



Universitat
de les Illes Balears

TREBALL FI DE GRAU

BIODISPONIBILITAT I ASSIMILACIÓ DE BISFENOL A ADSORBIT A MICROPLÀSTICS

Marc Cañete Cánaves

Grau de Biologia

Facultat de Ciències

Any Acadèmic 2022-23

BIODISPONIBILITAT I ASSIMILACIÓ DE BISFENOL A ADSORBIT A MICROPLÀSTICS

Marc Cañete Cánaves

Treball de Fi de Grau

Facultat de Ciències

Universitat de les Illes Balears

Any Acadèmic 2022-23

Paraules clau del treball:

Microplàstics, BPA, Polietilè, Carboximetilcel·lulosa, Biodisponibilitat

Nom Tutor/Tutora del Treball: Dr. Josep Mercader Barceló

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Index

Resum	5
Introducció	7
Hipòtesi i Objectius	10
Materials i mètodes	11
Materials	11
Neteja del material de laboratori	12
Cromatografia líquida-espectrometria de masses (LC-MS)	13
Anàlisi de BPA en plasma de rata per LC-MS	14
Avaluació de la idoneïtat dels vehicles per administrar PE-BPA i BPA lliure per gavage a rates	18
Administració dels compostos per gavage a rates	19
Resultats	20
Neteja del material de laboratori	20
Concentració de BPA a plasma de rata	21
Idoneïtat dels vehicles per administrar PE-BPA i BPA lliure	22
Administració dels compostos durant la fase pilot de l'experiment	24
Discussió	27
Conclusions	28
Agraïments	28
Bibliografia	28

Resum

Els plàstics són materials amb un temps de vida mitjana elevat present de forma ubiqua emprat en quasi tots els usos requerits per la societat. Aquests poden degradar-se en partícules més petites d'entre 100-5 nm anomenades microplàstics (MPs). Els microplàstics són contaminants emergents amb una alta capacitat d'ingressar a la cadena tròfica i provocar efectes perjudicials com disbiosi o modificació dels nivells de cèl·lules Th17 i Treg en rates en el cas del polietilè (PE). A més, poden contenir additius que modifiquen les seves propietats fisicoquímiques, un del més importants essent el BPA, disruptor endocrí conegut. En aquest TFG s'han realitzat tasques de comprovació de procediments i posta a punt del mètode per a l'anàlisi per cromatografia de gasos associada a espectrometria líquida de masses (LC-MS) de BPA i BPA adsorbit a partícules de PE (BPA-PE) emmarcat dintre el projecte PID2020-117686RB-C33 com a part inicial d'aquest, en concret en procediments inclosos en l'estudi de la biodisponibilitat de BPA adsorbit a MPs. El protocol de neteja de material evita la contaminació per BPA. El mètode d'anàlisi per LC-MS optimitzat mitjançant un tampó per a una eficiència òptima de l'enzim β -Glucuronidasa, manté l'eficàcia d'aquest per a la detecció del BPA, a falta de resultats per a l'optimització de la concentració de l'enzim. Els vehicles més adequats per a l'administració per gavatge de BPA i BPA-PE foren l'oli de blat de les índies i carboximetilcel·lulosa 5% (CMC), respectivament, i funcionant correctament en les proves d'administració en laboratori, no essent així a l'hora de l'experiment pilot en el cas del grup BPA-PE amb CMC. Es conclou que els protocols de neteja, anàlisi i vehicles són adequats per a l'experiment, havent d'optimitzar el vehicle CMC en quant a la seva concentració, així com la utilització de diferents instruments per a la seva administració, com cànules i xeringues de major diàmetre.

Abstract

Plastics are materials with a high average life time present ubiquitously used in almost all the uses required by society. Plastics can degrade into smaller particles between 100-5 nm called microplastics (MPs). Microplastics are emerging pollutants with a high capacity to enter the food chain and cause harmful effects such as dysbiosis or modification of Th17 and Treg cell levels in rats in the case of polyethylene (PE). In addition, they may contain additives that modify their physicochemical properties, one of the most important being BPA, a known endocrine disruptor. In this work, tasks have been carried out to check procedures and fine-tune the method for the analysis by gas chromatography associated with liquid mass spectrometry (LC-MS) of BPA and BPA adsorbed to PE particles (BPA- PE) framed within the project PID2020-117686RB-C33, as an initial part of it, more precisely in procedures included in the study of biodisponibility of BPA adsorbed in MPs. Material cleaning protocol prevents BPA contamination. The LC-MS analysis method optimized using a buffer for optimal efficiency of the β -Glucuronidase enzyme maintains its effectiveness for the detection of BPA, in the absence of results for the optimization of the concentration of the enzyme. The most suitable vehicles for gavage administration of BPA and BPA-PE were corn oil and 5% carboxymethylcellulose (CMC), respectively, and performing well in laboratory administration tests, not being so for the CMC vehicle with BPA-PE at the time of the pilot experiment. It is concluded that the cleaning and analysis protocols and vehicles are suitable for the experiment, needing an improvement of the CMC vehicle regarding its concentration and obtaining better instruments for its administration, such as larger cannulas and syringes.

Introducció

El plàstic és un material emprat en l'actualitat en gairebé tots els usos requerits per la societat des de la indústria tèxtil, construcció, enginyeria i electrònica fins al transport i emmagatzematge d'aliments i altres productes de consumició. El seu nombre d'aplicacions és tal gràcies a la varietat de formes que presenta, fet que fa que actualment no es pot pensar en un món sense ell (Herberz et al., 2020).

Una de les característiques més marcades del plàstic és el seu allargat temps de vida mitjana, 450 anys en el cas del polietilè tereftalat (PET per les seves sigles en anglès), factor que contribueix a que en el període comprès entre 1950 i 2015 s'hagin produït 4.600 milions de tones de deixalles de plàstic (Qin et al., 2021).

Segons passa el temps el plàstic es comença a desintegrar gràcies a l'acció de factors abrasius i llarga exposició als raigs de llum ultraviolada (UV) (Gregory & Andrady, 2003), així com per factors biòtics (Imhof et al., 2012) en fragments cada cop més petits. En arribar a mides d'entre 100 nm i 5 mm (Alimi et al., 2018) adopten el nom de microplàstics (MPs), terme adoptat per (Thompson et al., 2004). Destacar que existeixen microplàstics primaris, quan són fabricats expressament de mida petita, i secundaris, provinents de la fragmentació de plàstics de major mida.

