30 minutos para la etapa de absorción y 1 mL de MeOH como disolvente y 15 minutos de tiempo para la etapa de elución.

5.4.1. Optimización de la etapa de elución

Optimización del disolvente de elución

Con las condiciones de partida mencionadas, se procedió a seleccionar el disolvente de elución. Para ello, se emplearon 1 mL de metanol o 1 mL de ACN como disolvente para la etapa de elución. Los porcentajes de recuperación medios de BPA fueron de (86 \pm 3)% y (38 \pm 3)% cuando se empleó MeOH y ACN, respectivamente. Por ello, se seleccionó el MeOH como disolvente óptimo para la etapa de elución.

Optimización del volumen de elución

Para el estudio del volumen de elución que permite la elución cuantitativa del BPA adsorbido, se realizaron experiencias usando un volumen de metanol entre 0,15 y 1,0 mL. En cada caso,

se realizó el proceso de extracción con 1 mL de disolución acuosa de BPA, de manera que la concentración final de BPA en el metanol fuera de 0,15 mg/L. El tiempo de adsorción fue de 30 min y el tiempo de elución de 15 min, y todos los estudios se realizaron por triplicado.

En la figura 18 se observa que, para el volumen más pequeño, 0,15 mL, el porcentaje de recuperación de BPA quedó ligeramente por debajo del 80% y, además, resultaba complicado trabajar con un volumen tan pequeño ya que la disolución se ha de filtrar antes del análisis cromatográfico. Dado que a partir de un volumen de 0,250 mL de metanol se podía trabajar bien y se obtienen recuperaciones del BPA próximos al 90%, se consideró que este volumen sería óptimo para el procedimiento de extracción en estudio.

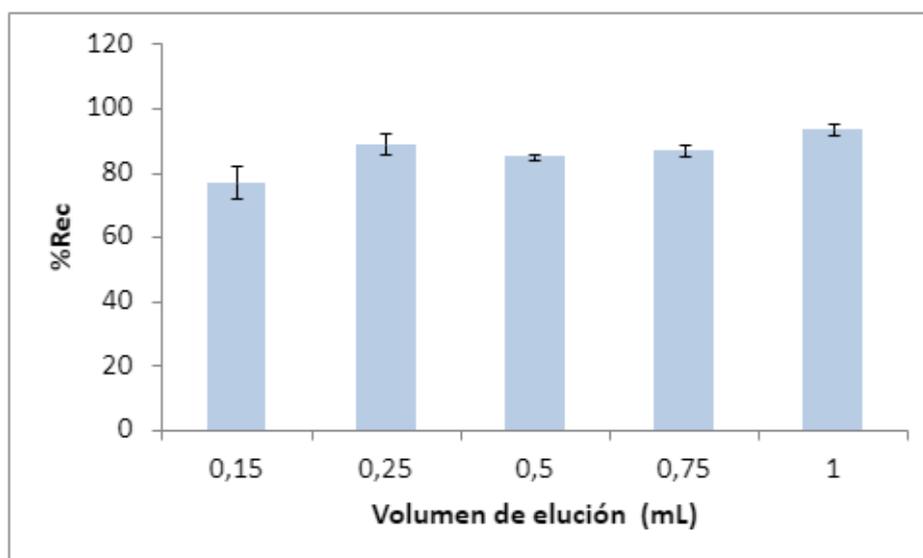


Figura 18. Porcentajes de recuperación de BPA para diferentes volúmenes de MeOH en la etapa de elución. Fuente: propia.

Optimización del tiempo de elución

Para establecer cuál es el menor tiempo que ha de estar el metanol en contacto con el tubo, para que el proceso de elución sea cuantitativo, se realizaron cuatro series de extracción (por triplicado) empleando tiempos de elución de 1, 3, 5 y 10 min.

En la tabla 3 se observa que se obtienen porcentajes de recuperación muy semejantes en todos los tiempos estudiados, ya que con tan solo 1 min de elución se obtienen valores de recuperación del BPA próximos al 90%. Por tanto, se seleccionó como tiempo de elución óptimo de 1 minuto, ya que este asegura la correcta extracción del BPA.

Tabla 3. Porcentajes de recuperación de BPA para diferentes tiempos de elución.

