



**Universitat de les  
Illes Balears**

Facultad de Ciencias

**Memoria del Trabajo de Fin de Grado**

**Estudio de la bioaccesibilidad y análisis de  
riesgo de contaminantes persistentes en suelos  
reciclados de caucho**

Julia Ruiz Allica

**Grado de Química**

Año académico 2019-20

Trabajo tutelado por Dra. María José Trujillo Rodríguez  
Departamento de Química

Se autoriza a la Universidad a incluir este trabajo en el Repositorio Institucional para su consulta en acceso abierto y difusión en línea, con finalidades exclusivamente académicas y de investigación	Autor		Tutor	
	Sí	No	Sí	No
	X		X	

Palabras clave del trabajo:

*\*Hidrocarburos aromáticos policíclicos, bioaccesibilidad, extracción en fase sólida, cromatografía de alta resolución*



# Índice

1. Introducción .....	4
1.1. Contaminantes persistentes .....	4
1.2. Bioaccesibilidad y métodos de bioaccesibilidad <i>in vitro</i> .....	5
1.3. Métodos de bioaccesibilidad oral aplicados a hidrocarburos aromáticos policíclicos .....	6
1.4. Objetivos .....	7
2. Materiales e instrumentación.....	8
2.1. Reactivos y materiales .....	8
2.2. Instrumentación .....	12
2.3. Muestras .....	12
3. Procedimiento experimental .....	13
3.1. Método UBM de bioaccesibilidad oral <i>in vitro</i> .....	13
3.2. Análisis de la fracción bioaccesible .....	13
3.2.1. Precipitación de proteínas.....	14
3.2.2. Extracción en fase sólida .....	14
3.2.3. Saponificación y extracción en fase sólida .....	15
3.3. Separación HPLC-FD .....	15
4. Resultados y discusión.....	16
4.1. Selección del método de bioaccesibilidad oral <i>in vitro</i> .....	16
4.2. Comparativa de métodos de preparación de muestra.....	16
4.3. Optimización del procedimiento de extracción en fase sólida.....	17
4.3.1. Tipo y cantidad de sorbente .....	17
4.3.2. Porcentaje de metanol en muestras .....	18
4.3.3. Evaluación de la etapa de evaporación tras la SPE.....	19
4.3.4. Evaluación de la etapa de carga de muestra durante la SPE.....	20
4.4. Validación del método .....	21
4.5. Análisis de las muestras .....	23
5. Conclusiones.....	26
6. Anexos .....	27
7. Bibliografía .....	29

## Resumen

Se ha utilizado el método unificado de bioaccesibilidad (UBM), que es un tipo de digestión fisiológica *in vitro*, para la determinación de la bioaccesibilidad de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en muestras de caucho reciclado de diferentes áreas recreativas de España y Portugal. Para el análisis de la fracción bioaccesible obtenida en este ensayo, se han comparado diferentes métodos de preparación de muestra, incluyendo precipitación con acetonitrilo, extracción en fase sólida (SPE) y saponificación con posterior SPE. De entre todos los métodos, la SPE resultó ser la más adecuada para esta aplicación. En condiciones óptimas, este método requiere añadir un 20% de metanol (v/v) a las muestras de jugo gastrointestinal obtenidas tras el procedimiento UBM, 30 mg de resina *Oasis HLB Prime*, extracción de 1 mL de muestra, elución con 1 mL de acetonitrilo:metanol 90:10 (v/v) y posterior concentración por evaporación y reconstitución. El método UBM-SPE en combinación con cromatografía de líquidos de alta resolución y detección fluorescente (HPLC-FD) fue validado y aplicado para el análisis de la bioaccesibilidad de PAHs en las muestras reales estudiadas. Los resultados obtenidos indicaron bajas concentraciones de PAHs en la fracción bioaccesible ( $4.98 \cdot 10^{-5}$  –  $8.82 \cdot 10^{-3}$   $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). En ninguno de los casos, las concentraciones bioaccesibles encontradas superaron la dosis de referencia oral diaria de PAHs (la dosis máxima establecida es de  $3 \cdot 10^{-4}$   $\text{mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{día}^{-1}$  para B[a]P) indicada por el Sistema de Información Integrado de Riesgo de la Agencia de Protección Ambiental de USA (IRIS-EPA).

## Abstract

An *in vitro* physiological digestion, based on the unified bioaccessibility method (UBM) protocol, has been developed for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) bioaccessibility determination in recycled tire crumbs from recreational areas from Spain and Portugal. The bioaccessible fraction analysis needed a sample preparation step. Three different sample preparation methods were compared, including: protein precipitation with acetonitrile, solid phase extraction (SPE) and saponification followed by SPE. The most adequate method for this application was SPE. In optimal conditions, the method required the addition of 20% of methanol (v/v) to the samples after the UBM protocol, 30 mg of *Oasis HLB Prime* sorbent, 1 mL of sample during SPE extraction, 1 mL of acetonitrile:methanol 90:10 (v/v) for the elution, and a posterior concentration by evaporation and reconstitution. The UBM-SPE method in combination with high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FD) was validated and applied for assessing real sample bioaccessibility. The results showed low PAHs concentrations in the bioaccessible fraction ( $4.98 \cdot 10^{-5}$  –  $8.82 \cdot 10^{-3}$   $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). In any case, these PAHs concentrations did not overcome the oral reference dose (the maximum dose established is  $3 \cdot 10^{-4}$   $\text{mg} \cdot \text{kg} \cdot \text{día}^{-1}$  for B[a]P) defined by the Integrated Risk Information of the US Environmental Protection Agency (IRIS-EPA).

# 1. Introducción

## 1.1. Contaminantes persistentes

Los contaminantes orgánicos persistentes (POPs, por sus siglas en inglés) son compuestos de origen natural (generados en erupciones volcánicas o incendios forestales) o antropogénico (derivados de procesos industriales, químicos o de la gran mayoría de procesos de combustión) que se caracterizan por una serie particularidades que se detallan a continuación<sup>(1)</sup>:

- Son persistentes, es decir, presentan una elevada permanencia en el medio ambiente ya que no se degradan con facilidad.
- Son bioacumulables, lo que indica que, al ser solubles en las grasas, pueden acumularse en los tejidos biológicos y aumentar su concentración en los seres vivos, entrando así en la cadena trófica.
- Pueden ser transportados a larga distancia, de manera que pueden hallarse en zonas lejanas a su origen.

Debido a estas características, los POPs suponen un riesgo en la salud. Los niveles de toxicidad de estos contaminantes varían en función del tipo contaminante y algunos pueden alterar el metabolismo, actuar como disruptores endocrinos, afectar el sistema reproductor o ser cancerígenos<sup>(2)</sup>.

Los POPs se diferencian de los contaminantes emergentes, ya que sus efectos toxicológicos se conocen desde los años 60, siendo en la década de los 80 cuando empezaron a prohibirse algunos de ellos a nivel internacional<sup>(1)</sup>. El **Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes** del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA), que fue firmado en mayo de 2001 y entró en vigor el 17 de mayo de 2004, regula el uso de estos contaminantes, así como sus emisiones y liberaciones mediante la reducción o eliminación de su producción y con el objetivo de proteger la salud humana y el medio ambiente<sup>(3, 4)</sup>.

Un grupo de POPs ampliamente estudiados son los **hidrocarburos aromáticos policíclicos** (PAHs por sus siglas en inglés), que son contaminantes presentes de manera natural en el carbón, petróleo y gasolina, aunque también se pueden producir cuando se quema carbón, petróleo, gas, madera o basura y particularmente abundante en el humo del tabaco<sup>(5)</sup>.

Los PAHs resultan nocivos por contacto con la piel, provocando irritación. En caso de inhalación, pueden causar fallos respiratorios o afectar al sistema nervioso. Su ingesta accidental puede llegar a provocar problemas de coagulación y en el sistema inmunitario<sup>(2, 6)</sup>. La toxicidad y peligrosidad de los PAHs en humanos derivan de estudios sobre sus propiedades cancerígenas en ratas y ratones<sup>(7)</sup>. Estos estudios, han llevado a clasificar a algunos PAHs como cancerígenos para los humanos por la Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer (IARC)<sup>(8)</sup>. Así, de los más de cien PAHs existentes, 15 de ellos se encuentran recogidos dentro de los grupos 1 y 2 de la IARC (siendo el grupo 1 el de mayor riesgo para los humanos). Por ello, diversas organizaciones gubernamentales tales como la Agencia de

Protección Ambiental de USA (EPA)<sup>(9)</sup>, la Unión Europea<sup>(10)</sup> y el Comité Científico Europeo de Alimentos (SCF)<sup>(11)</sup> han limitado la presencia de estos contaminantes en agua y alimentos. En lo que respecta a los alimentos, los PAHs pueden encontrarse fácilmente en el tabaco, alimentos ricos en grasas y proteínas, ahumados o cocinados a la brasa, cereales, pescados, etc<sup>(9)</sup>. Sin embargo, también pueden encontrarse en muchas otras matrices, como por ejemplo en parques infantiles, pistas de atletismo y campos de fútbol de césped artificial que usan suelos de caucho reciclado procedentes de neumáticos reciclados<sup>(12)</sup>. Pequeñas partículas de este material pueden ser ingeridas de forma accidental por los usuarios de estas instalaciones. Debido a su elevada presencia en alimentos y otros materiales, se considera que una de las principales vías de exposición del ser humano a los PAHs es la ingesta accidental<sup>(6)</sup>.

Además de la legislación que regula el contenido máximo de PAHs en alimentos<sup>(13, 14, 15)</sup>, existen otros reglamentos que regulan los métodos de muestreo<sup>(16)</sup> y medidas de disminución a la exposición de estos contaminantes. En la evaluación de riesgos para la salud humana por exposición a sustancias tóxicas se utiliza la dosis de referencia oral (DdR), que indica el nivel de exposición diaria que no produce un riesgo apreciable en poblaciones humanas<sup>(17)</sup>.

## 1.2. Bioaccesibilidad y métodos de bioaccesibilidad *in vitro*

Se denomina bioaccesibilidad oral a la fracción ingerida de una sustancia que es soluble en el sistema gastrointestinal humano y por eso, puede ser absorbido por el sistema central (la sangre)<sup>(18)</sup>. No se debe confundir con el concepto de biodisponibilidad, entendido como la fracción de una dosis administrada que realmente llega al sistema sanguíneo desde el tracto gastrointestinal<sup>(18)</sup>.

Mediante métodos de extracción o lixiviación en condiciones fisiológicas *in vitro*, que permiten simular la digestión gastrointestinal humana, se puede determinar de forma realista la fracción bioaccesible de los contaminantes presentes en muestras sólidas debido a una ingestión accidental<sup>(19)</sup>. Estos métodos pueden realizarse de manera dinámica, utilizando un sistema de flujo continuo<sup>(20)</sup>, o en *batch*, realizando la extracción de forma discontinua<sup>(21)</sup>. Los métodos *in vitro* suponen una alternativa interesante a los métodos *in vivo* que utilizan animales y, por lo tanto, son éticamente más adecuados<sup>(19)</sup>.

Existen varios métodos *in vitro* ampliamente utilizados para la determinación de la bioaccesibilidad de metales y PAHs en suelos, si bien pueden adaptarse a otras muestras y analitos<sup>(19)</sup>. Estos métodos tienen en común la preparación de una serie de jugos digestivos biomiméticos con una serie de enzimas, sales y disoluciones tamponadas que, mezcladas en las proporciones adecuadas, simulan de manera realista la digestión humana. En estos estudios, la digestión *in vitro* se realiza en dos etapas: digestión gástrica y gastrointestinal. De éstas dos, la etapa más interesante es la gastrointestinal dado que simula la región final del intestino donde tiene lugar la absorción de la mayor parte de nutrientes, gracias a la gran vascularización del intestino delgado<sup>(19)</sup>.