Els microplàstics són contaminants emergents que es troben en medi marí i més recentment s'han trobat també en suspensió a l'aire (Enyoh et al., 2019). Una de les formes d'exposició més comunes als microplàstics és a través dels aliments (Conti et al., 2020; Iñiguez et al., 2017), actualment no existint una metodologia estàndard per al seu anàlisi en aliments (Rubio-Armendáriz et al., 2022), i tampoc essent tractats com a contaminants dels aliments per la Unió Europea (Rainieri & Barranco, 2019), encara que sí que hi ha legislació respecte als materials destinats al contacte amb aliments (Europea, U. Reglamento (UE) No 10/2011 de la Comisión, de 14 de enero de 2011, sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos. *Diario oficial de la Unión Europea*, 15, 1-89).

Aquesta distribució al medi és desigual i depèn de les característiques, tan físiques (mida, forma, color) com químiques (composició), pròpies dels diferents tipus de microplàstics (Zhang et al., 2022), els quals estan formats per polímers (del grec poly-, "moltes" i -mer, "parts"), macromolècules compostes per molècules més petites anomenades monòmers repetides. Els polímers més comuns són els de polipropilè (PP), polietilè (PE), clorur de polivinil (PVC) i poliestirè (PS), corresponent al 24%, 21%, 19% i 6% de la producció total el 2007, respectivament (Andradi et al., 2011). Els MPs també poden contenir additius per modificar les seves propietats (antioxidants, estabilitzants del calor i protecció front als raigs

UV, plastificants i pigments), així com monòmers, catalitzadors o subproductes de la seva fabricació (Shim et al., 2018).

Respecte a la seva possible biodisponibilitat, havent evidència d'acumulació en el contingut gàstric d'aus marines des de la dècada del 1960 (Kenyon & Kridler, 1969), ve determinada principalment per la mida, densitat, color i abundància. Com menors són els fragments, amb més facilitat són captats per organismes de nivells inferiors en la xarxa tròfica, que presenten poca selectivitat en les partícules que ingereixen; a més, els fragments poden ser captats passivament per organismes superiors (Moore, 2008). L'abundància d'aquests fragments en el medi va en augment i la seva presència segueix una tendència a l'alça (Barnes et al., 2009), fet que incrementa la biodisponibilitat a raó d'augmentar la probabilitat d'un organisme a trobar-se'ls, així com veure's afectada per la fragmentació progressiva en trossos de menor mida (Browne et al., 2008). Aquesta biodisponibilitat també es pot veure afectada per interaccions biològiques tal com explica (Ward & Kach, 2009), permetent la introducció dels microplàstics a les xarxes tròfiques (**Figura 1**) (Wright et al., 2013).

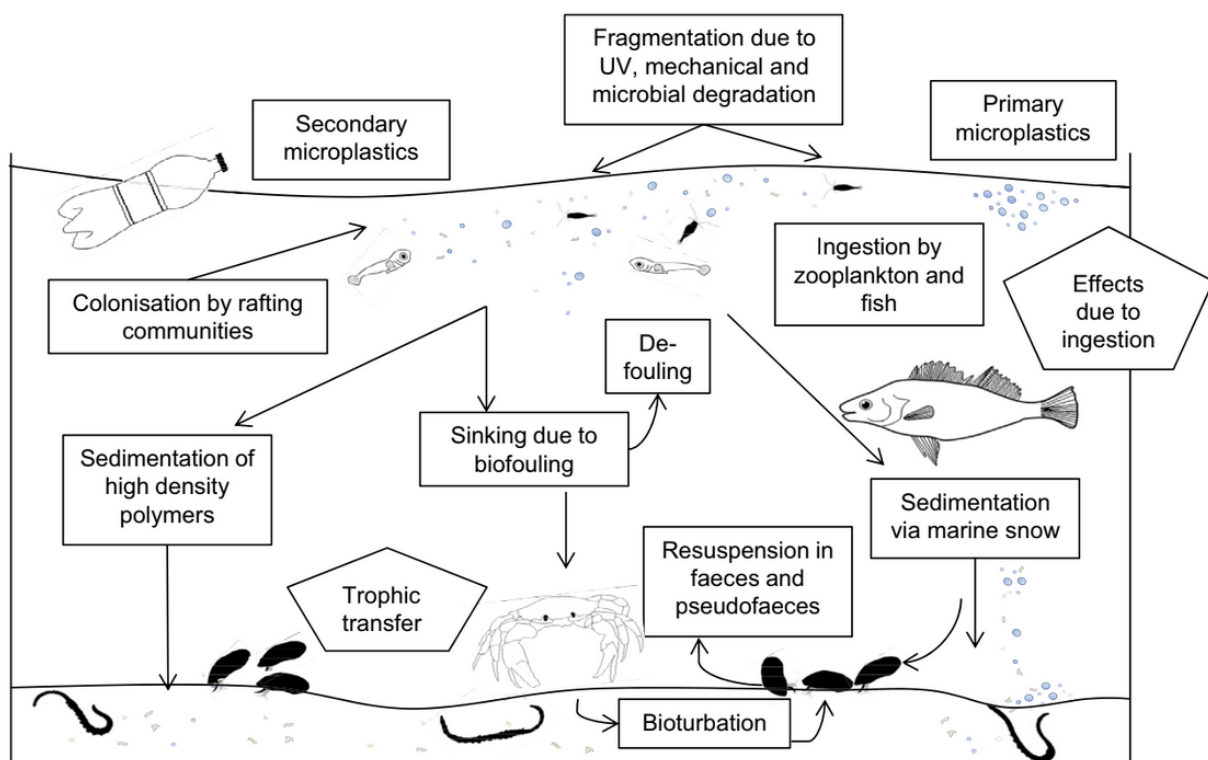


Figura 1. Possibles rutes de transport de MPs i les seves interaccions biològiques (Wright et al., 2013).

Els MPs poden contenir additius, que els doten de noves propietats o les modifiquen per millorar la seva finalitat (major resistència tèrmica, flexibilitat, etc.). Un dels més destacats és el Bisfenol A (BPA) [2,2-bis-(4-hidroxifenil)propà. CAS nº 80-05-7], el qual és emprat en la síntesi de plàstics de policarbonat (plàstics de tipus polièster degut a tenir un grup èster dins la seva estructura) i altres polímers com la resina epoxi (Scippo, 2011). Emprat com a

component en productes com ampolles per a infants, recobriments per begudes i llaunes i estris emprats en medicina (Y. Q. Huang et al., 2012) fins que l'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA per les seves sigles en anglès) en va prohibir el seu ús en ampolles i envasos per a nadons i nens menors de 3 anys ("Commission Regulation (EU) 2018/213 of 12 February 2018 on the use of bisphenol A in varnishes and coatings intended to come into contact with food and amending Regulation (EU) No 10/2011 as regards the use of that substance in plastic food contact materials", 2018). Recentment, la EFSA ha publicat una revisió sobre els riscos de la presència de BPA en productes alimentaris, reduint la ingesta tolerable diària (TDI) a 0,2 ng/kg de pes corporal, 20.000 vegades inferior a l'anterior establert ("Re-Evaluation of the Risks to Public Health Related to the Presence of Bisphenol A (BPA) in Foodstuffs," 2023). El BPA és un disruptor endocrí que presenta una estructura simètrica composta per $C_{15}H_{16}O_2$ (**Figura 2**) (L. Li et al., 2015). Els dos grups benzè units als grups -OH permeten al BPA unir-se al receptor d'estrògen (ER) i actuant com un lligand clàssic dels ER- α i ER- β (Ullah et al., 2018).