Tiempo de elución (min)	%Rec \pm s
1	89 \pm 6
3	87 \pm 3
5	88 \pm 5
10	89 \pm 7
15	89 \pm 3

5.4.2. Optimización de la etapa de adsorción

Optimización del volumen de muestra en la absorción

A continuación, se estudió el volumen máximo de disolución de BPA que puede emplearse en la etapa de absorción que permitirá maximizar el factor de concentración del proceso de extracción. Para ello, se realizó el proceso de extracción partiendo de volúmenes iniciales entre 1,0 y 7,5 mL de una disolución de BPA en agua Milli-Q. En todos los casos, el volumen final fue de 0,25 mL de MeOH, con una concentración final de BPA de 0,15 ppm. El tiempo de adsorción fue de 30 min y el tiempo de elución de 1 min, y las cinco series se realizaron por triplicado.

El objetivo es establecer cuál es el mayor volumen de muestra que se pueda utilizar, para que el BPA se adsorba cuantitativamente sobre el aptámero enlazado en la pared interna del tubo. Los resultados se muestran en la figura 19.

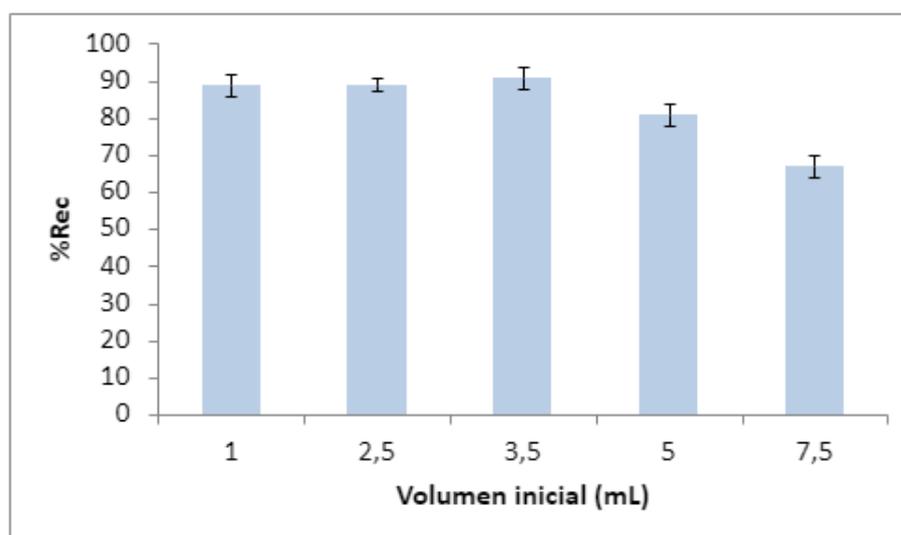


Figura 19. Gráfica representativa de los %Rec de BPA frente al volumen inicial de disolución. Fuente propia.

Como se observa en la figura 19, con todos los volúmenes, excepto con 7,5 mL, se obtienen porcentajes de recuperación de BPA cuantitativos, mayores del 80%, por lo que se ha seleccionado 5 mL como el volumen inicial óptimo para la extracción, ya que este nos asegura la extracción correcta del BPA y nos proporciona el máximo factor de concentración (FC). El FC del proceso de extracción, teniendo en cuenta los volúmenes óptimos de las etapas de absorción ($V_i = 5$ mL) y elución ($V_f = 0,25$ mL) es de 20 (ecuación 4).

$$FC = \frac{V_i}{V_f} = \frac{5}{0,25} \quad \text{Ecuación 3}$$

Optimización del tiempo de adsorción

Para poder establecer cuál es el menor tiempo de adsorción en el cual el proceso de extracción del BPA de la matriz acuosa sea cuantitativo, se realizaron siete series con tiempos de absorción comprendidos entre 1 y 60 min. Se partió de 5 mL de disolución acuosa de BPA 0,0075 ppm, obteniendo una concentración final de 0,15 ppm de BPA en los 0,25 mL de metanol usados en la etapa de elución, y todos los estudios se realizaron por triplicado. La tabla 4 muestra los porcentajes de recuperación obtenidos para cada tiempo de adsorción.

Tabla 4. Porcentajes de recuperación de BPA para diferentes tiempos de adsorción.