Pese a que no existe ningún método estándar de bioaccesibilidad oral, el protocolo más aceptado es el método de bioaccesibilidad oral (UBM)<sup>(22)</sup> desarrollado por el Grupo de investigación de Bioaccesibilidad de Europa (BARGE)<sup>(23)</sup>. El método UBM simula la ingestión

accidental de suelo contaminado por metales pesados de un sujeto con intestino pequeño (niño) en ayunas<sup>(22)</sup>. Se trata de un método *in vitro* que reproduce el sistema digestivo humano mediante el uso de cuatro jugos digestivos sintéticos (saliva, jugo gástrico, jugo duodenal y bilis). Estos jugos deben prepararse utilizando las sales, enzimas y disoluciones tamponadas a las temperaturas y condiciones de pH similares a las del organismo humano. Cada digestión *in vitro* consiste en la mezcla de la muestra con saliva y jugo gástrico durante 1 h para simular la digestión gástrica y, posteriormente, con los cuatro jugos digestivos durante 4 h extra para simular la digestión gastrointestinal. Cuando el método se realiza en *batch*, se utiliza centrifugación para separar la fracción de analito soluble en los jugos digestivos (fracción bioaccesible, el sobrenadante tras la centrifugación) de la fracción de analito que quedó en la muestra original o que se asoció a las proteínas presentes en los jugos (fracción no bioaccesible, el pellet tras la centrifugación)<sup>(22)</sup>.

Existen otros métodos que simulan la digestión humana en condiciones de ingesta de alimento, tales como el método Versantvoort<sup>(24)</sup> y el método de simulación humana de ingestión orgánica (FOREsHT)<sup>(18)</sup> que añade una etapa de saponificación final de las grasas.

### 1.3. Métodos de bioaccesibilidad oral aplicados a hidrocarburos aromáticos policíclicos

Previamente a la realización de este trabajo, se han publicado diversos estudios que analizaron la bioaccesibilidad de PAHs en diferentes matrices, si bien el método UBM no se ha aplicado antes para muestras de caucho reciclado. Entre ellos, se pueden encontrar publicaciones referentes a la concentración, bioaccesibilidad y disposición espacial de PAHs en suelos<sup>(21, 25)</sup>. En uno de estos estudios, el contenido total de PAHs en suelos de USA fueron analizados mediante extracción asistida por ultrasonidos (UAE) con una mezcla de acetona:hexano (1:1, v/v), seguida de centrifugación, extracción líquido-líquido (LLE) del sobrenadante con *n*-hexanol y analizado por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (CG-MS)<sup>(25)</sup>. Para el análisis de la fracción bioaccesible, se realizó una extracción sólido-líquido (LSE) con *n*-butanol, ya que estudios previos han correlacionado la fracción extractable en butanol con la bioacumulable en lombrices de tierra. La fase orgánica se filtró y fue directamente analizada por GC-MS<sup>(25)</sup>. Otro estudio publicado en 2019, analizó ocho muestras de suelo de diferentes lugares de Australia, algunas de ellas fortificadas<sup>(21)</sup>. Los analitos se extrajeron mediante UAE, y la fase orgánica conteniendo los analitos extraídos bien se analizó directamente tras filtración utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución con detección fluorescente (HPLC-FD), o bien se trató utilizando extracción en fase sólida (SPE), seguido de análisis por CG-MS<sup>(21)</sup>.

Debido al aumento de casos de linfomas y leucemias diagnosticados en usuarios habituales de campos de fútbol de césped artificial, son numerosas las publicaciones relacionadas con la presencia de compuestos inorgánicos y orgánicos potencialmente cancerígenos. Un estudio examinó diferentes métodos de extracción de los múltiples contaminantes presentes en partículas comerciales de neumáticos reciclados<sup>(26)</sup>. Se estudiaron distintos métodos de extracción, tales como extracción con distintos disolventes, con agua a distintos pH sin agitación, con agitación, simulando fluidos corporales, con ultrasonidos (UAE) y microextracción en fase sólida (SPME), etc. Además de la determinación de la bioaccesibilidad

de PAHs, el método se aplicó para otros contaminantes orgánicos (ftalatos, compuestos orgánicos volátiles, antioxidantes, etc.) e inorgánicos (metales como Pb, Zn, Cd, Cr, Sn), todo ello en combinación de distintos métodos de análisis: espectroscopía de absorción atómica (AAS), plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría de emisión óptica (ICP-OES), plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría de masas (ICP-MS), HPLC-FD, y GC-MS<sup>(26)</sup>. Como ya se ha comentado con anterioridad, el caucho reciclado no solo se usa en campos de fútbol, si no que también es habitual encontrarlo en pistas de atletismo. En un estudio se realizaron lixiviados de cuatro pistas de atletismo a elevadas temperaturas, analizándose el potencial mutagénico en bacterias<sup>(27)</sup>. Siguiendo esta misma línea de estudio, se realizó un estudio computacional toxicológico prediciendo el potencial carcinogénico en base a los compuestos cancerígenos inorgánicos y orgánicos presentes en las muestras de goma de neumático<sup>(28)</sup>.

Otros estudios han examinado distintos escenarios de exposición (vía oral, ruta dérmica o inhalación) de diversas sustancias, entre ellas PAHs<sup>(29)</sup>. Los resultados de este trabajo indicaron que la exposición oral, estudiada durante diez meses, de la suma de ocho PAHs varió entre  $7.6 \cdot 10^{-4}$  –  $1.99 \cdot 10^{-3}$   $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  de peso corporal, concentraciones que superaban ligeramente el nivel de riesgo despreciable definido en Países Bajos<sup>(29)</sup>.

#### 1.4. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es **desarrollar un método de digestión gastrointestinal *in vitro* para la determinación de la bioaccesibilidad de PAHs en suelos de caucho reciclados**. Con la finalidad de alcanzar este propósito se han planteado tres objetivos parciales:

- Seleccionar un método de bioaccesibilidad *in vitro* para simular la digestión gastrointestinal humana.
- Desarrollar y optimizar un método de preparación de la muestra adecuado para el análisis de la fracción bioaccesible obtenida tras el ensayo *in vitro*.
- Validar el método desarrollado y aplicarlo para la determinación de la bioaccesibilidad de PAHs en muestras reales de caucho reciclado.



## 2. Materiales e instrumentación

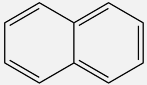
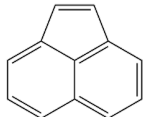
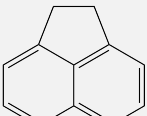
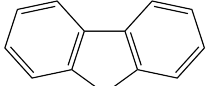
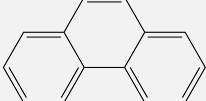
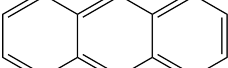
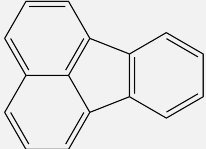
### 2.1. Reactivos y materiales

El mix comercial de los analitos estudiados, referencia CRM4794, comprado en Sigma-Aldrich (St. Louis MO, USA) calidad TraceCERT®, es una solución multicomponente conteniendo 16 PAHs de la EPA clasificados en la **Tabla 1**, con una concentración para cada analito de  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en acetonitrilo. A partir de esta solución, se preparó una disolución intermedia de  $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en metanol que fue utilizada para la preparación por dilución las disoluciones de trabajo ( $0.5\text{--}120 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). También, se realizaron distintas pruebas con uno (B[a]P) y cinco analitos (ANTH, FLA, PYR, B[a]P y B[ghi]P). Estos cinco PAHs fueron adquiridos en Sigma-Aldrich, con pureza mayor al 98%. A partir de ellos, se prepararon diferentes disoluciones stock individuales: una disolución de  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en acetona en el caso de B[a]P,  $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de ANTH en metanol,  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de FLA en metanol,  $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de PYR en metanol y  $230 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de B[ghi]P en acetonitrilo. Estas disoluciones stock fueron utilizadas para preparar una única disolución intermedia en metanol conteniendo  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de B[a]P y  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  del resto de PAHs. Las disoluciones de trabajo en jugo gastrointestinal o agua ultrapura se prepararon a partir de las correspondientes diluciones de las disoluciones intermedias.

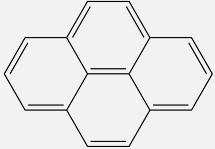
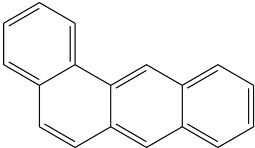
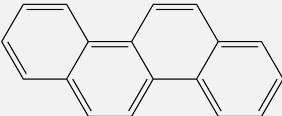
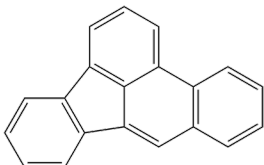
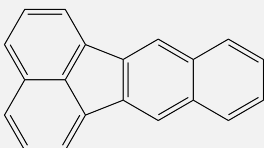
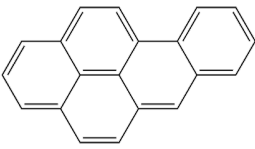
Los disolventes utilizados tanto para la preparación de las disoluciones como para la optimización y validación del método, así como para la fase móvil de la cromatografía, fueron acetona, metanol y acetonitrilo (calidad HPLC o superior), obtenidos en Fisher Scientific. Las experiencias de SPE se realizaron en un sistema *Visiprep* (Sigma-Aldrich) utilizando cartuchos de polipropileno de 1 mL con fritada de polietileno de  $20 \text{ }\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich). Se usaron dos tipos de sorbentes de extracción: *Oasis HLB* y *Oasis HLB Prime* (Waters, Kent, Reino Unido). La resina *Oasis HLB* es de un polímero orgánico de fase reversa, con una alta retención de analitos ácidos, básicos y neutros por el doble carácter de su estructura lipofílica-hidrofílica, que además presenta varias ventajas frente a las resinas de sílice ya que presenta un gran intervalo de aplicación a distintos pH (0 - 14). El sorbente *Oasis HLB Prime* es especialmente indicado para matrices complejas con sales, proteínas y fosfolípidos. Todas las muestras y patrones se filtraron con una jeringa de vidrio de 5 mL y un filtro de difluoruro de polivinilideno (PVDF) de  $0.45 \text{ }\mu\text{m}$  de Scharlab (Barcelona, España).

Para la preparación de los jugos digestivos, cloruro cálcico dihidratado, dihidrógeno fosfato potásico, sulfato sódico, dihidrógeno fosfato sódico, urea ( $\geq 98\%$ ), D-(+)-glucosa ( $\geq 99.5\%$ ), ácido D-glucurónico ( $\geq 98\%$ ), D-(+)-glucosamina HCl ( $\geq 99\%$ ),  $\alpha$ -amilasa de *Bacillus sp* ( $1594 \text{ units}\cdot\text{mg}^{-1}$ ), ácido úrico ( $\geq 99\%$ ), mucina de estómago porcino (tipo II), albúmina de suero bovino ( $\geq 98\%$ ), lipasa de pancreas porcino (tipo II,  $100\text{--}500 \text{ unidades}\cdot\text{mg}^{-1}$  de proteína usando aceite de oliva - 30 min de incubación,  $30\text{--}90 \text{ unidades}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteína- usando triacetina), y bilis bovina fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. Ácido clorhídrico, cloruro potásico, tiocianato potásico cloruro sódico, hidrogeno carbonato de sodio, hidróxido sódico y cloruro amónico, fueron obtenidos en Scharlau. Cloruro magnésico, pepsina de mucosa gástrica porcina ( $0.7 \text{ FIP unidades}\cdot\text{mg}^{-1}$ , pH 4.0-5.0,  $35000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ), y pancreatina ( $350 \text{ FIP unidades}\cdot\text{g}^{-1}$  proteasa,  $6000 \text{ FIP unidades}\cdot\text{g}^{-1}$  lipasa,  $7500 \text{ FIP unidades}\cdot\text{g}^{-1}$  amilasa) fueron obtenidas en Merck (Darmstadt, Germany).