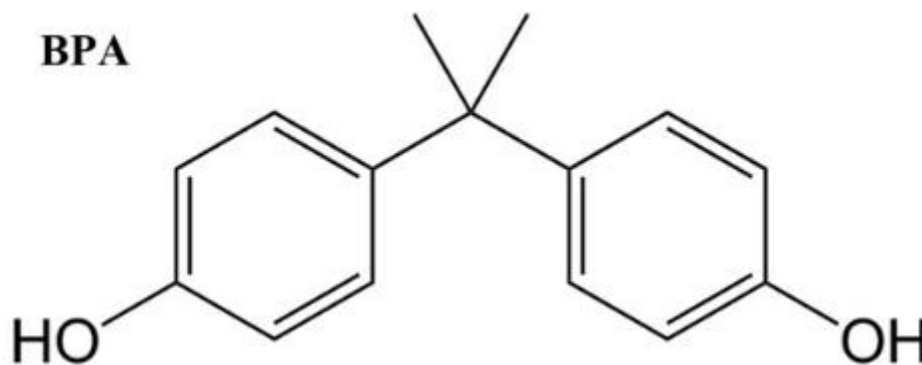


Figura 2. Estructura molecular del BPA (L. Li et al., 2015).

En testicle de rata, l'activitat peroxidasa (POD) es veu minvada significativament, mentre que la peroxidasa lipídica (LPO) es veia augmentada; ROS també augmenta significativament (Ullah et al., 2018). En pulmó, el BPA augmenta significativament l'expressió del Factor de Necrosi Tumoral Alfa (TNF- α), marcador proinflamatori, així com també del gen codificant per a la colagenasa tipus IV (MMP2); histopatològicament, s'observa una lleugera inflamació dels alvèols i vasos sanguinis dilatats i congestionats a les 6 setmanes; a les 12 setmanes, s'observa dany alveolar sever i una major congestió i infiltració nuclear greu (Rehman et al., 2021). En ratolins mascle recent nats, l'exposició a BPA prenatal i durant l'època perinatal causa un augment del pes total i fetge. S'observa un augment de l'activitat alanina-aminotransferasa (ALT), triglicèrids (TG) i malondialdehid (MDA) mentre que disminueixen l'activitat SOD, GSH-px, l'activitat catalasa (CAT) i els

nivells de glutatió (GSH). En quant a histopatologia, es veu una gran acumulació de lípids i expansió d'hepatòcits (Z. Meng et al., 2019).

En quant als efectes dels microplàstics, en ratolins, per via oral, el PS causa una acumulació dosi dependent d'aquests en fetge, ronyons i intestí, presentant en aquest una major acumulació i canvis en l'estructura i gruix de la capa mucosa. Als tres teixits hi ha un augment de les espècies reactives d'oxigen (ROS) així com una major activitat de la superòxid dismutasa (SOD), que transforma superòxids en oxigen (Choi et al., 2021). En ronyó, a més, el PS pot causar necrosi, augment significatiu de marcadors inflamatoris, infiltració de cèl·lules inflamatòries i desprendiment de l'epiteli tubular (X. Meng et al., 2022).

Per altra banda, els microplàstics de PE, essent el polímer més simple $(CH_2-CH_2)_n$, de cadena no ramificada i químicament inert, provoquen disbiosi (alteracions en la microbiota intestinal), augmenten la quimiocina de regulació per activació expressada i secretada pels limfòcits T (RANTES) i les interleucines 1-alpha (Il-1 α) i 9 (Il-9), marcadors de resposta inflamatòria. A més, poden regular el nombre de cèl·lules Th17 i Treg (relacionades amb la resposta immunològica) alterant la diversitat de la microbiota intestinal (X. Li et al., 2020).

De forma general, per via intranassal els MPs inferiors a 200 nm poden travessar la mucosa entrant en el sistema circulatori i causant toxicitat altres òrgans, mentre que els MPs de 200 nm s'acumulen principalment en fetge i ronyons (J. Huang et al., 2022). L'exposició per via intratraqueal de microplàstics de PS indueix fibrosi pulmonar causant un augment dosi dependent de l'estrès oxidatiu (disminueix SOD, augmenta la glutatió peroxidasa (GSH-px) i s'activa el factor nuclear eritroide similar al factor 2 (Nrf2), relacionats amb la protecció i resistència front a l'estrès oxidatiu), així com augmentar marcadors de cèl·lules fibrogèniques activades com l'alpha SMA (α -SMA) i augment de l'expressió de colàgen (Zhang et al., 2022).

Segons els estudis esmentats anteriorment, es coneixen els efectes de MPs i BPA lliures, però no existeix bibliografia suficient a la qual s'analitzin els possibles efectes sobre la salut del BPA procedent de la lixiviació dels MPs, actuant aquests com a vector.

Hipòtesi i Objectius

En base a la exposició ubiqua als MPs i BPA, els equips del Dr. Josep Mercader Barceló (Dr. en Bioquímica) i Dr. Manuel Miró Lladó (Dr. en Química Analítica) treballen en un projecte col·laboratiu, amb títol "Plataformas analíticas fluidicas para evaluar la exposición humana y ambiental a contaminantes emergentes (PID2020-117686RB-C33)", que tracta d'analitzar la biodisponibilitat i assimilació dels additius presents en els MPs. Aquest TFG

s'emmarca com a part inicial del projecte esmentat, en concret, en la preparació i posta a punt de varis procediments inclosos en l'estudi de la biodisponibilitat del BPA adsorbit a MPs.

Objectius específics:

- 1) Verificar l'eficàcia d'un protocol de neteja del material de laboratori per evitar la contaminació per BPA a les mostres biològiques.
- 2) Optimitzar la quantificació del BPA a mostres de plasma de rata per LC-MS.
- 3) Seleccionar els vehicles per administrar BPA lliure i BPA adsorbit a PE per *gavage* a rates.
- 4) Dissenyar la fase I de l'experiment animal (pilot) i comprovar la viabilitat del procediment.