Tiempo de adsorción (min)	%Rec \pm s
1	42 \pm 4
5	69 \pm 1
10	82 \pm 4
15	89 \pm 7
30	91 \pm 3
45	89 \pm 4
60	96 \pm 3

Como puede observarse en la tabla, con tiempos menores a 10 minutos se obtienen porcentajes de recuperación menores al 82%; en este caso, se seleccionó como óptimo un tiempo de adsorción de 15 minutos para asegurar la completa absorción del BPA sobre la pared del tubo.

Estudio de la influencia de la temperatura en el proceso de adsorción

Un parámetro que puede influir en la etapa de adsorción es la temperatura. Por ello, se realizaron cuatro series, en las que se realizó el proceso de extracción a diferentes temperaturas: 20, 30, 40 y 50°C. Los tiempos de absorción y elución fueron de 15 y 1 min, respectivamente. Se inició el proceso con 5 mL de una disolución acuosa de BPA de 0,0075

mg/L, y se finalizó con 0,250 mL de MeOH lo que proporcionaba una concentración final teórica de 0,150 mg/L de BPA.

El %Rec de BPA fue similar en todos los casos, con una ligera disminución a temperaturas mayores de 40 °C. Por lo tanto, se puede concluir que trabajar a temperatura ambiente es lo más idóneo para realizar las extracciones.

Proceso óptimo de extracción de BPA con los tubos extractantes

Con todo esto, una vez optimizados los parámetros de las etapas de absorción y elución, el proceso de extracción óptimo es el siguiente:

- Volumen inicial de disolución acuosa de BPA: 5 mL
- Tiempo de adsorción: 15 min
- Volumen de eluyente (metanol): 0,250 mL
- Tiempo de elución: 1 min

5.5. Características del tubo extractante con aptámero: reusabilidad

Los materiales extractantes fabricados en laboratorio, tienen habitualmente un número de usos limitado. Para poder estudiar la reusabilidad de los tubos preparados, se ha estudiado cómo varía el porcentaje de recuperación de BPA con 3 tubos que se utilizaron para el proceso de extracción en las condiciones óptimas más de 35 veces. Esto nos permitió obtener el número de usos a partir del cual nuestros tubos pierden eficacia.

La figura 20 muestra el porcentaje de recuperación de BPA obtenido con los 3 tubos tras sus diferentes usos. Como se puede observar, hasta los 30 usos se obtiene un porcentaje de recuperación eficiente, siempre mayor del 80%. Sin embargo, a partir de los 30 usos se observa un descenso en el porcentaje de recuperación de BPA que nos indica que los tubos comienzan a perder eficacia.

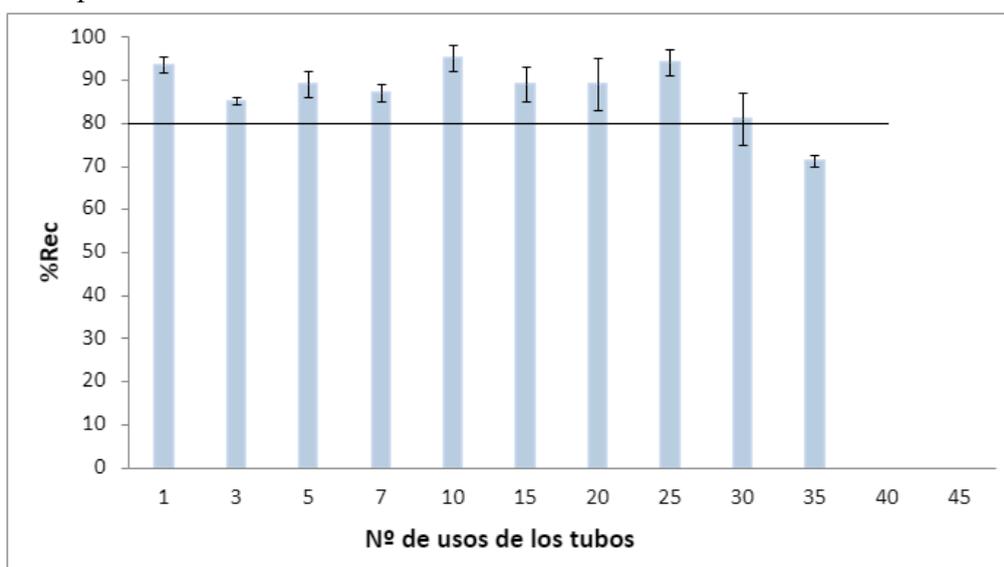


Figura 20. Gráfica del número de usos de los tubos y su correspondiente porcentaje de recuperación. Fuente: propia.