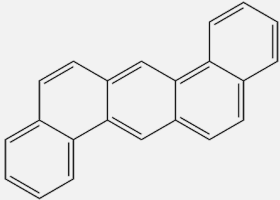
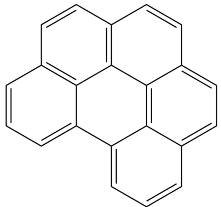
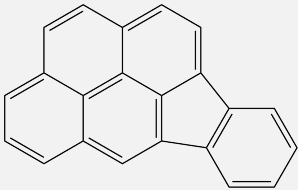
**Tabla 1-1.** Listado de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos estudiados por orden de elución tras la separación cromatográfica.

Nombre del compuesto	Abrev. <sup>a</sup>	Estructura	N <sup>o</sup> CAS <sup>b</sup>	PM <sup>c</sup> (g·mol <sup>-1</sup> )	PF <sup>d</sup> (°C)	Solubilidad <sup>e</sup> (mg·L <sup>-1</sup> )	Log K <sub>ow</sub> <sup>f</sup>	DdR <sup>g</sup>
<i>Naphtalene</i>	<b>NAP</b>		91-20-3	128.17	79.5-81	31	3.361	2·10 <sup>-2</sup>
<i>Acenaphthylene</i>	<b>ACY</b>		208-96-8	152.19	78-82	16	3.266	NE <sup>h</sup>
<i>Acenaphthene</i>	<b>ACE</b>		83-32-9	154.21	90-94	3.9	3.728	6·10 <sup>-2</sup>
<i>Fluorene</i>	<b>FLU</b>		86-73-7	166.22	111-114	1.7	4.323	4·10 <sup>-2</sup>
<i>Phenantrene</i>	<b>PHE</b>		85-01-8	178.23	98-100	1.2	4.545	NE
<i>Anthracene</i>	<b>ANTH</b>		120-12-7	178.23	210-215	0.043	4.545	3·10 <sup>-1</sup>
<i>Fluoranthene</i>	<b>FLA</b>		206-44-0	202.25	105-110	0.25	5.004	4·10 <sup>-2</sup>

**Tabla 1-2.** Continuación de la Tabla 1-1, listado de Hidrocarburos Aromáticos.

Nombre del compuesto	Abrev. <sup>a</sup>	Estructura	N <sup>o</sup> CAS <sup>b</sup>	PM <sup>c</sup> (g·mol <sup>-1</sup> )	PF <sup>d</sup> (°C)	Solubilidad <sup>e</sup> (mg·L <sup>-1</sup> )	Log K <sub>ow</sub> <sup>f</sup>	DdR <sup>g</sup>
<i>Pyrene</i>	<b>PYR</b>		129-00-0	202.25	145-148	0.14	5.004	3·10 <sup>-2</sup>
<i>Benz[a]anthracene</i>	<b>B[a]A</b>		56-55-3	228.29	157-159	9.4·10 <sup>-3</sup>	5.729	NE
<i>Chrysene</i>	<b>CHR</b>		218-01-9	228.29	252-254	2.0·10 <sup>-3</sup>	5.729	NE
<i>Benz[b]fluoranthene</i>	<b>B[b]F</b>		205-99-2	252.31	163.165	1.5·10 <sup>-3</sup>	6.188	NE
<i>Benz[k]fluoranthene</i>	<b>B[k]F</b>		207-08-9	252.31	215-217	8.1·10 <sup>-4</sup>	6.188	NE
<i>Benz[a]pyrene</i>	<b>B[a]P</b>		50-32-8	252.31	177-180	1.6·10 <sup>-3</sup>	6.188	3·10 <sup>-4</sup>

**Tabla 1-3.** Continuación de la Tabla 1-1, listado de Hidrocarburos Aromáticos.

Nombre del compuesto	Abrev. <sup>a</sup>	Estructura	N°CAS <sup>b</sup>	PM <sup>c</sup> (g·mol <sup>-1</sup> )	PF <sup>d</sup> (°C)	Solubilidad <sup>e</sup> (mg·L <sup>-1</sup> )	Log K <sub>ow</sub> <sup>f</sup>	DdR <sup>g</sup>
<i>Dibenz[a,h]anthracene</i>	<b>diB[ah]A</b>		53-70-3	278.35	262-265	2.5·10 <sup>-3</sup>	6.913	NE
<i>Benzo[ghi]perylene</i>	<b>B[ghi]P</b>		191-24-2	276.33	277-279	2.6·10 <sup>-3</sup>	6.646	NE
<i>Indeno[1,2,3-cd]pyrene</i>	<b>IND</b>		193-39-5	276.33	163.6	1.9·10 <sup>-4</sup>	6.646	NE

<sup>a</sup> Abreviatura

<sup>b</sup> Número de registro CAS (Chemical Abstract Service), identificación numérica del compuesto químico

<sup>c</sup> Peso Molecular

<sup>d</sup> Punto de fusión

<sup>e</sup> Solubilidad en agua a 25 °C, fuente: <http://www.t3db.ca/>

<sup>f</sup> Logaritmo del coeficiente de partición octanol/agua, fuente: SciFinder Scholar (American Chemical Society 2020)

<sup>g</sup> Dosis de Referencial Oral, dosis de referencia para exposición oral (mg·kg·día<sup>-1</sup>), fuente: EPA. [https://cfpub.epa.gov/ncea/iris\\_drafts/AtoZ.cfm](https://cfpub.epa.gov/ncea/iris_drafts/AtoZ.cfm)

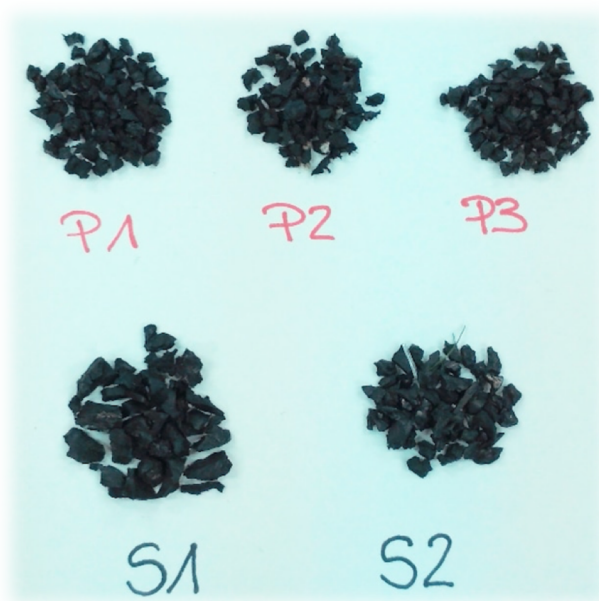
<sup>h</sup> No evaluado por el programa IRIS (Integrated Risk Information System)

## 2.2. Instrumentación

Se empleó un HPLC Jasco equipado con una bomba cuaternaria de alta presión PU-4180, autosampler AS-4050, un detector fluorescente FP-4025, la interfaz LC-NetII/ACD, un termostatizador de columna Gecko 2000 y software ChromNav 2.01.06. Al sistema se conectó una columna Pursuit 5.PAH Varian (250 mm L × 4.6 mm ID × 5 µm tamaño de partícula) equipada con una pre-columna ChromSep C18 (10 mm L × 4.6 mm ID × 5 µm tamaño de partícula).

## 2.3. Muestras

Las muestras de caucho examinadas para este trabajo fueron tomadas en cinco campos de fútbol de césped artificial distinto del noroeste de España (Santiago de Compostela) y norte de Portugal, todos ellos construidos entre 2009 y 2011, aunque pudieron sufrir renovación debido al desgaste provocado por su uso. Los PAHs presentes en el caucho estudiado fueron determinados por el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Soluciones Analíticas (LIDSA)<sup>(30)</sup> mediante extracción asistida por ultrasonidos en combinación de cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas (UAE-GC-MS). La **Figura 1** muestra una fotografía de los cauchos considerados y su abreviatura.



**Figura 1.** Fotografía de las cinco muestras de caucho reciclado. La letra indica el país de procedencia siendo S de España y P de Portugal.

### 3. Procedimiento experimental

#### 3.1. Método UBM de bioaccesibilidad oral *in vitro*

Se prepararon cuatro jugos digestivos siguiendo el método UBM (saliva, jugo gástrico, duodenal y biliar)<sup>(22)</sup>. En la **Tabla A** del *Anexo*, se detallan la composición de cada jugo. Cada jugo estaba constituido por una mezcla de sales inorgánicas y compuestos orgánicos en disolución acuosa, además de una serie de sales y enzimas características para cada uno de ellos. Siguiendo el método, una vez preparada la disolución de cada jugo digestivo, se aplicó agitación magnética durante 3 h y se dejaron reposar toda la noche a temperatura ambiente. A la mañana siguiente, se ajustó el pH correspondiente a cada uno de los jugos (saliva  $6.5 \pm 0.5$ , gástrico  $1.1 \pm 0.1$ , duodenal  $7.4 \pm 0.2$  y biliar  $8.0 \pm 0.2$ ) y se activaron durante al menos 1 h en la incubadora a  $37 \pm 2$  °C.

Para cada ensayo UBM, se añadió 0.1 g de muestra a un tubo de centrífuga de vidrio de 15 mL (Fisher Scientific). El ensayo de bioaccesibilidad *in vitro* se realiza en dos etapas: gástrica y gastrointestinal. Para la etapa gástrica, la muestra se mezcló con 1.5 mL de saliva y 2.3 mL de jugo gástrico, el pH se ajustó a  $1.2 \pm 0.1$  y la mezcla final se agitó usando rotación *end-over-end* durante 1 h a  $37 \pm 2$  °C. Tras esto, se comprobó que el pH de la muestra se encontraba comprendido entre 1.2 - 1.5 y se procedió con la etapa gastrointestinal. Para ello, se añadió 4.6 mL de jugo duodenal y 1.5 mL de bilis, se ajustó el pH a  $6.3 \pm 0.5$ , y la mezcla se agitó usando rotación *end-over-end* durante 4 h a  $37 \pm 2$  °C. Finalmente, se anotó el pH final, y la muestra se centrifugó a 1479 fcr durante 30 min.

Además del caucho reciclado, se realizaron otros tipos de ensayos: blancos (usando el test UBM sin ningún tipo de muestra), jugos fortificados con  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de cada uno de los PAHs estudiados y muestras de caucho reciclado fortificadas también con  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Para el análisis de fracción bioaccesible de cada tipo de ensayo, se separó el sobrenadante de la prueba UBM centrifugado y se añadió un 20% (v/v) de metanol para facilitar la solubilidad de los analitos y evitar que se adhieran a las paredes del tubo de vidrio antes de la SPE. En el pellet tras la centrifugación queda el caucho, las enzimas o proteínas no solubles y la fracción de PAHs asociada a ellos, que se considera no bioaccesible.

#### 3.2. Análisis de la fracción bioaccesible

Se estudiaron tres técnicas diferentes de tratamiento de muestra previo al análisis de los extractos gastrointestinales por HPLC: precipitación de proteínas con acetonitrilo, extracción en fase sólida (SPE) y saponificación de grasas con una posterior extracción SPE<sup>(31)</sup>. Para esta comparativa, se usaron cinco analitos: ANTH, FLA, PYR, B[a]P, B[ghi]P.

Cabe destacar que para elegir el mejor método de preparación de muestra no se realizó el método UBM completo con la digestión total, sino que se fortificaron los jugos gastrointestinales con  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de los analitos mencionados después de haberlos centrifugado

y añadido el 20% (v/v) de metanol. Para cada estudio se realizaron tres réplicas en agua y tres en jugo, para evaluar además el efecto matriz.

### 3.2.1. Precipitación de proteínas

Este método de preparación de muestra consiste en hacer precipitar las proteínas presentes en la matriz gastrointestinal añadiendo 1 mL de acetonitrilo sobre 1 mL de muestra (sobrenadante tras la centrifugación). La muestra se congeló durante toda la noche y al día siguiente se observó la formación de un precipitado de proteínas y sales que se filtró a temperatura ambiente usando una jeringa de vidrio y un filtro de PVDF 0.45  $\mu\text{m}$ .