Material i Mètodes

Materials

- [BPA](#)

Bisphenol A Sigma Aldrich (CAS-No. 80-05-7) 99% puresa (239658-50g)

- [PE-BPA: proveïdor, concentració de BPA en les partícules de PE](#)

Bisphenol A in Polyethylene SPEX (Lot. NA230104002) Catalog number (SVO-CPUK-319-5) 5g; Bisphenol A (CAS-No. 80-05-7) Puresa 99%, Labeled 1000 µg/g, Certified 1001 µg/g, Uncertainty ±26 µg/g

Bisphenol A in Polyethylene SPEX (Lot. ND230418005) Catalog number (SVO-CPUK-477-5G) 5g; Bisphenol A (CAS-No. 80-05-7) Puresa 99%, Labeled 3000 µg/g, Certified 3002 µg/g, Uncertainty ±363 µg/g

- [Polietilè](#)

Polyethylene QC Standard Blank (Lot. CT170614030) Catalog number (CRM-PEBLK)

- [Carboximetilcel·lulosa](#)

Sodium Carboxymethyl cellulose Sigma Aldrich (Lot # MKCP3002) Mw ~90.0000 (419273-100g)

- Oli de blat de les Índies

Corn oil Thermo Scientific Cat. No: 405435000 Lot: A0444160; 500g CAS: 8001-30-7

- Aigua Mili-Q

W6-212 Water; Fisher Chemical (Lot. 216534) 2,5 L; Optima® LC/MS; 0,03 micron filtered

Neteja del material de laboratori

Degut a la presència ubiqua del BPA en l'ambient, present també a material de laboratori (Ye et al., 2013b), i per tal de garantir la màxima neteja i evitar qualsevol possible contaminació, es va necessitar establir un protocol per a la neteja de material tant no volumètric com volumètric, emprant sempre que fos possible material de vidre o metall (excepte les puntes de micropipeta o taps).

Per als materials volumètrics (matrassos aforats per exemple) o que eren de plàstic (com els taps dels vials), degut a la impossibilitat d'emprar mufla (un forn emprat en laboratori per a la calcinació o secat de substàncies ja que permet ajustar la temperatura), al nostre laboratori es va elaborar un protocol de neteja per polaritat seguint les indicacions del Dr. Manuel Miró Lladó, catedràtic de química a la UIB, essent aquest tipus de protocols comuns a la literatura (Baker et al., 1976). Es va decidir emprar els següents compostos per maximitzar la neteja: primer aplicar una mescla de diclorometà-hexà (50-50), ambdós essent dissolvent orgànics, emprats per a l'eliminació dels compostos més apolars degut a una major facilitat d'evaporació d'aquests tipus de compostos; destacar que el diclorometà-hexà és un compost tòxic de fàcil evaporació i per tant s'ha de realitzar el procés en campana, apart de per garantir una major netedat. Seguidament es va deixar eixugar a l'aire. Posteriorment es va fer una neteja amb metanol pur i es va deixar assecar a l'aire. Finalment es va aplicar aigua Mili-Q pura (W6-212 Water; fisher chemical; Optima® LC/MS; 0,03 micron filtered) per arrossegar els compostos més polars, així com evitar possible toxicitat a les rates per compostos no evaporats, llavors es va eixugar a l'aire o amb nitrogen gas. Un cop eixut es tapava el material amb paper d'alumini i guardava en estufa a 37°C.

El material no volumètric de vidre o metall pot ser sotmès a la mufla, per tant es netejava amb aigua i sabó en la pica, es va rentar amb aigua Mili-Q i aclarar amb acetona. Posteriorment s'assecava a l'aire. Tot aquest procés es duia a terme per evitar fer malbé el material a l'hora de muflar. Un cop el material era eixut completament es tapava amb paper d'alumini i es muflar a 400°C entre 1:30 h i 2:00 h. Finalment es conservava en estufa a 37°C.

Cromatografia líquida-espectrometria de masses (LC-MS)

La cromatografia líquida amb espectrometria de masses (LC-MS) (**Figura 3**) és una tècnica analítica que combina la resolució de la cromatografia líquida (LC) que permet separar, amb la capacitat de detecció selectiva de l'espectrometria de masses (MS), que permet identificar, quantificar i caracteritzar mescles complexes de compostos químics. LC-MS funciona de la següent manera:

1. Cromatografia líquida (LC): la mostra s'injecta en el sistema de cromatografia líquida, que consisteix en una columna de cromatografia líquida d'alta pressió (HPLC). La columna conté una fase estacionària, com un sòlid amb porositat o una superfície recoberta de líquid, en el nostre cas essent una C-18 porosa (Luna Omega) de 2,6 μm de mida de partícula i 3 mm d'altura.
2. Separació: conforme la mostra travessa la columna, els components interactuen amb la fase estacionària en funció de les seves propietats fisicoquímiques, la qual cosa condueix a la seva separació. Els compostos amb interaccions més fortes queden més temps retinguts a la columna, mentre que els compostos amb interaccions més febles hi passen més ràpidament.
3. Ionització: després de la separació, els components individuals entren en l'espectròmetre de masses. A la font de ionització, les molècules es converteixen en ions en fase gasosa.
4. Anàlisi de masses: les molècules ionitzades s'introdueixen en l'analitzador de masses, que sol basar-se en una de diverses tècniques, i separa els ions en funció de la seva relació massa-càrrega (m/z).
5. Detecció i anàlisi de dades: els ions separats són detectats per un detector que genera un senyal elèctric proporcional a l'abundància de cada ió. Les dades són processades i analitzades per un sistema informàtic, que produeix un espectre de masses representant les abundàncies d'ions en funció dels seus valors m/z .
6. Identificació del compost: l'espectre de masses obtingut es compara amb una base de dades d'espectres de masses coneguts per a identificar els compostos presents en la mostra. La identificació es basa en el mesurament precís de la massa i en el patró de fragmentació dels ions.
7. Quantificació: la LC-MS també pot utilitzar-se per a l'anàlisi quantitativa comparant la intensitat dels senyals iònics de la mostra amb les de patrons coneguts, poguent determinar la concentració o abundància relativa de compostos específics.

- [Recta de calibratge](#)

La recta de calibratge consistia en una recta de 10 mostres en dilució seriada $\frac{1}{2}$ en vials amb inserts. Al primer vial (P9) s'afegiren 80 μL de solució intermitja de dopatge (mescla de compostos explicada més endavant a la memòria) a 100 parts per bilió (ppb) (1 ppb = 0,001 mg / L) i 120 μL de metanol (concentració final dopatge = 40 ppb). A la resta de vials (P8-P0) s'afegiren 100 μL de metanol. Es va vortejar i es realitzaren dilucions seriades fins a P1 passant 100 μL del vial anterior vortejant entre cada pas. Finalment s'afegiren a tots els vials 5 μL de la solució intermitja a 100 ppb de patró intern (descrit més endavant). També es va preparar un vial amb 1 mL de metanol per netejar entre mostres.