5.6. Características del proceso completo de extracción en tubo-HPLC-FL

Una vez optimizado el proceso de extracción de BPA de disoluciones acuosas, se han establecido las características analíticas del proceso global de análisis extracción-HPLC-FL, que incluye la etapa de extracción de BPA con los tubos de polipropileno modificados con aptámero y el posterior análisis mediante HPLC-FL.

5.6.1. Implicaciones del factor de concentración del proceso de extracción en el análisis

Como hemos visto, la aplicación del proceso de extracción mediante los tubos modificados con aptámero nos permite concentrar las muestras 20 veces antes de su análisis cromatográfico, haciendo el método más sensible; esto es lo que hemos llamado factor de concentración. Y lo que implica es que, el extracto final en metanol que se inyecta en el cromatógrafo es 20 veces más concentrado que la disolución acuosa inicial permitiendo analizar concentraciones 20 veces más pequeñas que si se aplica solo el método HPLC-FL.

5.6.2. Figuras de mérito con el proceso completo de extracción en tubo HPLC-FL

Teniendo en cuenta el factor de concentración de 20, se ha procedido a calcular el intervalo lineal de concentraciones los parámetros de LOD y LOQ que se pueden analizar siguiendo el procedimiento global extracción en tubo-HPLC-FL.

Recta de calibrado: intervalo lineal

Sabiendo que el intervalo lineal de concentración obtenido del procedimiento de análisis cromatográfico es 0,01-0,3 ppm, y considerando el factor de concentración que aporta la extracción, el intervalo lineal de concentraciones de BPA del proceso global extracción-análisis es: 0,0005-0,015 mg/L, es decir, 0,5-15 µg/L.

Límite de detección y de cuantificación

Del mismo modo, el LOD y LOQ del proceso global teniendo en cuenta el factor de concentración que aporta la extracción serán: LOD = 0,10 µg/L y LOQ = 0,34 µg/L.

Repetitividad y reproducibilidad

Para evaluar la precisión del método global extracción-análisis, se han realizado estudios de repetitividad y reproducibilidad aplicando el proceso global a disoluciones acuosas con distintos niveles de concentración.

La repetitividad mide la dispersión de los resultados obtenidos cuando el mismo operador aplica el proceso completo a tres réplicas de una misma disolución, usando el mismo sistema de medición, y bajo exactamente las mismas condiciones. Por otro lado, la reproducibilidad es la dispersión en los resultados obtenidos al aplicar el mismo método de análisis cambiando una condición, en nuestro caso, realizando el análisis en días distintos.

Para el estudio de la repetitividad y reproducibilidad se estudiaron 3 series de extracción, por triplicado, con diferentes concentraciones iniciales de BPA, y se calculó en cada caso el porcentaje de coeficiente de variación de los resultados como la desviación estándar de los resultados (s) entre el valor promedio (\bar{x}) multiplicado por 100 (ecuación 5):

$$\%CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Los resultados de estos estudios se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Repetitividad y reproducibilidad del proceso global de análisis a varios niveles de concentración.

Concentración inicial de BPA (µg/L)	Repetitividad, %CV	Reproducibilidad, %CV
1,5	6,7	4,3
3,75	3,6	8,9
7,5	3,1	3,9

En análisis, se considera que el método aplicado tiene buena repetitividad y reproducibilidad si los valores de los porcentajes de coeficiente de variación son menores del 5%, y aceptable si los valores se encuentran por debajo del 10%, sobre todo cuando se trata de procesos analíticos complejos, con varias etapas y se están evaluando concentraciones muy bajas, como es el caso de nuestro método combinado de extracción-HPLC-FL. En nuestro estudio, todos los %CV son inferiores al 10%, por lo que se considera que el procedimiento completo de análisis de BPA desarrollado tiene una repetitividad y reproducibilidad buenas.

5.7. Aplicación: Análisis de muestras de agua

Finalmente, el método de extracción en tubo-HPLC-FL propuesto en este trabajo se aplicó en el análisis de BPA de dos muestras de agua potable: un agua del grifo y un agua mineral embotellada. Con ello, se quiere comprobar la efectividad del método de extracción desarrollado con muestras reales que contienen, entre otros compuestos, sales en disolución.