Finalmente, la muestra filtrada se evaporó hasta sequedad, se reconstituyó añadiendo 400  $\mu\text{L}$  de metanol y se inyectó en el HPLC.

### 3.2.2. Extracción en fase sólida

El procedimiento de SPE se realizó en un sistema *Visiprep* conectado a vacío (10 mm Hg) utilizando cartuchos de polipropileno de 1 mL con fritas de polietileno de 20  $\mu\text{m}$  (Sigma-Aldrich). Para cada extracción SPE, se dispuso de 30 o 100 mg de resina *Oasis HLB Prime*, diseñada para la eliminación de lípidos y proteínas, en un cartucho. El procedimiento para realizar la extracción consiste en una serie de pasos de acondicionamiento de la columna, carga, limpieza y elución de la muestra. La **Figura 2** muestra una fotografía del sistema de trabajo. Durante el acondicionamiento, se hizo pasar a través de cada cartucho 1 mL de una disolución de acetonitrilo:metanol 90:10 (v/v), seguido de 1 mL de agua ultrapura y se dejó secar. A continuación, se cargó 1 mL de muestra (jugo/agua con 20% (v/v) de metanol y 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de los 5 PAHs). El siguiente paso fue limpiar la muestra con 1 mL de disolución acuosa de metanol al 5% (v/v) y se secó el cartucho dejando pasar el aire. Finalmente, la muestra se eluyó con 1 mL de acetonitrilo:metanol 90:10 (v/v), recogiénolo en un vial de cromatografía.



**Figura 2.** Fotografía tomada del Visiprep utilizado para las SPE.

Las experiencias en las que se usa *Oasis HLB*, siguen los mismos pasos antes citados pero cambiando el disolvente de acondicionamiento y elución de la muestra por metanol puro, en lugar de una disolución acetonitrilo:metanol 90:10 (v/v).

Finalmente, las muestras se evaporaron y se reconstituyeron con 400  $\mu\text{L}$  de MeOH, seguido de inyección en el HPLC.

### *3.2.3. Saponificación y extracción en fase sólida*

Siguiendo el método FOREsHT<sup>(18)</sup>, a 1 mL de jugo gastrointestinal centrifugado se le añadió 3 mL de una disolución 5.6 M de KOH en metanol. La mezcla se calentó durante 1 h a 100 °C. Una vez los viales recuperaron la temperatura ambiente, se diluyeron añadiéndoles 6 mL de agua ultrapura.

A continuación, la muestra resultante se sometió al protocolo de SPE utilizando 30 mg de Oasis HLB Prime. El protocolo seguido fue el mismo que el descrito en la sección 3.2.2., pero en este caso acondicionando con 2 mL de disolvente en lugar de 1 mL, cargando en el cartucho de SPE los 10 mL de muestra gastrointestinal saponificada diluida y eluyendo la muestra con 1 mL de acetonitrilo:metanol 90:10 (v/v).

## **3.3. Separación HPLC-FD**

Las separaciones se realizaron utilizando una fase móvil binaria acetonitrilo (A): agua (B) a un flujo constante de 1 mL·min<sup>-1</sup> y 10  $\mu\text{L}$  de volumen de inyección. La columna analítica se mantuvo a 31 °C. Se realizaron tres tipos de separaciones distintas de acuerdo con el tipo de análisis.

Para la separación de B[a]P, se emplearon condiciones isocráticas (95 %, v/v, B) durante 5 min, y detección a 296/426 nm (longitud de onda de excitación/ emisión).

Para la separación del grupo de 5 PAHs empleado durante la optimización de la SPE, se empleó el siguiente programa de elución: de 95 a 100 % de B en 2 min, luego mantener 100 % de B durante 16 min. Para la detección por fluorescencia, se utilizó el siguiente programa: inicial 270/440 nm, cambio a 260/420 nm a los 5 min del cromatograma y a 290/430 nm a los 10 min.

Finalmente, para la separación de los 16 PAHs se utilizó el siguiente gradiente de elución: de 50 a 70 % de B en 13 min, luego incremento hasta 100% en 2 min y mantener 100 % de B durante 17 min. Para la detección, se emplearon las siguientes condiciones: inicialmente 275/230 nm, cambio a 260/420 nm a los 18.2 min del cromatograma, a 270/440 nm a los 19.0 min, a 260/420 nm a los 20.9, a 290/430 nm a los 23.0 min y a 250/500 nm a los 31.8 min.



## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Selección del método de bioaccesibilidad oral *in vitro*

El ensayo de bioaccesibilidad gastrointestinal *in vitro* elegido fue el método UBM ya que en base a la bibliografía es el método más extendido y estandarizado<sup>(31, 32)</sup>. Además, el método UBM simula la ingestión accidental de un ser humano con el intestino pequeño, como el de un niño, principales usuarios de los campos de fútbol y parques infantiles donde se pueden encontrar este tipo de caucho reciclado. Asimismo, el método no considera la hidrólisis o degradación de grasas y materia orgánica ya que las muestras son de plástico.

### 4.2. Comparativa de métodos de preparación de muestra

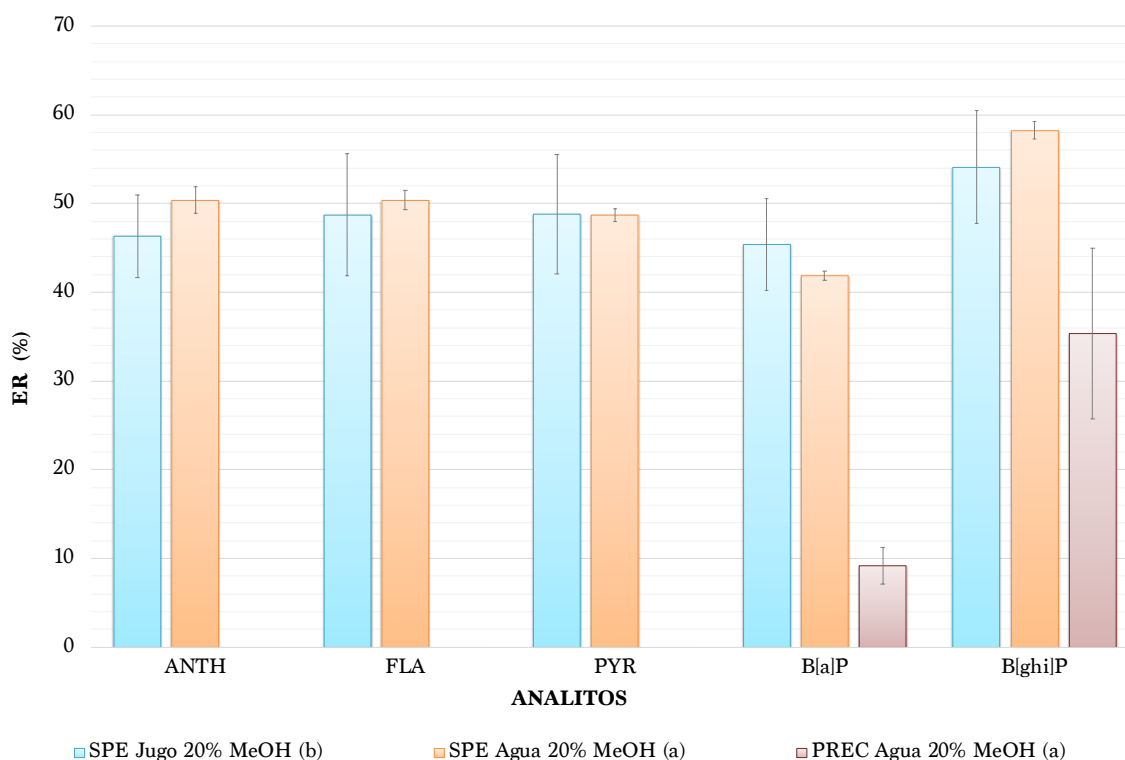
Se compararon tres métodos de preparación de muestra distintos para el análisis de la fracción bioaccesible obtenida tras el ensayo UBM: precipitación de proteínas, SPE y saponificación seguido de SPE. Estos métodos se han utilizado previamente como etapa de preparación de muestra tras el método UBM<sup>(31)</sup>. Estos estudios se realizaron con jugos gastrointestinales centrifugados fortificados con los analitos. Se comparó la eficacia de extracción (ER) obtenida con cada método, que fue calculada según la siguiente ecuación:

$$ER(\%) = \frac{C_f}{C_i} \cdot 100$$

donde  $C_f$  es la concentración observada obtenida tras aplicar cada método de preparación de muestra (obtenida utilizando calibración externa inyectando estándares en metanol en el HPLC-FD), y  $C_i$  es la concentración inicial fortificada.

Inicialmente, las pruebas se hicieron con un único analito, el B[a]P, tomado como referencia de PAHs siguiendo las recomendaciones de la EPA<sup>(7, 33)</sup>. Los resultados demostraron que el método de saponificación era el menos efectivo, aportando los ER más bajos. La etapa de saponificación extra se ha añadido en algunos ensayos de digestión *in vitro* con objeto de favorecer la digestión de las grasas de la muestra ingerida<sup>(18)</sup>. En este caso, tanto los jugos centrifugados, preparados de acuerdo con el protocolo UBM<sup>(22)</sup>, como la muestra a ingerir (caucho reciclado), no son ricos en grasas. Por estos motivos, el método de saponificación fue descartado. A fin de conseguir unos resultados más representativos del conjunto de analitos estudiados, el resto de los métodos fueron comparados utilizando jugos gastrointestinales centrifugados fortificados con el grupo de 5 PAHs indicado en la sección 3.2.

La **Figura 3** muestra los resultados obtenidos. En la gráfica también se indican los resultados obtenidos al aplicar los métodos a una disolución acuosa de los analitos. A todas las muestras se añadió un 20% (v/v) de metanol para evitar la adsorción de PAHs en el tubo de vidrio donde se preparó la muestra<sup>(34)</sup>. Los resultados obtenidos con precipitación con acetonitrilo en jugo no se representan en la gráfica ya que, debido al alto contenido de proteínas solubles, las disoluciones resultantes no pudieron ser inyectadas en el HPLC incluso después de la filtración. Como se puede comprobar en la **Figura 3**, los mejores resultados se obtuvieron con el método de SPE tanto en jugo como en agua, sin que la ER empeore al analizar los jugos fortificados. Por lo tanto, el método elegido como etapa de preparación de muestra fue la SPE.



**Figura 3.** Comparación de la eficacia de extracción obtenida utilizando dos métodos de preparación de muestras distintas (**SPE** utilizando *Oasis Prime* y precipitación de proteínas, o **PREC**) utilizando (a) disoluciones acuosas de un grupo de 5 PAHs, o (b) jugo gastrointestinal centrifugado fortificado con un grupo de 5 PAHs. Ambas disoluciones fueron fortificadas con  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y se les añadió 20 % (v/v) de metanol. Los resultados de precipitación con acetonitrilo no se muestran en la gráfica porque las muestras no pudieron ser inyectadas debido al precipitado formado.

