

P9

EXPOSICIÓN A AGENTES QUÍMICOS: DETERMINACIÓN DE BISFENOL A EN CABELLO HUMANO

Abril, C.; Martín, J. (jbueno@us.es); Santos, J.L. (jlsantos@us.es); Aparicio, I. (iaparicio@us.es); Alonso, E. (ealonso@us.es).
FQM344: Análisis Químico Industrial y Medioambiental

RESUMEN

El bisfenol A (BPA) es un monómero comúnmente empleado en la fabricación de plásticos, PVC, envases alimentarios, juguetes o papel térmico, siendo los alimentos que han estado en contacto con plásticos la principal vía de exposición humana. El carácter nocivo del BPA, que posee actividad como disruptor endocrino, ha sido objeto de numerosos estudios.

La exposición humana a este contaminante se ha evaluado fundamentalmente mediante su determinación en matrices biológicas como plasma, suero y orina. Actualmente, los estudios de biomonitorización tienden hacia el uso de matrices no invasivas como pueden ser el cabello, uñas, orina o saliva. De entre las citadas matrices, el cabello parece ser una de las matrices de mayor interés ya que posee una gran estabilidad, proporciona información sobre exposición a corto y a largo plazo, desde semanas hasta meses o años en función de la longitud del cabello. Además, su contenido lipídico (2-4%) la convierte en una matriz de interés para la biomonitorización de compuestos lipofílicos.

En este trabajo se presenta el desarrollo de un método analítico para la extracción y determinación de BPA de cabello humano. El tratamiento de la muestra consistió en tres etapas: lavado, hidrólisis y extracción. La determinación se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo. El método se validó en términos de recuperación, precisión, linealidad y límites de detección y cuantificación. Se obtuvo una recuperación >77% y una precisión, expresada como desviación estándar relativa, <4%. Los límites de detección y cuantificación fueron de 1.8 ng g⁻¹ y 6.1 ng g⁻¹, respectivamente. Finalmente, se comprobó la aplicabilidad del método en muestras de cabello de seis individuos de la ciudad de Sevilla, donde se detectó la presencia de BPA en cinco de las seis muestras analizadas.

Palabras claves: *Disruptores endocrinos, bisfenol A, muestras de cabello, método analítico; biomonitorización humana.*

ABSTRACT

Bisphenol A (BPA) is a chemical product common used as a component for the manufacture of plastics, PVC, food packaging, toys or thermal paper, being foods that have been in contact with plastics the main route of human exposure to BPA.

The harmfulness of BPA, which has activity as endocrine disruptor, has been subject of numerous studies.

The human exposure to this pollutant has been evaluated mainly through its determination in biological matrices such as plasma, serum and urine. Human hair seems to be one of the biological matrices of interest; it is a non-invasive matrix besides having great stability. In addition, its lipid content (2-4%) makes it an interesting matrix for biomonitoring lipophilic compounds.

The aim of our study was to develop an analytical method for the extraction and determination of (BPA) in human hair. The treatment of the sample consisted on three stages: washing, hydrolysis and extraction. The analytical determination was carried out by liquid chromatography tandem mass spectrometry. The method was validated in terms of recovery, precision, linearity and limits of detection and quantification. A recovery >77% and precision, expressed as relative standard deviation, <4% was obtained. Limits of detection and quantification were 1.8 ng g⁻¹ and 6.1 ng g⁻¹, respectively. Finally, the applicability of the method was tested in hair samples of six volunteers from Seville city, where BPA was detected in five out of the six samples analyzed.

Keywords: *Endocrine disruptors, bisphenol A, hair samples, analytical method, human biomonitoring.*

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La evaluación del riesgo para los humanos derivado de la presencia de xenobióticos es una de las actividades de mayor importancia en el campo de la salud pública. La biomonitorización en humanos es una herramienta de gran utilidad para la protección de la salud frente a la exposición a sustancias químicas a través de un análisis sistemático de contaminantes en muestras biológicas.