Por una parte, se realizó el proceso de extracción a 5,0 mL de muestra de agua, eluyendo con 0,25 mL de metanol en las condiciones óptimas de extracción. El procedimiento se realizó por triplicado. En este caso, no se observó la presencia de BPA en ninguna de las muestras, como se puede observar en la figura 21, en la que se muestran un ejemplo de los cromatogramas obtenidos al inyectar el extracto obtenido tras el proceso de extracción con las dos muestras de agua. En la misma figura, se muestra el cromatograma de un blanco de metanol, también limpio, y de una disolución patrón de 0,03 mg/L de BPA en el que puede identificarse el pico del BPA a un tiempo de retención de 2,2 minutos.

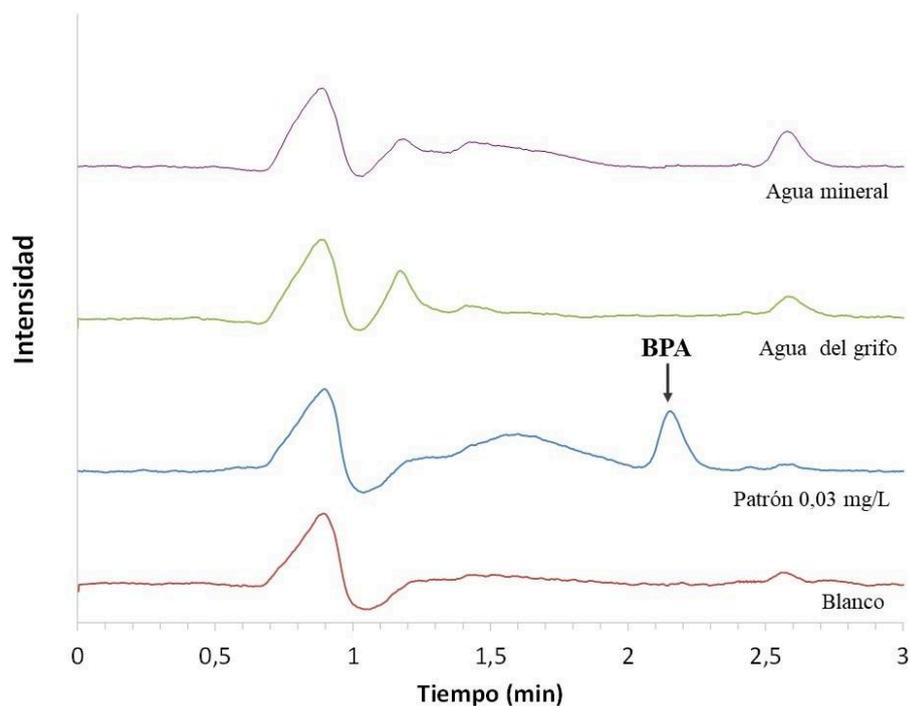


Figura 21. Cromatogramas de un blanco de metanol, un patrón de 0,03 mg/L de BPA en metanol, y de dos muestras de agua sometidas al proceso de extracción en tubo modificado con aptámero: agua del grifo y mineral. Fuente: propia.

Por otro lado, se prepararon por triplicado muestras de agua del grifo y agua mineral aditivadas con BPA, de forma que la concentración inicial fuera de $7,5 \mu\text{g/L}$. Estas muestras se sometieron al proceso de extracción en tubo optimizado y se analizó el contenido de BPA en el extracto (concentración teórica final de BPA de $0,15 \text{ mg/L}$) mediante HPLC-FL. Los porcentajes de recuperación de BPA obtenidos tras la extracción de las muestras aditivadas fueron de $(84 \pm 7)\%$, para la muestra de agua del grifo y de $(95 \pm 7)\%$ para la muestra de agua embotellada, lo que indicaba una buena exactitud del método aplicado. Además, este estudio demostró que la presencia de sales y otros compuestos presentes en la matriz de las muestras de agua analizadas no influye en el proceso de extracción del BPA con el tubo modificado con el aptámero.

En la figura 22 se muestra un ejemplo de cromatograma obtenido con la muestra de agua mineral aditivada, junto a un cromatograma de un patrón en metanol de la misma concentración de BPA que la que debería haber en el extracto si la extracción fuese efectiva ($0,15 \text{ mg/L}$). Como se observa en dicha figura, los picos correspondientes a BPA (a tiempo de retención 2,2 minutos) en el patrón y en la muestra de agua mineral son similares, indicando una extracción cuantitativa.