Figura 3. Imatge de LC-MS emprat per a l'anàlisi de les mostres de plasma (Serveis Científicotècnics, UIB).

[Anàlisi de BPA en plasma de rata per LC-MS](#)

En proves realitzades en la posta a punt d'aquest protocol d'anàlisi, va sorgir la idea de baixar el pH del plasma per a millorar l'eficiència de l'enzim emprat a l'hora d'analitzar les mostres (explicat més avall en aquest apartat), ja que els resultats previs obtinguts pel grup no eren satisfactoris pel fet de no observar-se correctament la desglucuronització del BPA-glucuronidat (BPA-G) en BPA (explicat més endavant), per tant, es va contemplar l'ús d'un

tampó d'Acetat d'Amoni 5 mM (pH = 6,6) + Àcid Fòrmic 1% (pH = 2) per baixar el pH del plasma fins a un pH òptim per a l'esmentat enzim, ja que les proves anteriors es realitzaren a pH del plasma ($\text{pH}_{\text{plasma}} \approx 8$).

Es retolaren vials marrons de vidre d'1,5 mL amb els grups experimentals: Blanc sense tampó (BS), Blanc amb tampó (BT), Dopat sense tampó (DS) i Dopat amb tampó (DT). Es pipetejaren 100 μL de plasma de rata Wistar (BW) per vial ($\text{pH}_{\text{plasma}} = 8$). Les mostres sense tampó es congelaren a -20°C per al dia següent degut a la durada d'una de les passes del protocol. A les mostres amb tampó s'afegiren 40 μL de tampó Acetat d'Amoni 5 mM (pH = 6,6) per baixar el pH del plasma. Posteriorment s'afegiren 17 μL d'Àcid fòrmic 1% (pH = 2) per un $\text{pH}_{\text{plasma}} \approx 5$. Seguidament es sotmeteren els vials a ultrasons durant 5 minuts per acabar de disgregar i alliberar els compostos i les possibles restes cel·lulars que podrien romandre al plasma. S'afegiren 5 μL de dopatge a les mostres no congelades que ho precisaven, així com es pipetejaren 5 μL de patró intern a totes les mostres (elaboració explicada més avall). Es va vortejar i s'incubà 1 h. Es va afegir l'enzim β -Glucuronidasa (*Helix Pomatia*, pH òptim segons la casa comercial Sigma Aldrich de l'activitat glucuronidasa = 5), que catalitza la reacció d'hidròlisi de residus d'àcid β -D-glucurònic, als grups amb tampó. Degut a que l'enzim venia en una solució mare a 100.000 unitats catalítiques (u.c.) es va realitzar una solució intermitja a 400 u.c. en 5 mL i d'aquesta es pipetejaren 10 μL en els vials amb tampó per a obtenir 23 u.c. finals (Marciniak et al., 2006) per evitar una mala detecció dels compostos per excés d'enzim. Es va vortejar suaument i es va deixar incubar a 37°C 24 h.

El dia següent es retiraren les mostres sense tampó del congelador i se'ls hi varen aplicar ultrasons durant 5 minuts. Posteriorment es va realitzar el dopatge a les mostres que ho precisaven i es va afegir el patró intern preparat. Es vortejaren les mostres i es va deixar en repòs 1 h. Es varen retirar totes les mostres de la incubadora i es varen passar per la màquina Visiprep (**Figura 4**), una màquina de filtració per buit, on s'empren guies (tubs de plàstic que connecten les columnes amb els vials) i columnes de filtració (Agilent Captiva EMR-Lipid, 1 mL 40 mg 100/pk). Es va desenroscar el tap i es van col·locar en les guies amb precaució degut a la seva fragilitat, es tornaren a tapar i es col·locaren vials nous prèviament retolats dintre la visiprep. Es va tapar i es posicionaren les columnes de filtració a sobre. A les columnes es va afegir tot el contingut dels vials i un volum d'acetonitril (ACN) amb àcid fòrmic a l'1% en proporció 80:20 equivalent a tres cops el volum del vial (individualitzat per cada vial) i es va deixar reaccionar 5 minuts. Un cop passat el primer filtre s'assecaren els vials amb gas nitrogen i es van tornar a passar per la columna de filtració, tot i que ara l'ACN es va mesclar amb aigua Mili-Q en proporcions 80:20 i es va deixar

reaccionar 5 minuts previs a l'activació de la bomba de buit. S'assecaren els vials amb gas nitrogen i es va realitzar la preparació de les mostres per LC-MS.



Figura 4. Màquina Visiprep amb les columnes de filtració a sobre i les guies a l'interior.

- **Dopatge**

Es va preparar el dopatge consistint en una mescla de BPA i BPA-G en metanol, partint d'una solució mare a una concentració d'1 part per milió (ppm) ($1 \text{ ppm} = 1 \text{ mg/L}$) de cada component, volent obtenir una solució final a 5 parts per bilió (ppb) de cada component de la mescla ($1 \text{ ppm} = 1000 \text{ ppb}$). Primer es va realitzar una solució intermitja a 100 ppb en 1 mL de metanol degut a no poder pipetejar el volum necessari per a realitzar la solució requerida; d'aquesta s'agafaren $5 \mu\text{L}$ i es dissolgueren en $100 \mu\text{L}$ de metanol per a la solució final.

- **Patró intern**

Es va preparar un patró intern que portaven totes les mostres per corregir-les, consistent en una mix de BPA deuterat (BPAD) (BPA al qual s'han substituït els àtoms d'hidrogen per deuteri, un hidrogen amb un protó i un neutró al seu nucli amb el doble de massa atòmica), i BPA-G C13. El patró intern provenia d'una solució mare a la mateixa concentració que el dopatge, realitzant els mateixos càlculs per a una concentració final a 5 ppb.

- **Lectura de les mostres per LC-MS**

Als vials s'afegiren $100 \mu\text{L}$ de metanol. Es va vortejar 1 minut i s'aplicaren ultrasons 15 minuts. Als vials originals es va retirar tot el volum restant, s'afegiren inserts i es va tornar a

afegir el contingut dels vials. Es mantingueren els vials en gelera a 4°C per el seu anàlisi per LC-MS.

Un cop es rebien les dades, un membre del laboratori les analitzava amb el programa TraceFinder, de la casa comercial Thermo Fisher, que interpreta els arxius, i orbitrap, un mòdul d'anàlisi, integrant les àrees generades per cada compost, comprovant prèviament les mostres, la recta del patró intern i la recta de calibratge (Figura 5).