El bisfenol A (*bisphenol A*, BPA) es un producto químico que se utiliza desde hace muchos años como componente para la fabricación de policarbonato y resinas epoxi-fenólicas. Esta sustancia está autorizada actualmente para la fabricación de materiales plásticos mediante el Reglamento (UE) 10/2011 de la Comisión, de 14 de enero de 2011, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. El policarbonato es un tipo de plástico rígido transparente que se usa tanto para hacer envases de alimentos como otros muchos objetos no relacionados con la alimentación con los que día a día estamos en contacto, como pueden ser los recibos de caja registradora fabricados en papel térmico, CDs o DVDs, juguetes, cosméticos, etc. Por su parte, las resinas epoxi-fenólicas se utilizan en recubrimientos y revestimientos de conservas y depósitos de alimentos y bebidas.

El BPA, posee actividad como disruptor endocrino, alterando el comportamiento hormonal de nuestro organismo. La exposición humana a este contaminante se ha evaluado fundamentalmente a través del análisis de plasma, suero y orina. También se ha evaluado la posible exposición de bebés y fetos a través de la biomonitorización de BPA en leche materna y placenta (Dodson et al., 2012).

La biomonitorización humana permite evaluar la absorción diaria de este contaminante en el cuerpo humano, a través del medio ambiente y de la dieta. Actualmente, estos estudios tienden hacia el uso de matrices no invasivas como pueden ser el cabello, uñas, orina o saliva (Michalke et al., 2015; Malarvannan et al., 2013). De entre las citadas matrices, el cabello parece ser una de las matrices de mayor interés ya que posee una gran estabilidad, y proporciona información sobre exposición a corto y a largo plazo, desde semanas hasta meses o años en función de la longitud del cabello. Además, su contenido lipídico (2-4%) la convierte en una matriz de interés para la biomonitorización de compuestos lipofílicos (Barbosa et al., 2013; Król et al., 2013). De hecho, en los últimos años, se han desarrollado diversas metodologías analíticas para determinar contaminantes orgánicos prioritarios (pesticidas, retardantes de llama, drogas ilícitas, o bifenilos policlorados, entre otros) en muestras de cabello mostrando la idoneidad de esta matriz para la evaluación de la exposición a contaminantes orgánicos (Aleksa et al., 2012; Barbosa et al., 2013; Chang et al., 2013; Tzatzarakis et al., 2015).

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método analítico para la determinación del BPA en muestras de cabello humano. El tratamiento de la muestra consistió en tres etapas: lavado, hidrólisis y extracción. Se ensayaron diferentes reactivos en cada una de dichas etapas con el fin de eliminar en lo posible interferencias presentes en la muestra, sin pérdida de BPA, y extraer con el mejor rendimiento posible el BPA presente en las muestras de cabello. Las muestras fueron posteriormente analizadas mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrómetro de masas.

METODOLOGÍA

Toma de muestra

La optimización y la validación de la metodología analítica se ha llevado a cabo con muestras de cabello humano pertenecientes a individuos de la ciudad de Sevilla. Las muestras de cabello se cortaron de la parte posterior de la cabeza, lo más cerca posible al cuero cabelludo con una longitud de aproximadamente 3-5 cm. Todas las muestras de cabello se almacenaron en papel de aluminio, a temperatura ambiente hasta su posterior procesamiento y análisis.

Pretratamiento de la muestra

Una de las dificultades en el análisis del cabello es distinguir entre la cantidad de contaminantes adsorbidos en la superficie externa del cabello y los contaminantes en el interior del mismo que se incorporan desde el cuerpo humano. Por lo tanto, el primer paso en el análisis del cabello es un procedimiento de limpieza para eliminar la contaminación externa junto con compuestos biogénicos, tales como ácidos grasos, esfingolípidos y esteroides, que afectan en gran medida a la sensibilidad de la técnica.