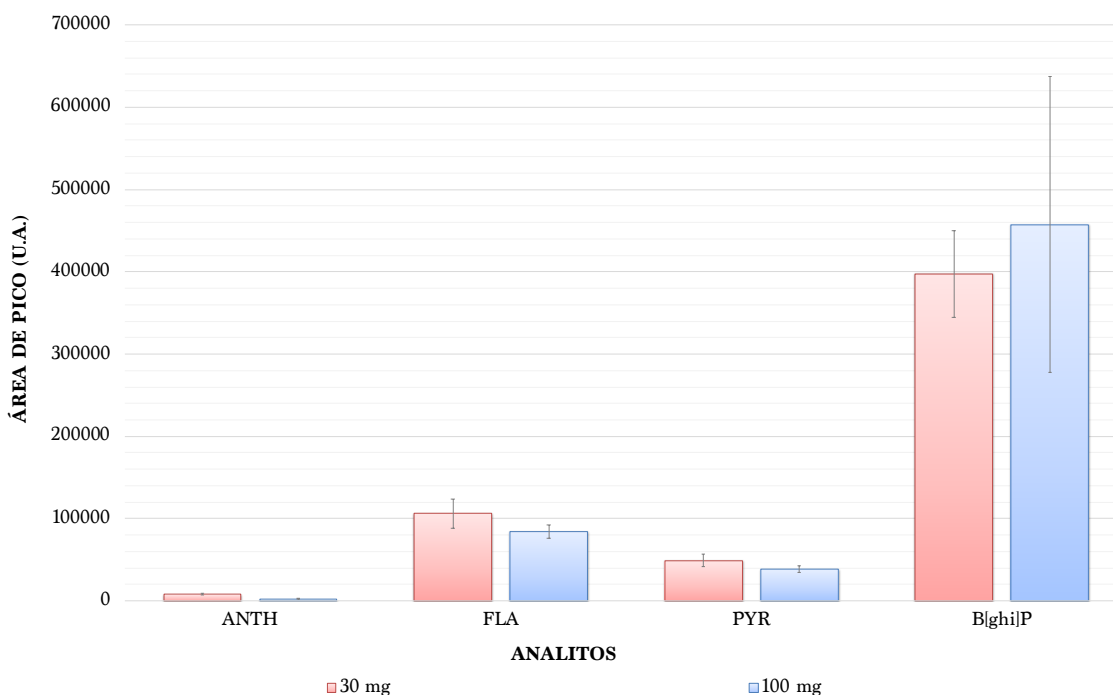
### 4.3. Optimización del procedimiento de extracción en fase sólida

Los parámetros que más afectan a la etapa de SPE fueron optimizados de forma independiente. Estos parámetros incluyen el tipo de resina, la cantidad de ésta, el porcentaje de metanol en la muestra, la etapa de evaporación y filtrado.

#### 4.3.1. Tipo y cantidad de sorbente

En las pruebas iniciales con B[a]P, se estudiaron dos tipos de resinas copoliméricas: *Oasis HLB* y *Oasis HLB Prime*, la última diseñada para la eliminación de lípidos y proteínas. Los resultados obtenidos indicaron que la resina *Oasis HLB Prime* era más indicada para esta aplicación, obteniéndose mayores ER para B[a]P y menor número de interferencias en HPLC, posiblemente por la retención y separación de proteínas y péptidos de los extractos gastrointestinales.

Con la intención de mejorar la recuperación de los PAHs, se estudiaron distintas cantidades de resina *Oasis HLB Prime*: 30 mg y 100 mg. Estas experiencias se realizaron utilizando jugo gastrointestinal centrifugado y fortificado con  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de los cinco PAHs anteriormente mencionados. Para la extracción se siguió el procedimiento descrito en el apartado 3.2.2. Los resultados obtenidos se muestran en **Figura 4**. En este caso, se obtuvieron eficacias de extracción similares con las dos cantidades estudiadas para cuatro de los analitos estudiados, lo que indica que 30 mg son suficientes para la extracción de estos analitos. Debido a estos resultados, se seleccionó 30 mg de resina *Oasis HLB Prime* como óptimo.



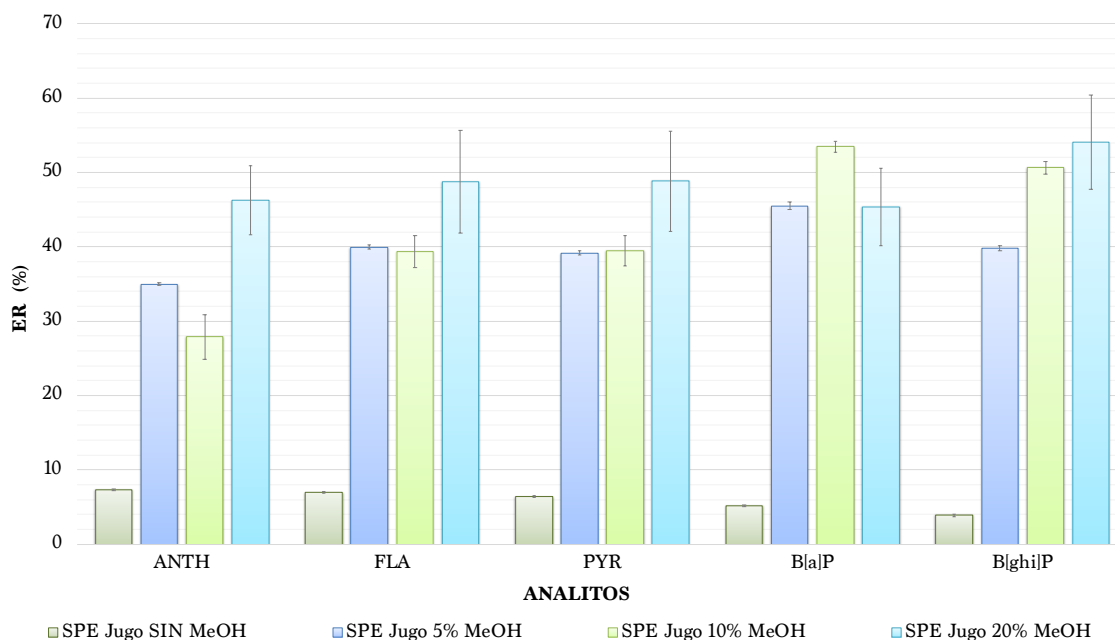
**Figura 4.** Comparativa de la eficacia de extracción, expresada como área de pico cromatográfico, obtenida en experiencias utilizando diferentes cantidades de resina *Oasis HLB Prime* (30 o 100 mg). Los datos del B[a]P no fueron incluidos en la gráfica porque no concordaban con los resultados esperados debido a un error experimental.

#### 4.3.2. Porcentaje de metanol en muestras

Estudios anteriores han señalado que es necesario añadir un pequeño porcentaje de metanol a muestras acuosas para favorecer la disolución de los PAHs y evitar que por su gran hidrofobicidad se adhieran a las paredes del tubo de vidrio, hecho que disminuiría la eficacia extractiva y aportaría unos resultados erróneos debido a esta pérdida accidental<sup>(34)</sup>. Por ejemplo, estudios previos realizados con estándares inyectados en HPLC-FD indicaron que se producía una pérdida del 64% de ANT y 90% de B[a]P en función de si el medio de disolución de los analitos era metanol puro o una disolución acuosa de metanol al 20% (v/v). En base a esto, se añadieron distintos porcentajes de metanol en las muestras de jugo antes de la etapa de SPE. El máximo porcentaje de metanol añadido fue un 20% (v/v) ya que, como se comprobó

experimentalmente, era la máxima cantidad de metanol que podía soportar la matriz gastrointestinal sin desnaturalizarse dando lugar a una suspensión o precipitado.

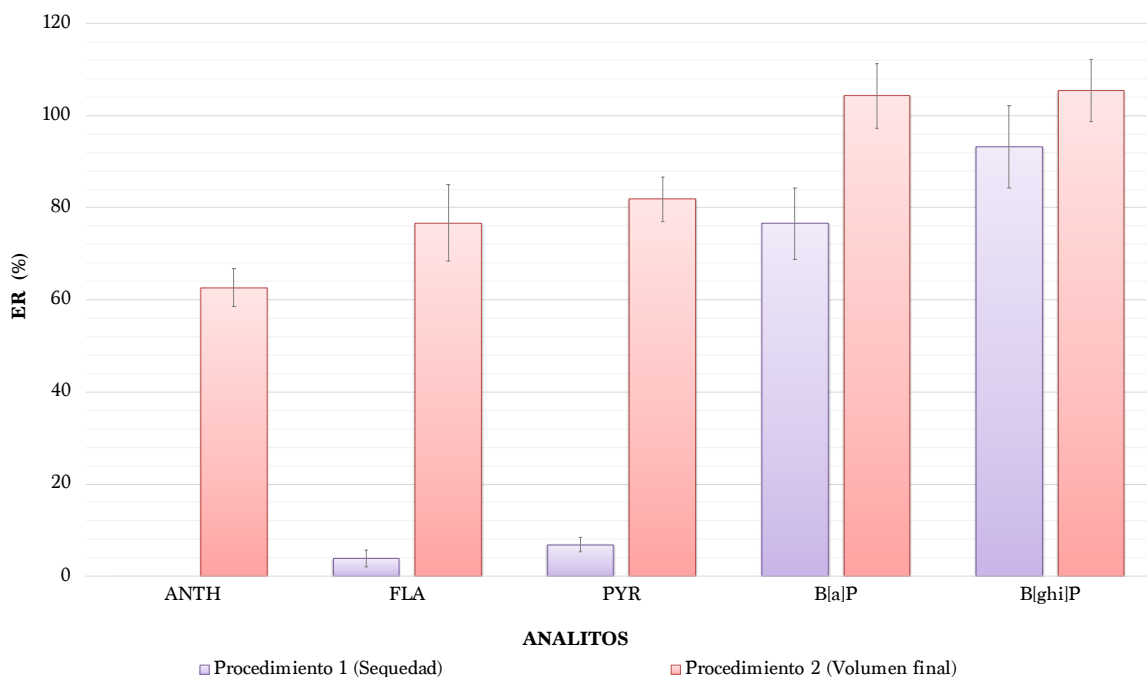
La **Figura 5** muestra que las mayores ER se obtuvieron en la mayoría de los casos utilizando un porcentaje de metanol del 20%, sin que existieran diferencias significativas entre 10 - 20% de metanol para el B[a]P. Por ello, se seleccionó este valor como óptimo.



**Figura 5.** Comparación de la eficacia de extracción del método de SPE en muestras de jugo gastrointestinal centrifugado conteniendo diferentes porcentajes de metanol.

#### 4.3.3. Evaluación de la etapa de evaporación tras la SPE

Después de realizar la SPE, se llevó a cabo una etapa de evaporación y reconstitución del eluato con el objetivo de aumentar los factores de preconcentración y aumentar la sensibilidad del método. Sin embargo, los PAHs son compuestos semi-volátiles, por lo que pueden pasar a la fase gaseosa durante este procedimiento, que implica someter al eluato a una corriente de N<sub>2</sub> y temperaturas de 40 °C. Para evaluar la posible pérdida de analito durante la evaporación, estándares de 50 µg·L<sup>-1</sup> en metanol fueron sometidos únicamente al procedimiento de evaporación y reconstitución (sin etapa de SPE). Se evaluaron dos procedimientos de evaporación distintos: llevando a sequedad (procedimiento 1) o reduciendo el volumen hasta 200 µL (procedimiento 2), seguido en ambos casos de reconstitución a un volumen final de 400 µL. Los resultados se muestran en la **Figura 6** e indican que los tres primeros analitos (los más volátiles), se volatilizan total o parcialmente si las muestras se llevan a sequedad. Por ello, se seleccionó el procedimiento 2 como óptimo.