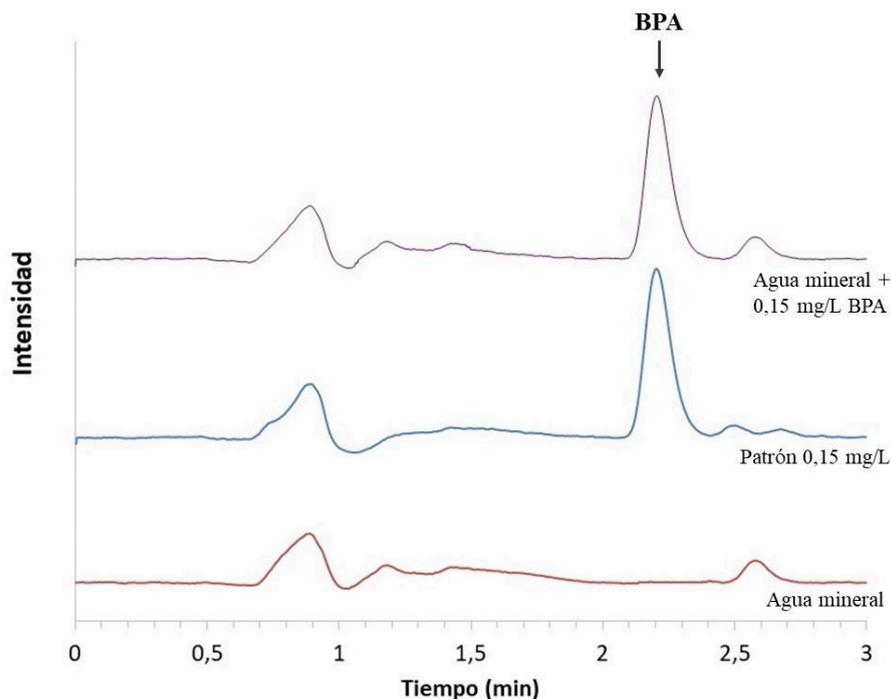


Figura 22. Cromatogramas de un blanco de agua mineral, un patrón de 0,15 mg/L de BPA en metanol y de la muestra de agua mineral aditivada cuya concentración tras la extracción con los tubos debería ser 0,15 mg/L. Fuente: propia.

6. Conclusiones

En este TFG se ha desarrollado un sistema de extracción en tubo para la extracción selectiva de BPA en muestras acuosas. Para ello, se ha modificado la pared interna de la zona cónica de tubos Falcon de polipropileno. En primer lugar, se ha realizado la vinilización de la pared interna de los tubos mediante la reacción en dos pasos con BZF y EGDMA. Posteriormente, se ha enlazado sobre los grupos vinilo de la pared un aptámero específico para el BPA mediante una reacción click. El procedimiento de extracción de BPA en disoluciones acuosas se ha optimizado y aplicado a dos muestras de agua. Una vez realizado este trabajo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Para asegurar una correcta vinilización de la pared interna de los tubos Falcon, es esencial la ausencia total de oxígeno y el mantenimiento de una atmósfera de N₂ en todo el proceso. Esto evita que los radicales libres que se encuentran en la reacción interactúen con el oxígeno del aire.
- La detección de fósforo mediante la técnica de análisis ICP-MS en los tubos sin modificar y en los tubos a los que se ha enlazado un aptámero específico para el BPA ha demostrado que el aptámero se ha unido a la pared interna de los tubos tras la reacción click.
- El estudio de extracción en tubos modificados con aptámero y en tubos de referencia (sin modificar) nos permite concluir que los tubos obtenidos son una alternativa prometedora para la extracción del BPA.