En este trabajo se lleva a cabo un pre-tratamiento efectivo para la eliminación de los posibles interferentes de la matriz mediante lavado de las muestras con agua y una disolución acuosa de dodecilsulfato sódico (SDS) al 0.1% (p/v). Las muestras se someten a agitación con ultrasonidos durante 5 min para mejorar la eficacia del lavado. El cabello lavado, se corta (<3mm) y se deja secar a temperatura ambiente.

Tratamiento de las muestras

Después de la etapa de limpieza, se procede a la desnaturalización o digestión del cabello con un tratamiento ácido, alcalino o simple tratamiento enzimático (Aleska et al., 2012), facilitando la liberación de los contaminantes incorporados. En este estudio se llevó a cabo una digestión ácida, añadiendo 2 mL de una mezcla metanol/ácido acético (HAc) (85:15, v/v) a 38 °C durante 24 horas.

Posteriormente, tiene lugar la extracción sólido-líquido del BPA. Para ello, se añade a la muestra 3 mL de acetonitrilo. Para que la mezcla sea completa y la extracción de los analitos más eficaz, se homogeniza con un agitador vortex-mixer y se mantiene en agitación durante 15 min en un baño de ultrasonido. Se centrifuga a 4000 rpm durante 10 min y se transvasa el líquido sobrenadante a un tubo de ensayo para su posterior evaporación con corriente de nitrógeno hasta sequedad. Finalmente, el extracto se reconstituye con 0.25 mL de metanol y se microfiltra a 0.22 µm para su posterior inyección en el sistema cromatográfico.

Determinación cromatográfica

La determinación del BPA se llevó a cabo empleando un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC) (marca Agilent, serie 1200) equipado con bomba binaria de alta presión, inyector automático y compartimento termostatzado para la columna. Para la separación de los compuestos se optó por una columna de octadecilsilano Zorbax Eclipse XDB C18 (4.6x50 mm, 1.8 µm de tamaño de partículas) y una fase móvil compuesta por una disolución acuosa de acetato amónico (10 mM) y metanol como fase orgánica.

El cromatógrafo líquidos está acoplado a un detector de espectrometría de masas triple cuadrupolo (MS/MS) equipado con una fuente de ionización por electrospray trabajando en modo negativo. Se seleccionan las dos transiciones más abundantes tras la rotura del ión precursor, de acuerdo con la Decisión 2002/657/EC. En la Tabla 1 se muestran los parámetros optimizados empleados en el espectrómetro de masas.

Tabla 1. Parámetros HPLC-MS/MS.

Sigla	Ion Precursor (m/z)	MRM 1 (cuantificación) (m/z)	MRM 2 (confirmación) (m/z)	Fragmentor (V)	Energía de colisión (V)
BPA	227.3	133.0	211.8	126	32
BPA-d ₁₄ (patrón interno)	241.2	141.9	223	113	28

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización de la etapa de lavado

El proceso de lavado sucesivo elimina sustancias endógenas absorbidas por la superficie del cabello (Schramm et al., 2008). Se ensayaron diferentes disolventes (agua Milli-Q, acetona, isopropanol y SDS (0.1 % p/v)) con el fin de eliminar en lo posible interferencias presentes en la muestra, sin pérdida de BPA, y extraer con el mejor rendimiento posible el BPA presente en las muestras de cabello. Cuando se utilizó SDS como líquido de lavado, las muestras de cabello se aclaran con agua de nuevo para eliminar el tensioactivo y evitar problemas en la medida cromatográfica. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 2.

En cada etapa de lavado, las muestras de cabello se sometieron a agitación con ultrasonidos durante 5 min para mejorar la eficacia del lavado. La concentración de BPA en el cabello después del lavado con disolventes orgánicos fue ligeramente menor que cuando se utilizan disoluciones acuosas produciendo una ligera eliminación de la contaminación interna. Por lo tanto, seleccionamos agua y SDS como los disolventes más eficaces para la eliminación de la deposición externa sin eliminación de la contaminación interna.

Tabla 2: Optimización de la etapa de lavado.