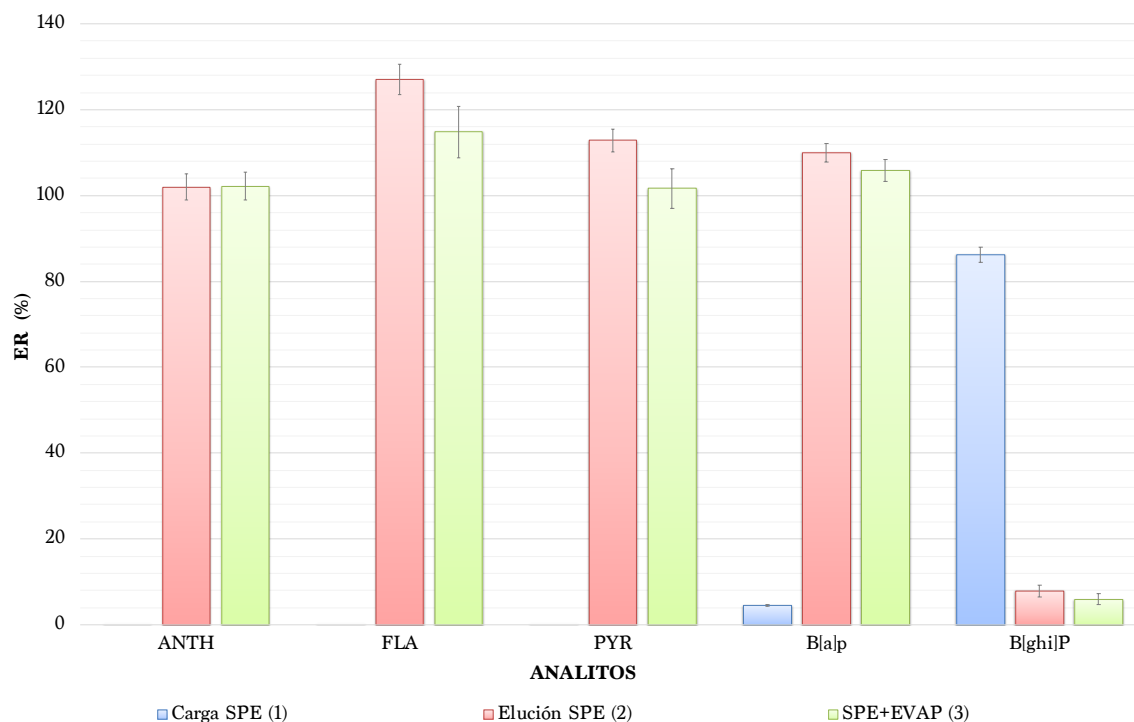
**Figura 6.** Comparación de la recuperación de los analitos durante el proceso de evaporación y reconstitución utilizando los procedimientos 1 (**sequedad**) y 2 (**volumen final**) descritos en el texto.

#### 4.3.4. Evaluación de la etapa de carga de muestra durante la SPE

Una vez estudiadas las pérdidas durante la evaporación, se evaluó la pérdida de analito durante la etapa de carga de muestra en el procedimiento de SPE, usando disoluciones acuosas con 20% de metanol (v/v). Para ello, se inyectaron en el HPLC: (1) la muestra tras pasarla por el cartucho de SPE (denominada muestra cargada, que contiene analitos no retenidos)<sup>1</sup>, (2) la fracción eluida y (3) la fracción eluida, evaporada y reconstituida (utilizando el procedimiento 2 de la sección anterior). Los resultados finales, mostrados en la **Figura 7**, se compararon respecto a un estándar de la muestra cargada y no respecto a calibraciones externas del estándar en metanol.

Los resultados indican que el ANT, FLA y PYR son retenidos y eluidos de forma cuantitativa, y que las pérdidas por evaporación para estos analitos son despreciables, tal y como se comentó en la sección anterior. Por el contrario, la carga no es efectiva en el caso de B[ghi]P, el analito más pesado. Esto indica que la resina es más indicada para PAHs relativamente más polares, tal como podría esperarse por el balance hidrofílico/hidrofóbico del copolímero de la resina.

<sup>1</sup> Esto se pudo hacer porque la matriz era agua y no jugo, de lo contrario se hubiera dañado el equipo.



**Figura 7.** Comparativa de la recuperación de los analitos en cada paso de la SPE. **Carga SPE (1)** representa la fracción de analito no retenida en la resina *Oasis HLB Prime*; **Elución SPE (2)** representa la fracción de analito retenido en el sorbente y eluido; y **SPE+EVAP (3)** es el procedimiento completo de SPE con evaporación y reconstitución.

#### 4.4. Validación del método

Una vez optimizado el método, se procedió a su validación utilizando calibración externa en la matriz. Los niveles de calibración se prepararon en la misma matriz que las muestras (jugo gastrointestinal centrifugado con un 20% (v/v) de metanol) y se sometieron a la misma preparación de muestra: SPE optimizada con una posterior evaporación siguiendo el procedimiento 2 y filtrado final con 0,45  $\mu\text{m}$  de PVDF. Con este tipo de calibración se compensa el efecto matriz y las posibles pérdidas provocadas por el método de preparación de muestra.

Se elaboraron doce puntos de calibrado desde 0,5 hasta 120  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  a partir de la disolución intermedia del mix comercial. Los resultados de las curvas de regresión después de realizar el ajuste lineal demuestran amplios intervalos de linealidad y coeficientes de correlación (R) siempre superiores a 0,9925. En la **Tabla 4** se recogen los datos correspondientes a la regresión lineal por mínimos cuadrados, y los correspondientes tiempos de retención para cada analito.

**Tabla 4.** Parámetros de calidad del método analítico de SPE-HPLC-FD.

<b>Analito</b>	<b>tR ± SD<sup>a</sup></b>	<b>Rango de trabajo (µg·L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Pendiente ± SD<sup>b</sup></b>	<b>R<sup>c</sup></b>	<b>Sy/x<sup>d</sup></b>	<b>n<sup>e</sup></b>
<b>NAP</b>	11.910 ± 0.022	0.5 - 100	928 ± 22	0.9981	2209	9
<b>ACY</b>	15.84 ± 0.09	0.5 - 70	1348 ± 23	0.9990	1605	9
<b>FLU</b>	16.38 ± 0.04	20 - 120	1522 ± 94	0.9925	7470	6
<b>PHE</b>	17.74 ± 0.06	1 - 70	521 ± 25	0.9944	1630	7
<b>ANTH</b>	18.68 ± 0.03	0.5 - 120	4218 ± 70	0.9989	9047	10
<b>FLA</b>	19.399 ± 0.021	0.5 - 120	1175 ± 19	0.9989	2499	10
<b>PYR</b>	19.941 ± 0.024	0.5 - 100	675 ± 10	0.9993	894	9
<b>B[a]A</b>	21.46 ± 0.05	0.5 - 100	3040 ± 32	0.9996	2951	9
<b>CHR</b>	22.00 ± 0.06	0.5 - 120	1519 ± 17	0.9995	2219	10
<b>B[b]F</b>	23.86 ± 0.09	0.5 - 80	3638 ± 71	0.9985	6378	10
<b>B[k]F</b>	24.96 ± 0.12	0.5 - 100	15638 ± 217	0.9992	22201	10
<b>B[a]P</b>	26.45 ± 0.14	0.5 - 100	10962 ± 96	0.9997	9862	10
<b>diB[ah]A</b>	28.15 ± 0.19	0.5 - 70	5194 ± 143	0.9974	9946	9
<b>B[ghi]P</b>	30.55 ± 0.21	0.5 - 100	4477 ± 39	0.9997	4086	11

<sup>a</sup> Tiempo de retención (min) ± desviación estándar asociada al tiempo de retención (n = 21)

<sup>b</sup> Desviación estándar de la pendiente

<sup>c</sup> Coeficiente de correlación

<sup>d</sup> Error de la estima o desviación estándar de los residuales

<sup>e</sup> Niveles de calibración

El IND solo fue identificado en los patrones de mayor concentración. Se hizo un estudio de los valores residuales de este analito, ajustando los datos a una recta de solo cuatro puntos y por eso se eliminó de los valores de calibrado. Además, el IND no fue identificado en ninguna muestra.

Se determinaron dos tipos de límites de cuantificación (LOQs), denominados LOQ parcial (LOQ<sub>p</sub>) y LOQ total (LOQ<sub>t</sub>). Los LOQ<sub>p</sub> se refieren únicamente al calibrado en la matriz (SPE-HPLC-FD). Estos valores fueron estimados experimentalmente y se emplearon como el primer punto de calibración. Tal y como se observa en la **Tabla 4**, se obtuvieron valores de LOQ<sub>p</sub> de 0.5 µg·L<sup>-1</sup> para la mayoría de los analitos, ligeramente superior para el PHE (1 µg·L<sup>-1</sup>) y el valor más elevado para el FLU (20 µg·L<sup>-1</sup>). Sin embargo, el método total estudiado comprende una etapa previa de digestión (método UBM), seguida de la etapa de SPE-HPLC-FD. Por ello, se calcularon también los LOQ<sub>t</sub>, que tienen en cuenta los blancos obtenidos aplicando el método total de UBM-SPE-HPLC-FD. Por tanto, los LOQ<sub>t</sub> en este caso indican la concentración a partir de la cual se obtiene una señal significativamente diferente al blanco y que se puede cuantificar. Los LOQ<sub>t</sub> del método total estuvieron comprendidos entre 0.7 - 47.2 µg·L<sup>-1</sup> para B[a]P y FLU, respectivamente.

Las señales identificadas, pero no cuantificadas por encontrarse en el rango entre el LOQ<sub>p</sub> y el LOQ<sub>t</sub>, podrían indicar la presencia de los analitos en cuestión o interferentes de la matriz y para poder identificarlos adecuadamente hubiera sido más apropiado utilizar una técnica más sensible como GC-MS.

## 4.5. Análisis de las muestras

Utilizando el método total de UBM-SPE-HPLC-FD, se analizaron cinco muestras (**S1**, **S2**, **P1**, **P2**, **P3**), seis blancos (siguiendo todo el protocolo, pero sin adición de muestra), un blanco de jugo y una muestra (**P1**) fortificados con  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Los rangos de las concentraciones totales de PAHs (en  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) presentes en las muestras de caucho, determinados utilizando UAE-GC-MS, fueron: **S1** 0.261 (B[b]F) – 19.3 (PYR), **S2** 0.008 (ANTH) – 0.732 (B[ghi]P), **P1** 2.77 (PHN) – 24.9 (PYR), **P2** 0.088 (B[b]F) – 14.19 (PYR), **P3** 0.09 (NAP) – 15.5 (PYR)<sup>(30)</sup>.

Tal y como se comentó en la sección 4.4. el análisis de blancos de jugos mediante UBM-SPE-HPLC-FD reveló la presencia de algunos PAHs, probablemente debido a problemas de contaminación o por interferencias que coeluyen a los mismos tiempos de retención de los analitos estudiados.

Los valores indicados en la **Tabla 5** señalan que los analitos se encuentran en concentraciones muy pequeñas en la fracción bioaccesible, concentraciones inferiores a las presentes en las muestras. En las muestras **P2** y **P3**, no incluidas en la tabla, solo se identificó un analito: para la muestra **P2**, se pudo cuantificar  $4.8\cdot 10^{-4} \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  de FLA, y en la muestra **P3** se pudo detectar pero no cuantificar ANTH.