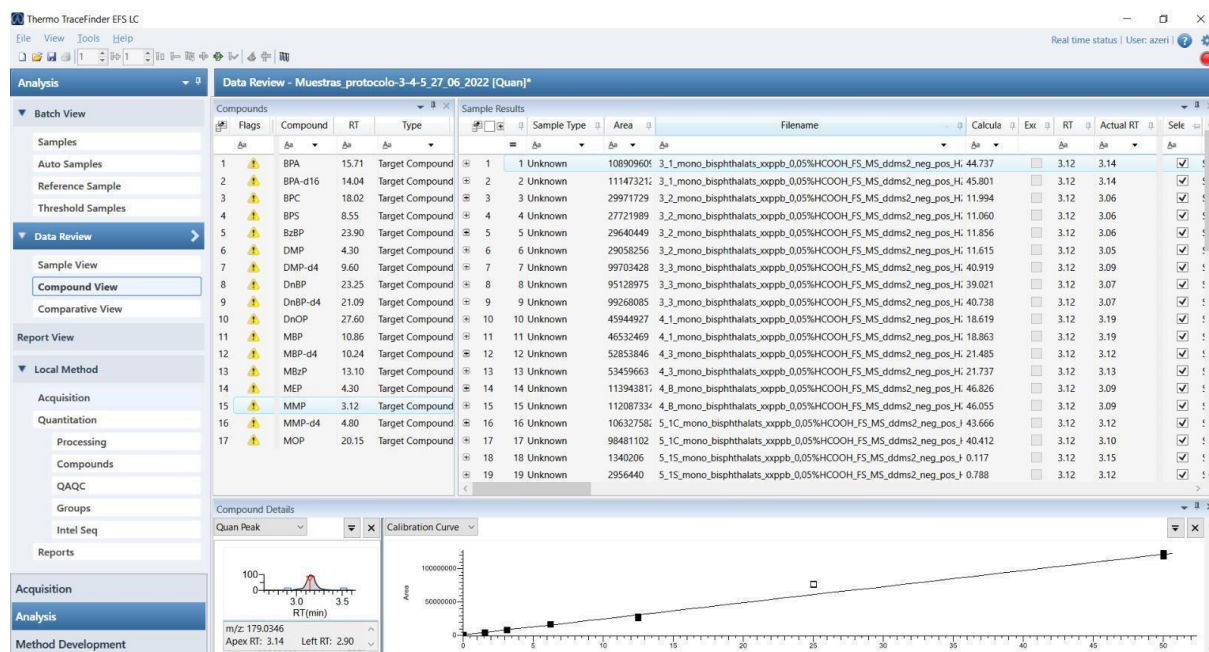


Figura 5. Mostra de la disposició del programa TraceFinder (Crèdit: Alberto Fuster Aparisi).

- **Influència de la concentració de B-glucuronidasa en la identificació de BPA a mostres de plasmes**

Degut als resultats obtinguts a l'anàlisi de BPA en plasma de rata en afegir el tampó, es va realitzar una comprovació de l'eficàcia de la β -Glucuronidasa a diferents concentracions d'unitats catalítiques amb mostres: blanc amb plasma, i enzim a 25, 50, 100, 200 i 400 u.c. Aquesta comprovació es va dur a terme seguint el mateix protocol per l'anàlisi de BPA en plasma de rata, modificant el volum afegit d'àcid fòrmic 1% de 17 μ L a 21 μ L per un $\text{pH}_{\text{plasma}}$ final = 5. Finalment es va realitzar la preparació de les mostres per al LC-MS i la recta de calibratge de la mateixa forma que s'esmenta anteriorment.

Avaluació de la idoneïtat dels vehicles per administrar PE-BPA i BPA lliure per gavage a rates

Com a vehicle per a la dispersió del BPA-PE es va elegir carboximetilcel·lulosa (CMC), es van realitzar proves a diferents concentracions de CMC per analitzar com canviava el temps de retenció després d'haver agitat del BPA-PE en el vehicle ja que el PE és hidrofòbic i no soluble en CMC.

S'empraren concentracions de CMC a 0,5%, 2%, 4,5% i 5%. La preparació es mostra a continuació:

En un vas de precipitats mufat, es dissolgueren 0,5 g de CMC en pols en 100 mL d'aigua Mili-Q pura en agitació i calor (evitant sempre l'ebullició). Es prepararen seguint l'anterior procediment les concentracions de 2% i 4,5%.

Per a la concentració al 5%, es dissolgueren 2,5 g en 50 mL d'aigua Mili-Q pura.

Per al BPA lliure es van intentar solubilitzar en CMC, etanol, aigua i oli de blat de les índies. Tot el material emprat s'ha netejat prèviament seguint els protocols establerts.

- [Viabilitat de les cànules per a l'administració del vehicle amb BPA-PE en rates](#)

Per a la comprovació que les cànules (d'acer inoxidable i 1,50 mm de calibre) i les xeringues (3 xeringues de 2 mL, 5 mL i 10 mL de capacitat i 1,50, 0,87 i 1,50 mm de calibre a la part més estreta) eren adequades per administrar la dispersió de BPA-PE integrada en CMC es va realitzar una prova amb PE integrat en CMC 5% en agitació constant en un vas de precipitats de 50 mL. Es va realitzar sobre un agitador sense calor agafant amb una de les xeringues 2 mL de solució sobre la meitat del vas de precipitats. La neteja de la sonda es va realitzar segons el protocol de neteja per polaritat prèviament descrit.

- [Simulació de les condicions experimentals](#)

Per a comprovar si el PE quedava integrat en el vehicle de CMC, es va realitzar una prova en agitació amb 9 mL de CMC a la qual es van administrar 1,6 mg de PE. Aquesta administració es va dur a terme sobre un agitador. La CMC es va realitzar mitjançant el mateix protocol establert anteriorment al 5%.

Administració dels compostos per gavage a rates

Aquest estudi fou aprovat pel CEEA i autoritzat per la Conselleria d'Agricultura, Pesca i Alimentació amb el codi de referència: 2021/02/AEXP.

Els compostos (4 grups experimentals: Control Oli de blat de les índies, Control CMC al 5%; BPA lliure en Oli; BPA-PE (1000 µg de BPA / g_{PE} + CMC al 5%) foren administrats per gavage directament a l'estómac de rates (Wistar) (n=20, 10 femelles i 10 mascles) d'entre 10-12 mesos d'edat (nascudes entre el 18/05/22 i el 13/07/22). La quantitat de BPA que es va administrar a les rates fou de 2 mg / kg de pes corporal de BPA lliure i 2 mg / kg de pes corporal de BPA adsorbit a PE, implicant una administració de 2 g de PE / kg de pes corporal.