Concentración de BPA en cabello (ng g ⁻¹)	
Cabello control	81
Cabello lavado con agua	77
Cabello lavado con acetona	67
Cabello lavado con isopropanol	54
Cabello lavado con SDS (0.1% v/v)	72

Optimización del disolvente de extracción

Entre las propiedades del disolvente usado para la extracción hay que considerar principalmente su capacidad de absorción, su interacción con la matriz de la muestra y la solubilidad del analito en el mismo. Interesa que el disolvente posea una gran

selectividad y, de esta forma, extraiga la mayor cantidad de analito posible y la menor cantidad de interferencias de la matriz. Además, hay que considerar la compatibilidad del disolvente empleado con las siguientes etapas del proceso analítico, generalmente en la extracción en fase sólida, para evitar tediosos procesos de evaporación y/o cambios de disolventes. Para ello, se consideraron cuatro disolventes: acetato de etilo, metanol, acetona y acetonitrilo (Figura 1), todos ellos se utilizaron debido a su idoneidad para extraer sustancias de una amplia gama de polaridad. Las mejores recuperaciones se alcanzaron con acetonitrilo y acetato de etilo, respectivamente. Optamos por acetonitrilo como disolvente más óptimo para la extracción por su menor toxicidad respecto al acetato de etilo.

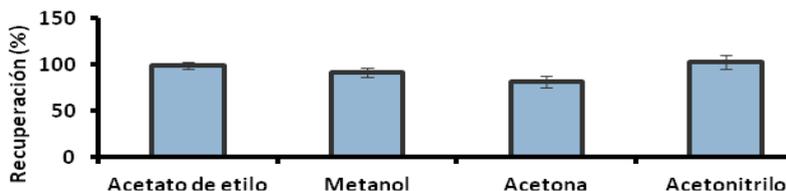


Figura 1: Optimización del disolvente empleado para la extracción del BPA del cabello.

Validación del método

Una vez desarrollada la optimización del método, se procedió a su validación, para constatar que el proceso analítico desarrollado cumple con los requisitos exigidos para el fin que se pretende. En este trabajo, la validación se comprendió de estudios de recuperación, precisión, linealidad y límites de detección y cuantificación. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 3.

Para el estudio de la linealidad, se prepara la curva de calibración del BPA utilizando el método de patrón interno. La linealidad se evaluó por el coeficiente de correlación (r) de la recta de calibrado. Se alcanzó un valor > 0.990 .

Los límites de detección y cuantificación instrumentales se determinaron empleando la relación señal-ruido igual a 3 y 10, respectivamente. Posteriormente, se determinaron los límites de detección y cuantificación del método aplicando a los límites instrumentales la eficacia del método y el factor de concentración conseguido en la extracción en fase sólida. Los límites de detección y cuantificación fueron 1.83 ng g^{-1} y 6.1 ng g^{-1} , respectivamente.

Para la estimación de la exactitud del método, se han empleado ensayos de recuperación sobre muestras dopadas con BPA a dos niveles de concentración (1.25 ng g^{-1} y 0.25 ng g^{-1}). El porcentaje de recuperación (%R), se calculó comparando los valores de las áreas de pico obtenidas en las muestras dopadas, a las que se les restó las áreas de los picos de las muestras sin dopar, con las áreas obtenidas por inyección directa de una disolución de patrón de concentración igual a la esperada de los analitos en los extractos de la muestra, obteniendo así un porcentaje de recuperación $> 77 \%$.

La precisión se estudió a niveles de repetitividad y precisión intermedia. Para la determinación de la repetitividad del método analítico se analizaron por triplicado cabellos dopados con BPA a un nivel de concentración de 1.25 ng g^{-1} . Los valores de desviación estándar relativa (DER) de las áreas de los picos fueron $< 4\%$ en condiciones de repetitividad e $< 15\%$ en condiciones de precisión intermedia, indicando que el método es suficientemente preciso para el nivel de concentración estudiado.

Tabla 3: Resultados de la validación.