**Tabla 5.** Concentraciones bioaccesibles de los analitos presentes en las muestras analizadas.

Analito	[Concentración PAHs, (RSD% <sup>a</sup> )]·10 <sup>4</sup>				
	S1 ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	S2 ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	P1 ( $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	P1 Fortificada <sup>b</sup> ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	Jugo Fortificado <sup>c</sup> ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )
<b>NAP</b>	3.45 (0.22)	D	–	ND	18 (2)
<b>ACE</b>	2.34 (0.22)	–	–	ND	30 (1)
<b>FLU</b>	88.2 (9.4)	ND	–	ND	ND
<b>PHN</b>	ND	D	ND	ND	26 (3)
<b>ANTH</b>	1.61 (0.08)	ND	–	ND	21 (4)
<b>FLA</b>	4.3 (0.3)	ND	1.46 (0.15)	ND	34.6 (2.3)
<b>PYR</b>	2.3	ND	3.0 (0.4)	ND	35 (3)
<b>B[a]A</b>	ND	0.73 (0.23)	ND	ND	34.0 (1.5)
<b>CHR</b>	4.0 (0.7)	1.39 (0.23)	1.39 (0.21)	D	37.7 (2.1)
<b>B[b]F</b>	ND	–	ND	D	34.0 (0.4)
<b>B[k]F</b>	D	D	–	2.81 (0.19)	34.0 (0.9)
<b>B[a]P</b>	ND	0.85 (0.23)	ND	2.36 (0.18)	25.5 (1.3)
<b>Di[ah]A</b>	–	–	–	9.2 (0.8)	36.0 (2.4)
<b>B[ghi]P</b>	0.50 (0.22)	1.21 (0.23)	ND	6.52 (0.04)	44.6 (2.4)

\***D**: Analito detectado, pero no cuantificado; –: La muestra original no presenta ese analito; **ND**: Analito no detectado presente en la muestra

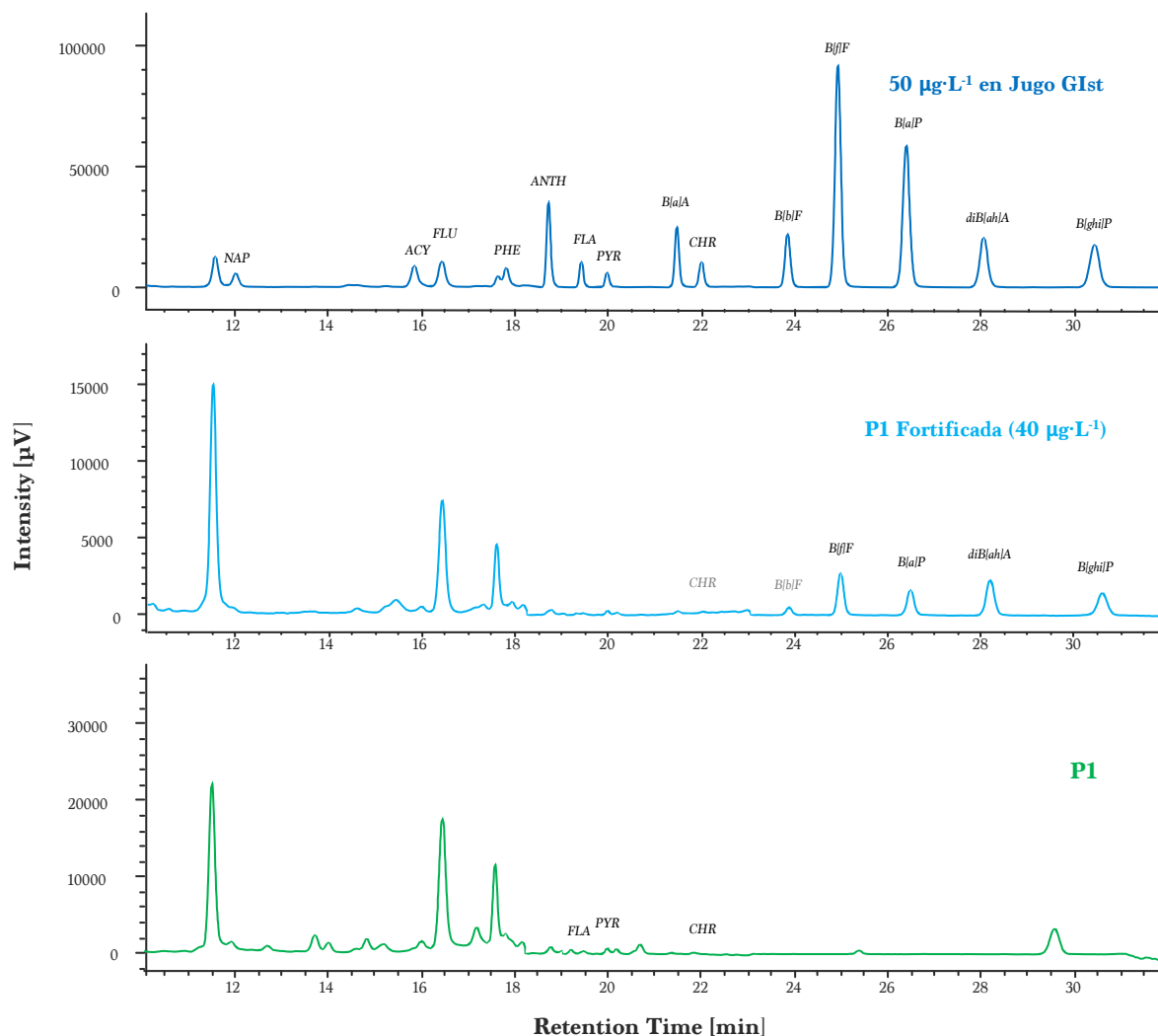
<sup>a</sup> Desviación estándar relativa

<sup>b</sup> Muestra P1 fortificada con  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

<sup>c</sup> Jugo (sin muestra de caucho) fortificado con  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$



En los resultados de la muestra **P1** fortificada se puede observar que los PAHs más ligeros no se detectan, pero sí lo hacen los más pesados. Los analitos de intermedia polaridad e intermedio peso molecular como FLA y PYR fueron detectados, pero no cuantificados. Esto podría deberse a que el caucho es un plástico capaz de adsorber los PAHs fortificados, que coincide con el hecho de que la fracción lixivable de PAHs en jugos gastrointestinales es en todos los casos inferior a 0.001%. En la **Figura 8** se pueden comparar los cromatogramas de la muestra **P1** y la muestra **P1 fortificada**, como ejemplos representativos de las muestras analizadas.



**Figura 8.** Cromatogramas representativos al aplicar el método propuesto a tres muestras: un punto del calibrado de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , la muestra **P1 fortificada** con  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y la muestra **P1** sin fortificar. En el patrón superior se correlacionan los catorce PAHs con sus respectivos picos; en la muestra **P1 fortificada** en color gris se indican los analitos detectados, pero no cuantificados.

En el jugo fortificado se identifican y cuantifican todos los PAHs menos el FLU. Las recuperaciones de los analitos en esta muestra tienden a aumentar a medida que el PAH es más pesado. Cabría esperar que, mientras más pesado e hidrofóbico (mayor  $\log K_{ow}$ , véase **tabla 1**) fuera el analito, se adheriría más fácilmente a las paredes del vidrio o que coprecipitaría junto con las enzimas y sales durante la centrifugación. Sin embargo, los resultados demuestran lo contrario: a menor peso molecular, menor la recuperación. Existen

diversas razones que justifican estos resultados. En primer lugar, durante la digestión gastrointestinal, enzimas proteolíticas, tales como la pancreatina, pueden disgregar proteínas como la albúmina y mucina en péptidos más afines a los PAH menos pesados. Estos PAHs asociados a péptidos se comportarán de forma diferente durante la SPE, pudiendo: (1) no retenerse durante la etapa de carga de la SPE, (2) retenerse, pero no eluirse, o (3) retenerse y eluirse durante la SPE, pero tener un comportamiento cromatográfico diferente al correspondiente PAH no asociado. Por otra parte, la pérdida de los PAHs más ligeros (y también más volátiles) puede darse durante la etapa de digestión UBM, en la que la muestra se somete a agitación a 37 °C durante 1 h en la etapa gástrica y 4 h en la etapa gastrointestinal, o durante la preconcentración en la evaporación pudiendo volatilizarse parcialmente los PAHs menos pesados (véase *figura 6*)<sup>(35)</sup>. Del mismo modo, estos resultados podrían deberse a la posible degradación de los PAHs más ligeros durante la digestión gastrointestinal. Conviene señalar al respecto que existe una relación inversa entre la velocidad de degradación y el número de anillos, es decir, a menor número de anillos mayor velocidad de degradación de los PAHs<sup>(36)</sup>. En base a los datos bibliográficos, a tiempos prolongados de contacto entre los contaminantes orgánicos y las muestras, disminuye la biodisponibilidad de los analitos por su degradación debida a la presencia de microorganismos<sup>(36)</sup>.

La fracción bioaccesible (BAF) de las muestras se expresa de manera porcentual dividiendo la concentración presente en la fracción gastrointestinal entre la concentración total de la muestra inicial, multiplicado por cien, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$BAF (\%) = \left( \frac{\text{Concentración bioaccesible}}{\text{Concentración total}} \right) \cdot 100$$

En cuanto al análisis de riesgo, las fracciones bioaccesibles de las muestras en el peor de los casos fueron del orden de 10<sup>-3</sup>%. Así, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que, en cierta medida, la ingestión accidental de caucho reciclado no conlleva a un aumento significativo de la fracción de PAHs que podrían ser asimilados por el organismo. Sin embargo, conviene resaltar el hecho de que, tal y como se comentó en la sección 1.1., concentraciones traza de estas especies pueden suponer un riesgo para la salud, si bien en ninguno de los resultados se superó la DdR debido al factor de bioaccesibilidad anteriormente indicado.

## 5. Conclusiones

A partir de los resultados expuestos y discutidos en este trabajo, pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- Se seleccionó el ensayo de digestión *in vitro* UBM como método de estudio de bioaccesibilidad oral, descartando otros procedimientos como el FOREsHT porque el caucho ingerido, a diferencia de alimentos, no dispone de contenido proteico y lipídico que deba degradarse.
- Se compararon diferentes métodos de preparación de muestra para el análisis de la fracción bioaccesible de PAHs en caucho reciclado procedente de campos de fútbol de césped sintético. Se seleccionó la SPE como método de preparación de muestra ya que demostró ser el más adecuado al obtenerse mayores ER para los analitos estudiados en la matriz gastrointestinal.
- La metodología SPE necesitó la adición de un 20% (v/v) de metanol en la disolución de las muestras para facilitar la disolución de los PAHs en la matriz gastrointestinal y que no se adhiriesen a las paredes del material utilizado. Se demostró que con 30 mg de *Oasis HLB Prime* se conseguía una eficiente extracción y recuperación de los analitos. Se añadió una etapa de preconcentración por evaporación parcial del eluato obtenido tras la SPE y reconstitución para minimizar la pérdida de los analitos más volátiles.
- El método de SPE-HPLC-FD se validó utilizando calibración externa en la matriz de jugo gastrointestinal.
- El análisis de blancos de jugos mediante el método de UBM-SPE-HPLC-FD reveló la presencia de algunos PAHs en los blancos UBM, probablemente por problemas de contaminación o por interferencias que coeluyen a los mismos tiempos de retención que los analitos.
- Se analizaron muestras reales de caucho, detectando los analitos en concentraciones bioaccesibles entre  $4.98 \cdot 10^{-5}$  –  $8.82 \cdot 10^{-3}$   $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ . Los valores de concentración obtenidos fueron menores a las cantidades iniciales de analitos presentes en las muestras ingeridas, lo que indica que la mayor parte de analito no es bioaccesible porque bien no se desorbe de la muestra, o bien se asocia a las proteínas, se queda en el vidrio o se volatiliza total o parcialmente durante la agitación o la evaporación. El estudio con caucho fortificado revela que la mayor parte de analito se adsorbe en el caucho. De cualquier forma, estudios futuros contemplan usar GC-MS para aumentar la sensibilidad y detectar inequívocamente los PAHs, usando estándares internos.

## 6. Anexos

**Tabla A.** Concentraciones de las sales inorgánicas, compuestos orgánicos y enzimas de cada uno de los jugos preparados para el método UBM.