Es pesaren totes les rates i es va calcular la quantitat necessària de BPA i BPA-PE per a les rates que precisaven, llavors, s'administraren els compostos segons el grup experimental (Figura 6).

ID animal	Grup Experimental	Codi gàbia	Marca cua	Sexe	Pes corporal (g)	Volum Gavage (mL)	Tipus Gavage
1	Oli	502	con	Masclle	570	0,905	Corn oil
2	Oli	428	con	Femella	301	0,478	
3	Oli	502	sin	Masclle	490	0,778	
4	Oli	428	sin	Femella	300,5	0,477	
5	CMC	533 (azul)	sin	Masclle	511,7	5,117	CMC
6	CMC	459	con	Femella	287,8	2,878	
7	CMC	533	con	Masclle	528,6	5,286	
8	CMC	459 (amar.)	sin	Femella	321,8	3,218	
9	BPA	505 (azul)	con	Masclle	468,3	0,743	Corn oil+BPA
10	BPA	577	con	Femella	298,7	0,474	
11	BPA	505 (amar.)	sin	Masclle	531	0,843	
12	BPA	577	sin	Femella	313,2	0,497	
13	BPA	605 (amar.)	con	Masclle	492	0,781	CMC+PE-BPA
14	BPA	604	con	Femella	355,6	0,564	
15	PE-BPA	604	sin	Femella	265,1	2,651	
16	PE-BPA	605 (azul)	sin	Masclle	501,9	5,019	
17	PE-BPA	602	con	Femella	267,8	2,678	CMC+PE-BPA
18	PE-BPA	601 (azul)	con	Masclle	466,1	4,661	
19	PE-BPA	602	sin	Femella	281,7	2,817	
20	PE-BPA	601 (amar.)	sin	Masclle	502,1	5,021	

Extracció sang		
t=0,5	t=2	t=6
t=1	t=4	t=24

Figura 6. Taula amb el pes, sexe i càlculs de dosificació de les rates per a cada grup experimental. En color es veuen les agrupacions per a les extraccions de sang als diferents temps (en hores).

Les extraccions de sang per el futur anàlisi de biodisponibilitat es realitzaren dia 29/05/2023 a totes les rates com a temps 0, i els dies 30/05/2023 i 31/05/2023 en els punts 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 24 h a partir de la safena de la cama, recollida en microvette de 250 µL de

capacitat, i es conservaren en gel fins el moment de l'aïllament del plasma. Per aïllar el plasma es centrifugaren les microvette 10 min a 3600 rpm i finalment es congelaren a -20°C.

El dia 31/05/2023 es va dur a terme el sacrifici per sobredosi anestèsica amb isoflurà, amb confirmació per tall de l'aorta, extracció de sang per punció cardíaca emprant tubs amb i sense EDTA (ainticoagulant) i l'extracció de teixits. Els teixits que es van extreure foren: femta, contingut del cècum, intestí jejú, teixit adipós blanc (TAB) mesentèric, TAB retroperitoneal, TAB inguinal, ovari, testicles, úter, pulmó, fetge, ronyó, cervell, cor, melsa i múscul. Les mostres es dividiren en 1-4 porcions, foren congelades en nitrogen líquid i posteriorment congelades a -80°C. L'obtenció del plasma es va fer centrifugant la sang 20 minuts (T = 4°C) a 3500 rpm. Per al sèrum es va centrifugar la sang dels tubs sense anticoagulant 10 minuts a temperatura ambient a 1400 rpm.

Resultats

1) Neteja del material de laboratori

Els resultats dels blancs amb aigua indiquen que els nivells de ppb acumulats al llarg dels protocols emprats per anàlisi del BPA lliure després d'haver emprat el protocol de neteja per als materials de vidre són propers a 0, únicament essent superiors a 0,1 ppb en els nivells de BPA lliure, suposant una molt baixa contaminació que es resta als resultats obtinguts en l'anàlisi de BPA lliure (**Figura 7**).

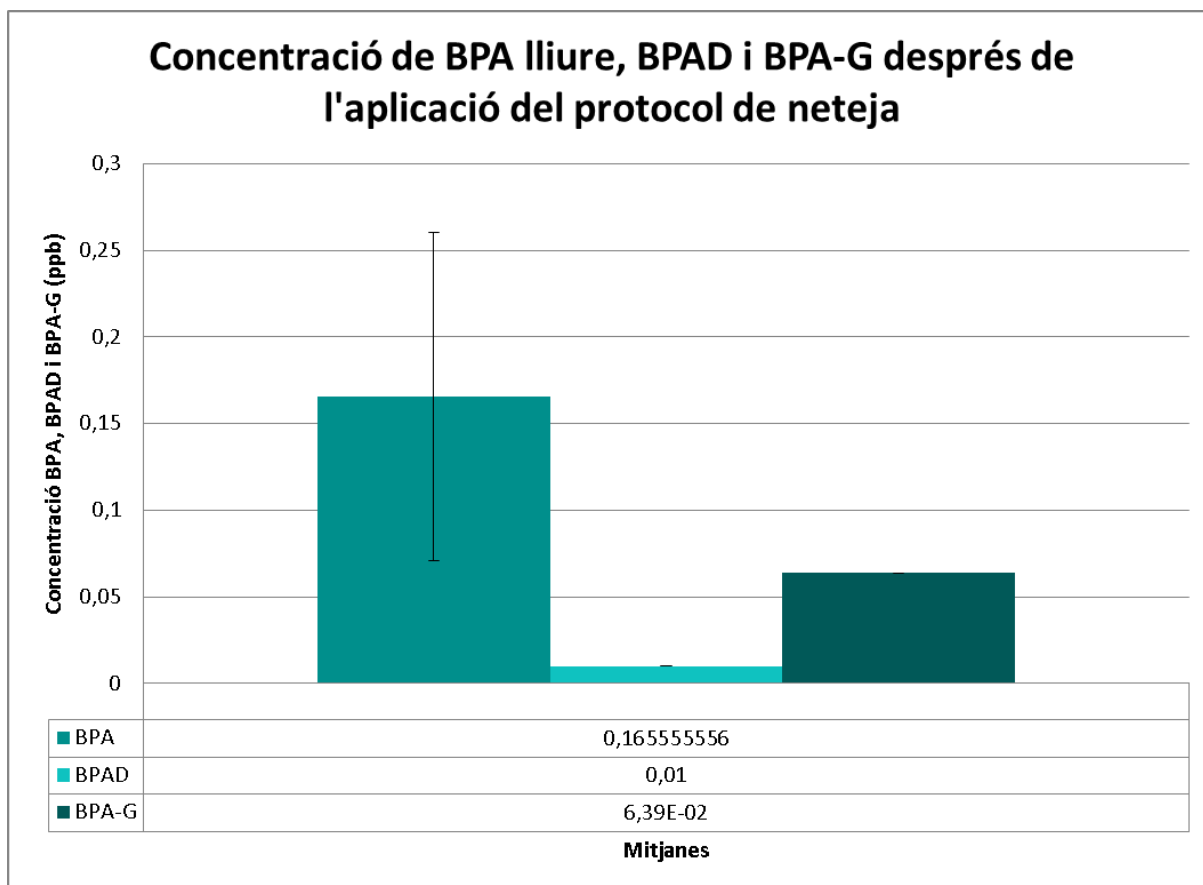


Figura 7. Gràfica on es representen les mitjanes i desviacions estàndard dels nivells de BPA (n = 10), BPAD (n = 10) i BPA-G (n = 10) en ppb dels blancs provinents de l'anàlisi de les dades obtingudes a partir dels arxius generats per el LC-MS.