- Las condiciones óptimas para la extracción de BPA de muestras acuosas empleando los tubos extractantes desarrollados son las siguientes:
 - Etapa de carga: volumen de muestra de 5,0 mL y tiempo de agitación de 15 min.
 - Etapa de elución: eluyente: metanol; volumen de MeOH de 0,25 mL y tiempo de agitación de 1 min.
- Los tubos Falcon de polipropileno modificados mediante el enlace de un aptámero específico del BPA, se pueden considerar como soportes adecuados para la extracción selectiva y cuantitativa del BPA. Estos tubos aportan un FC del BPA de 20 veces y pueden reutilizarse hasta 30 veces sin perder eficacia en su funcionamiento.
- El sistema HPLC-FL es totalmente eficiente para poder detectar y cuantificar el BPA. Con el FC que aporta la extracción, el procedimiento global de análisis resulta especialmente sensible, con LOD de 0,10 µg/L y su LOQ es de 0,34 µg/L, lo que permite medir concentraciones inferiores a las establecidas en la legislación para aguas potables.
- El procedimiento completo (extracción-HPLC-FL) presenta buena precisión: repetitividad y reproducibilidad con %CV inferiores al 10%.
- El método desarrollado es aplicable al análisis de muestras de agua. Los porcentajes de recuperación de BPA obtenidos con las muestras aditivadas de agua de grifo y de agua embotellada fueron superiores al 84%, lo que indica la exactitud del método y que el proceso de extracción no se ve influido por la matriz de la muestra.

7. Contribución del TFG a los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS)

Este TFG contribuye con el ODS 2, salud y bienestar y el ODS 6, agua limpia y saneamiento. La lucha por establecer un agua limpia para toda la población, mediante la regulación y control del BPA en las muestras de agua, asegura la calidad del agua y simultáneamente contribuye con la salud y bienestar de las personas. El control y medición de la concentración de BPA en muestras de agua, permite aportar a la población agua de calidad y sin contaminantes, garantizando así un agua potable y segura. Este TFG contribuye con el estudio e investigación del BPA permitiendo así avanzar científicamente, contribuyendo a encontrar un buen método de extracción-análisis para este contaminante. Esto permite establecer las medidas necesarias para localizar, controlar y reducir este compuesto, contribuyendo así a mejorar la salud de la población, disminuyendo las enfermedades y aumentando la tasa y calidad de vida.

8. Bibliografía

[Costa, H. E., & Cairrao, E. \(2024\). Effect of bisphenol A on the neurological system: A review update. *Archives of Toxicology*, 98\(1\), 1-73.](#)

[Czarny-Krzywińska, K., Krawczyk, B., & Szczukocki, D. \(2023\). Bisphenol A and its substitutes in the aquatic environment: Occurrence and toxicity assessment. *Chemosphere*, 315, 137763.](#)

[Deiminiat, B., Rounaghi, G. H., Arbab-Zavar, M. H., & Razavipanah, I. \(2017\). A novel electrochemical aptasensor based on f-MWCNTs/AuNPs nanocomposite for label-free detection of bisphenol A. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 242, 158-166.](#)

[Directiva \(UE\) 2020/2184 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2020 relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano \(versión refundida\).](#)

[El Hani, O., Karrat, A., Digua, K., & Amine, A. \(2023\). Advanced molecularly imprinted polymer-based paper analytical device for selective and sensitive detection of Bisphenol-A in water samples. *Microchemical Journal*, 184, 108157.](#)

[Enciclopedia Significados, <https://www.significados.com/arn/>. Fecha consulta: 23-junio-2024](#)

[Galán Marrero, B. \(2023\). Lixiviación de bisfenol A de microplásticos de policarbonato empleando distintas matrices acuosas de la zona costera \(TFM, Universitat Politècnica de València\).](#)

[García de Marina Bayo, A. & Yusa M. D. J. \(2016\). HPLC instrumental. Editorial Universitat Politècnica de València.](#)

[Ghahremani, M. H., Ghazi-Khansari, M., Farsi, Z., Yazdanfar, N., Jahanbakhsh, M., & Sadighara, P. \(2024\). Bisphenol A in dairy products, amount, potential risks, and the various analytical methods, a systematic review. *Food Chemistry: X*, 101142.](#)

[Honeychurch, K. C. \(2024\). Development of an On-Column Trace Enrichment Method for the Determination of Sub- \$\mu\text{g/L}\$ Bisphenol A in Bottled Water by RP-HPLC with Fluorescent Detection. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2024\(1\), 8258123.](#)

[Iacono M., Connolly D. y Heise A., \(2016\) . Fabrication of a GMA-co-EDMA Monolith in a 2.0 mm i.d. Polypropylene Housing. *Materials* 9, 263; doi:10.3390/ma9040263](#)