Recuperación (%) (n=3)		Precisión (DER (%) (n=3))		LD (ng g^{-1})	LC (ng g^{-1})
Nivel alto (1.25 ng g^{-1})	Nivel bajo (0.25 ng g^{-1})	Repetitividad	Precisión intermedia		
82	77	4	15	1.83	6.10

DER: Desviación estándar relativa; LD: Límite de detección; LC: Límite de cuantificación.

Aplicación de la metodología

Para verificar la idoneidad del método propuesto, se analizaron seis muestras de cabello de diferentes individuos de la ciudad de Sevilla. En la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos. Se detectó la presencia de BPA en cinco de las seis muestras analizadas en un rango de concentración comprendido entre 24 ng g^{-1} y 158 ng g^{-1} .

Se puede suponer que las diferencias entre unas muestras de pelo y otras son debidas e influenciadas por el estilo de vida de cada voluntaria (por ejemplo, los hábitos de alimentación, cuidado personal) y el entorno del hogar (Chojnacka et al., 2006).

Tabla 4: Aplicación de la metodología propuesta en diferentes muestras de cabello humano.

Concentración (ng g^{-1})					
N1	N2	N3	N4	N5	N6
45	65	44	158	<LD	24

<LD: Inferior al límite de detección

CONCLUSIONES

- Se propone el uso del cabello humano como posible bioindicador de la contaminación ambiental a bisfenol A.
- Se ha desarrollado y validado un método analítico para la extracción y determinación de BPA en cabello humano. El tratamiento de la muestra

consistió en tres etapas: lavado de la muestra con agua y una disolución acuosa de dodecilsulfato sódico, digestión con una disolución metanol-ácido acético y posterior extracción sólido-líquido con acetonitrilo en baño de ultrasonidos.

- Se alcanzó una recuperación > 77 % y un límite de detección inferior a 1.83 ng g⁻¹.
- La aplicabilidad del método quedó comprobada tras su aplicación a muestras de seis individuos de la ciudad de Sevilla, obteniendo unos valores de concentración de BPA entre 24 ng g⁻¹ y 158 ng g⁻¹.

BIBLIOGRAFÍA

Aleksa K., Liesivuori J., Koren G. (2012). Hair as a biomarker of polybrominated diethylethers' exposure in infants, children and adults. *Toxicology Letters*. 210. 198–202.

Barbosa J., Faria J., Carvalho F., Pedro M., Queiros O., Moreira R., Dinis-Oliveira R.J. (2013). Hair as an alternative matrix in bioanalysis. *Bioanalysis*. 5. 895–914.

Chang Y.J., Lin K.L., Chang Y.Z. (2013). Determination of di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) metabolites in human hair using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta* 420. 155–159.

Chojnacka K., Górecka H., Górecki H. (2006). The effect of age, sex, smoking habit and hair color on the composition of hair. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 22. 52–57.

Dodson R.E., Nishioka M., Standley L.J., Perovich L.J., Green Brody J., Rudel R.A. (2012) Endocrine disruptors and asthma-associated chemicals in consumer products. *Environmental Health Perspectives*. 120. 935–943.

Król S., Zabiegała B., Namiésnik J. (2013). Human hair as a biomarker of human exposure to persistent organic pollutants (POPs). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 47. 84–98.

Malarvannan G., Isobe T., Covaci A., Prudente M., Tanabe S. (2013). Accumulation of brominated flame retardants and polychlorinated biphenyls in human breast milk and scalp hair from the Philippines: levels, distribution and profiles. *Science of the Total Environment*. 442. 366–379.

Michalke B., Rossbach B., Göen T., Schäferhenrich A., Scherer G. (2015). Saliva as a matrix for human biomonitoring in occupational and environmental medicine. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 88. 1–44.

Schramm K.W. (2008). Hair biomonitoring of organic pollutants. *Chemosphere*. 72. 1103–1111.

Tzatzarakis M.N., Vakonaki E., Kavvalakis M.P., Barmpas M., Kokkinakis E.N., Xenos K., Tsatsakis A.M. (2015). Biomonitoring of bisphenol A in hair of Greek population. *Chemosphere*. 118. 336–341.