<i>Reactivo</i>	<i>Concentración (mg·L<sup>-1</sup>) en jugo digestivo</i>			
	<b>Saliva</b>	<b>Jugo gástrico</b>	<b>Jugo duodenal</b>	<b>Bilis</b>
KCl	896	824	564	376
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	888	266	–	–
KSCN	200	–	–	–
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	570	–	–	–
NaCl	298	2752	7012	5260
CaCl <sub>2</sub>	–	400	200	222
NH <sub>4</sub> Cl	–	306	–	–
NaHCO <sub>3</sub>	–	–	3607	5786
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	–	–	80	–
MgCl <sub>2</sub>	–	–	50	–
NaOH (mM)	1.8	–	–	–
HCl (%)	–	0.31	6.66·10 <sup>3</sup>	6.66·10 <sup>3</sup>
Urea	200	85	100	250
Glucosa	–	650	–	–
Ácido glucurónico	–	20	–	–
Glucosamina HCl	–	330	–	–
<i>α</i> -Amilasa	145	–	–	–
Mucina	50	3000	–	–
Ácido úrico	15	–	–	–
Albumina de suero bovino	–	1000	1000	1800
Pepsina	–	1000	–	–
Pancreatina	–	–	3000	–
Lipasa	–	–	500	–
Bilis	–	–	–	600

**Tabla B.** Recopilación de las abreviaturas utilizadas en la memoria y su significado

<i>Abreviatura</i>	<i>Significado</i>
COP	Contaminante Orgánico Persistente
POPs	Persistent Organic Pollutants
PNUMA	Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
PAHs	Hidrocarburos Policíclicos Aromáticos
IARC	Agencia Internacional de Investigación contra el Cáncer
EPA	Enviromental Protection Agency, Agencia de Protección Ambiental
SCF	EU Scientific Comitee on Food, Comité Científico de Alimentos
DdR	Dosis de Referencia Oral
UBM	Unified Biaccessibility Method, Método Unificado de Bioaccesibilidad
BARGE	Grupo de investigación de Bioaccesibilidad de Europa
FOREsHT	Fed ORganic Estimation human Simulation, Método de simulación humana de ingestión orgánica
HPLC-FD	Cromatografía de líquidos de alta resolución con detección fluorescente
CG-MS	Cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas
AAS	Espectroscopía de absorción atómica
ICP-MS	Plasma de acoplamiento inductivo con espectrometría de masas
ICP-OES	Plasma de acomplamiento inductivo con espectrometría de emisión óptica
SPE	Extracción en fase sólida
SLE	Extracción sólido líquido
SPME	Microextracción en fase sólida
UAE	Extracción Asistida por Ultrasonidos
CRM	Material certificado de referencia
LIDSA	Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Soluciones Analíticas
<i>fcr</i>	Fuerza centrífuga relativa o fuerza g
PVDF	Difluoruro de polivinildeno
ER	Eficacia de extracción
LOQ	Límite de cuantificación
BAF	Fracción bioaccesible

## 7. Bibliografía

- (1) AECOSAN. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Contaminantes Orgánicos Persistentes (COP) [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/contaminantes\\_organicos.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/contaminantes_organicos.htm) (accessed dic 30, 2019).
- (2) Drwal, E.; Rak, A.; Gregoraszczyk, E. L. Review: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-Action on placental function and health risks in future life of newborns. *Toxicology* **2019**, *411* (October 2018), 133-142. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.10.003>.
- (3) Reglamento (UE) **2019/1021** del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de junio de 2019, sobre contaminantes orgánicos persistentes, actualización del Reglamento (CE) N° 850/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, que tiene por objeto proteger la salud humana y el medio ambiente frente a estos contaminantes.
- (4) Reglamento (CE) N° **1881/2006** de la Comisión, de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de contaminantes contaminados en los productos alimenticios.
- (5) AECOSAN. Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs) [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/haps.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/haps.htm) (accessed dic 30, 2019).
- (6) Zedek, M. S. Polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* **1980**, *3* (5-6), 537-567. <https://doi.org/10.1080/23311843.2017.1339841>.
- (7) Bulder, A. S.; Hoogenboom, L. A. P.; Kan, C. A.; van Raamsdonk, L. W. D.; Traag, W. A.; Bouwmeester, H. Initial Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Feed (materials) <http://edepot.wur.nl/28169> (accessed dic 30, 2019).
- (8) International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the identification of carcinogenic hazards to humans <http://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/> (accessed dic 30, 2019).
- (9) US Environment Protection Agency; Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Fact Sheet <https://www.epa.gov/north-birmingham-project/polycyclic-aromatic-hydrocarbons-pahs-fact-sheet> (accessed dic 30, 2019).
- (10) Lerda, D. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Factsheet [https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/Factsheet\\_PAH\\_0.pdf](https://ec.europa.eu/jrc/sites/jrcsh/files/Factsheet_PAH_0.pdf) (accessed dic 30, 2019).
- (11) Zelinkova, Z.; Wenzl, T. EU marker polycyclic aromatic hydrocarbons in food supplements: analytical approach and occurrence. *Food Addit. Contam. - Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* **2015**, *32* (11), 1914-1926. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1087059>.
- (12) Castro, G. Materiales y compuestos para la industria del neumático [http://campus.fi.uba.ar/file.php/295/Material\\_Complementario/Materiales\\_y\\_Compuestos\\_para\\_la\\_Industria\\_del\\_Neumatico.pdf](http://campus.fi.uba.ar/file.php/295/Material_Complementario/Materiales_y_Compuestos_para_la_Industria_del_Neumatico.pdf) (accessed dic 30, 2019).
- (13) Reglamento (UE) N° **835/2011** de la Comisión de 19 de agosto de 2011 que modifica el Reglamento (CE) N° 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los productos alimenticios.
- (14) **Reglamento (UE) N° 1327/2014** de la Comisión de 12 de diciembre de 2014, por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 1881/2006 en lo que respecta al contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en la carne y los productos cárnicos

ahumados del modo tradicional y en el pescado y los productos de la pesca ahumados del modo tradicional.

- (15) **Reglamento (UE) 2015/1933** de la Comisión, de 27 de octubre de 2015, que modifica el Reglamento (CE) n° 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en la fibra de cacao, las chips de plátano, los complementos alimenticios, las hierbas secas y las especias secas.
- (16) **Reglamento (UE) N° 836/2011** de la Comisión de 19 de agosto de 2011 por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 333/2007 por el que se establecen los métodos de muestreo y análisis para el control oficial de los niveles de Pb, Cd, Hg, Sn, 3-MCPD y B(a)P en los productos alimenticios.
- (17) The University of Arizona. Dosis de Referencia (DdR) <https://superfund.arizona.edu/content/25211-dosis-de-referencia-ddr> (accessed dic 30, 2019).
- (18) Cave, M. R.; Wragg, J.; Harrison, I.; Vane, C. H.; Van DE Wiele, T.; De Groeve, E.; Nathanail, C. P.; Ashmore, M.; Thomas, R.; Robinson, J.; et al. Comparison of batch mode and dynamic physiologically based bioaccessibility tests for PAHs in soil samples. *Environ. Sci. Technol.* **2010**, *44* (7), 2654-2660. <https://doi.org/10.1021/es903258v>.
- (19) Rodríguez-Navas, C.; Rosende, M.; Miró, M. In-vitro physiologically based extraction of solid materials: Do we have reliable analytical methods for bioaccessibility studies of emerging organic contaminants? *TrAC - Trends Anal. Chem.* **2017**, *91*, 42-52. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.03.005>.
- (20) Rosende, M.; Prieto, A.; Etxebarria, N.; Martorell, G.; Miró, M. Automatic Mesofluidic System Combining Dynamic Gastrointestinal Bioaccessibility with Lab-on-Valve-Based Sorptive Microextraction for Risk Exposure of Organic Emerging Contaminants in Filter-Feeding Organisms. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (9), 5739-5746. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.8b05870>.
- (21) Umeh, A. C.; Duan, L.; Naidu, R.; Esposito, M.; Semple, K. T. In vitro gastrointestinal mobilization and oral bioaccessibility of PAHs in contrasting soils and associated cancer risks: Focus on PAH nonextractable residues. *Environ. Int.* **2019**, *133*, 105186. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105186>.
- (22) BARGE - INERIS. UBM procedure for the measurement of inorganic contaminant bioaccessibility from solid matrices. [https://www.bgs.ac.uk/barge/docs/BARGE\\_UBM\\_DEC\\_2010.pdf](https://www.bgs.ac.uk/barge/docs/BARGE_UBM_DEC_2010.pdf) (accessed dic 30, 2019).
- (23) BARGE - The Bioaccessibility Research Group of Europe. The BARGE Unified Bioaccessibility Method <https://www.bgs.ac.uk/barge/ubm.html> (accessed dic 30, 2019).
- (24) Versantvoort, C. H. M.; Oomen, A. G.; Van de Kamp, E.; Rempelberg, C. J. M.; Sips, A. J. A. M. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43* (1), 31-40. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2004.08.007>.
- (25) Gao, P.; da Silva, E. B.; Townsend, T.; Liu, X.; Ma, L. Q. Emerging PAHs in urban soils: Concentrations, bioaccessibility, and spatial distribution. *Sci. Total Environ.* **2019**, *670*, 800-805. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.247>.
- (26) Benoit, G.; Demars, S. Evaluation of Organic and Inorganic Compounds Extractable by Multiple Methods from Commercially Available Crumb Rubber Mulch. *Water Air Soil Pollut.* **2018**, *229* (3). <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3711-7>.
- (27) Dorsey, M. J.; Anderson, E.; Ardo, O.; Chou, M.; Farrow, E.; Glassman, E. L.; Manley, M.; Meisner, H.; Meyers, C.; Morley, N.; et al. Mutagenic potential of artificial athletic

- field crumb rubber at increased temperatures. *Ohio J. Sci.* **2015**, *115* (2), 32-39. <https://doi.org/10.18061/ojs.v115i2.4857>.
- (28) Perkins, A. N.; Inayat-Hussain, S. H.; Deziel, N. C.; Johnson, C. H.; Ferguson, S. S.; Garcia-Milian, R.; Thompson, D. C.; Vasiliou, V. Evaluation of potential carcinogenicity of organic chemicals in synthetic turf crumb rubber. *Environ. Res.* **2019**, *169*, 163-172. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.10.018>.
- (29) Pronk, M. E. J.; Woutersen, M.; Herremans, J. M. M. Synthetic turf pitches with rubber granulate infill: are there health risks for people playing sports on such pitches? *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **2018**. <https://doi.org/10.1038/s41370-018-0106-1>.
- (30) Celeiro, M.; Dagnac, T.; Llompart, M. Determination of priority and other hazardous substances in football fields of synthetic turf by gas chromatography-mass spectrometry: A health and environmental concern. *Chemosphere* **2018**, *195*, 201-211. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.063>.
- (31) Quintana, J. B.; Rosende, M.; Montes, R.; Rodríguez-Álvarez, T.; Rodil, R.; Cela, R.; Miró, M. In-vitro estimation of bioaccessibility of chlorinated organophosphate flame retardants in indoor dust by fasting and fed physiologically relevant extraction tests. *Sci. Total Environ.* **2017**, *580*, 540-549. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.210>.
- (32) Wragg, J.; Cave, M.; Basta, N.; Brandon, E.; Casteel, S.; Denys, S.; Gron, C.; Oomen, A.; Reimer, K.; Tack, K.; et al. An inter-laboratory trial of the unified BARGE bioaccessibility method for arsenic, cadmium and lead in soil. *Sci. Total Environ.* **2011**, *409*, 4016-4030. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.05.019>.
- (33) National Center for Environmental Assessment of Research and Development U.S. Environmental Protection Agency. Toxicological review of methanol (Non-cancer): In support of summary information on the Integrated Risk Information System (IRIS). *Fed. Regist.* **2013**, *78* (86), 26029-26031.
- (34) Abujaber, F.; Ahmad, S. M.; Neng, N. R.; Rodríguez Martín-Doimeadios, R. C.; Guzmán Bernardo, F. J.; Nogueira, J. M. F. Bar adsorptive microextraction coated with multi-walled carbon nanotube phases - Application for trace analysis of pharmaceuticals in environmental waters. *J. Chromatogr. A* **2019**, *1600*, 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.04.035>.
- (35) Sánchez-Trujillo, M. A.; Morillo, E.; Villaverde, J.; Lacorte, S. Comparative effects of several cyclodextrins on the extraction of PAHs from an aged contaminated soil. *Environ. Pollut.* **2013**, *178*, 52-58. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.029>.
- (36) Gomez-Eyles, J. L.; Collins, C. D.; Hodson, M. E. Using deuterated PAH amendments to validate chemical extraction methods to predict PAH bioavailability in soils. *Environ. Pollut.* **2011**, *159* (4), 918-923. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.12.015>.