[Ibarra, P., & Omar, D. \(2022\). Efecto del aptámero E en la pseudoinfección de Pseudovirus tipo 18 en células 293TT \(Master's thesis, Tesis \(MC\)--Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Departamento de Genética y Biología Molecular\).](#)

[Jia, M., Sha, J., Li, Z., Wang, W., & Zhang, H. \(2020\). High affinity truncated aptamers for ultra-sensitive colorimetric detection of bisphenol A with label-free aptasensor. *Food chemistry*, 317, 126459.](#)

[Jo, M., Ahn, J. Y., Lee, J., Lee, S., Hong, S. W., Yoo, J. W., ... & Kim, S. \(2011\). Development of single-stranded DNA aptamers for specific bisphenol A detection. *Oligonucleotides*, 21\(2\), 85-91.](#)

[Konieczna, A., Rutkowska, A., & Rachon, D. \(2015\). Health risk of exposure to Bisphenol A \(BPA\). *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 66\(1\).](#)

[Liu, Z. H., Xia, Y., Ai, S., & Wang, H. L. \(2024\). Health risks of Bisphenol-A exposure: From Wnt signaling perspective. *Environmental Research*, 118752\).](#)

[Manousi, N., Priovolos, I., Kabir, A., Furton, K. G., Samanidou, V. F., & Anthemidis, A. \(2023\). An integrated automatic lab-in-syringe sol-gel coated foam microextraction platform as a front-end to high performance liquid chromatography for the migration studies of bisphenol A. *Analytica Chimica Acta*, 1268, 341400.](#)

[Ochoa Ortega, P. \(2016\). Estudio comparativo de métodos de tratamiento de muestra para la determinación de bisfenol A en alimentos/bebidas.](#)

[Oliveira, R. V. M., Santos, A. F., Santos, M. D. L., da Costa Cunha, G., & Romao, L. P. C. \(2022\). Magnetic solid-phase extraction of bisphenol A from water samples using nanostructured material based on graphene with few layers and cobalt ferrite. *Microchemical Journal*, 181, 107741.](#)

[Ospina J. D. \(2020\). Aptamers as a novel diagnostic and therapeutic tool and their potential use in parasitology. Los aptámeros como novedosa herramienta diagnóstica y terapéutica y su potencial uso en parasitología. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*, 40\(Supl. 1\), 148–165.](#)

[Pavan M. V. Raja & Andrew R. Barron. High Performance Liquid chromatography. Capítulo 3.2., LibreTexts Español.](#)

[Real Decreto 3/2023, del 10 de enero, por el que se establecen los criterios técnico-sanitarios de la ciudad del agua de consumo, su control y suministro.](#)

[Sánchez Akum, E. A. \(2023\). *Preparación de un sorbente polimérico específico para el análisis de BPA* \(Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València\).](#)

[Soledad-Rodríguez, Beatriz. \(2017\). Empleo de Polímeros de Impronta Molecular como pre-Concentradores de muestras en el análisis químico de trazas. *Revista Tekhné*. 20. 3-22.](#)

[Song, X. L., Lv, H., Wang, D. D., Liao, K. C., Wu, Y. Y., Li, G. M., & Chen, Y. \(2022\). Graphene oxide composite microspheres as a novel dispersive solid-phase extraction adsorbent of bisphenols prior to their quantitation by HPLC–mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 172, 106920.](#)

[Wang, J., Wang, Z., Chen, Z., Yan, P., Shen, J., & Kang, J. \(2023\). Preparation of Molecularly Imprinted Magnetic Stir Bar for Bisphenol A and Its Analysis on Trace Bisphenol A in Actual Water Samples. *Water*, 15\(19\), 3361.](#)

[Wang, Q., Chen, L., Cui, X., Zhang, J., Wang, Y., & Yang, X. \(2023\). Determination of trace bisphenols in milk based on Fe₃O₄@ NH₂-MIL-88 \(Fe\)@ TpPa magnetic solid-phase extraction coupled with HPLC. *Talanta*, 256, 124268.](#)

[Wang, X., Nag, R., Brunton, N. P., Siddique, M. A. B., Harrison, S. M., Monahan, F. J., & Cummins, E. \(2022\). Human health risk assessment of bisphenol A \(BPA\) through meat products. *Environmental Research*, 213, 113734.](#)