2) Concentració de BPA a plasma de rata

Al grup BS (100 μ L de plasma de rata i 5 μ L de patró intern) s'aprecien prop de 0 ppb de BPA i 13 ppb de BPA-G corresponent a les concentracions bassals que hi havia al plasma. Al grup BT (plasma, patró intern, 57 μ L de tampó Acetat d'Amoni 5 mM + Àcid fòrmic 1% i 10 μ L d'enzim β -Glucuronidasa), es podia veure una disminució del BPA-G proporcional a l'augment del BPA (\approx 5 ppb), segurament degut a l'incorporació del tampó, baixant el pH a nivells òptims per a la β -Glucuronidasa. En el grup DS (plasma, patró intern i 10 μ L de dopatge) es pogueren observar les quantitats basals del plasma amb l'addició de les 5 ppb de BPA i BPA-G afegides mitjançant el dopatge, no observant activitat enzimàtica alguna. En el darrer grup, el DT (plasma, patró intern, tampó, dopatge i enzim), es podia veure com amb el tampó la β -Glucuronidasa va començar a realitzar la seva funció, desglucuronitzant el BPA-G en BPA, observant una disminució de 10 ppb dels nivells de BPA-G respecte a DS i un augment de 7 ppb en quant al BPA lliure, essent una desglucuronització de BPA-G en BPA en el grup DT inferior a l'esperada (**Figura 8**). Observem que, tot i que les sumes de BPA lliure i BPA-G en els grups DS i DT haurien de ser iguals, el grup DT presenta 3 ppb

menys, possiblement degut a un error de pipeteig en aquest grup ja que no s'observa pèrdua en comparar els grups BS i BT, ambdós sumant 13 ppb.

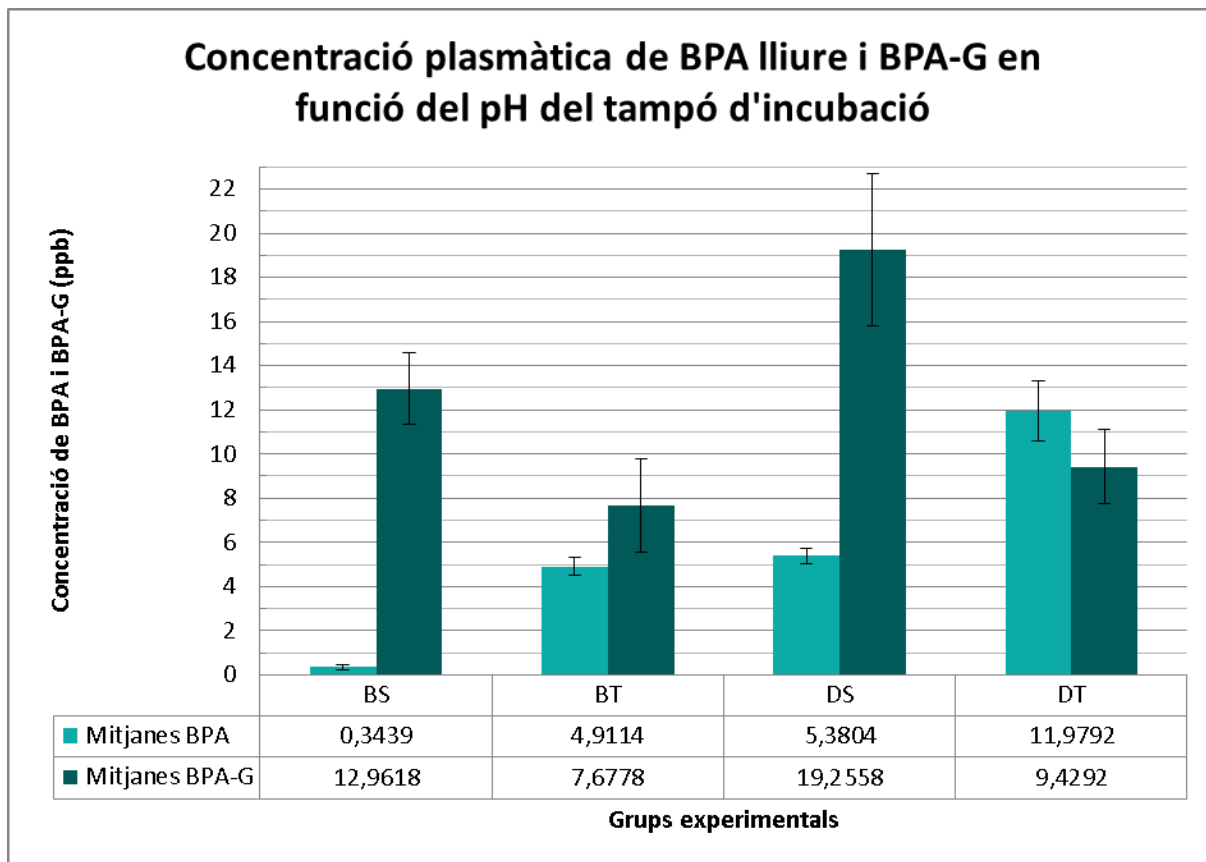


Figura 8. Gràfica on es representen les mitjanes i desviacions estàndard dels nivells de BPA i BPA-G en ppb dels grups experimentals Blanc sense tampó (BS) (n = 3), Blanc amb tampó (BT) (n = 3), Dopat sense tampó (DS) (n = 3) i Dopat amb tampó (DT) (n = 3) provinents de l'anàlisi de les dades obtingudes a partir dels arxius generats per el LC-MS.

- Eficàcia òptima de l'enzim β -Glucuronidasa

Degut a una avaria del LC-MS no ha sigut possible l'anàlisi dels resultats a temps de l'entrega d'aquesta memòria.

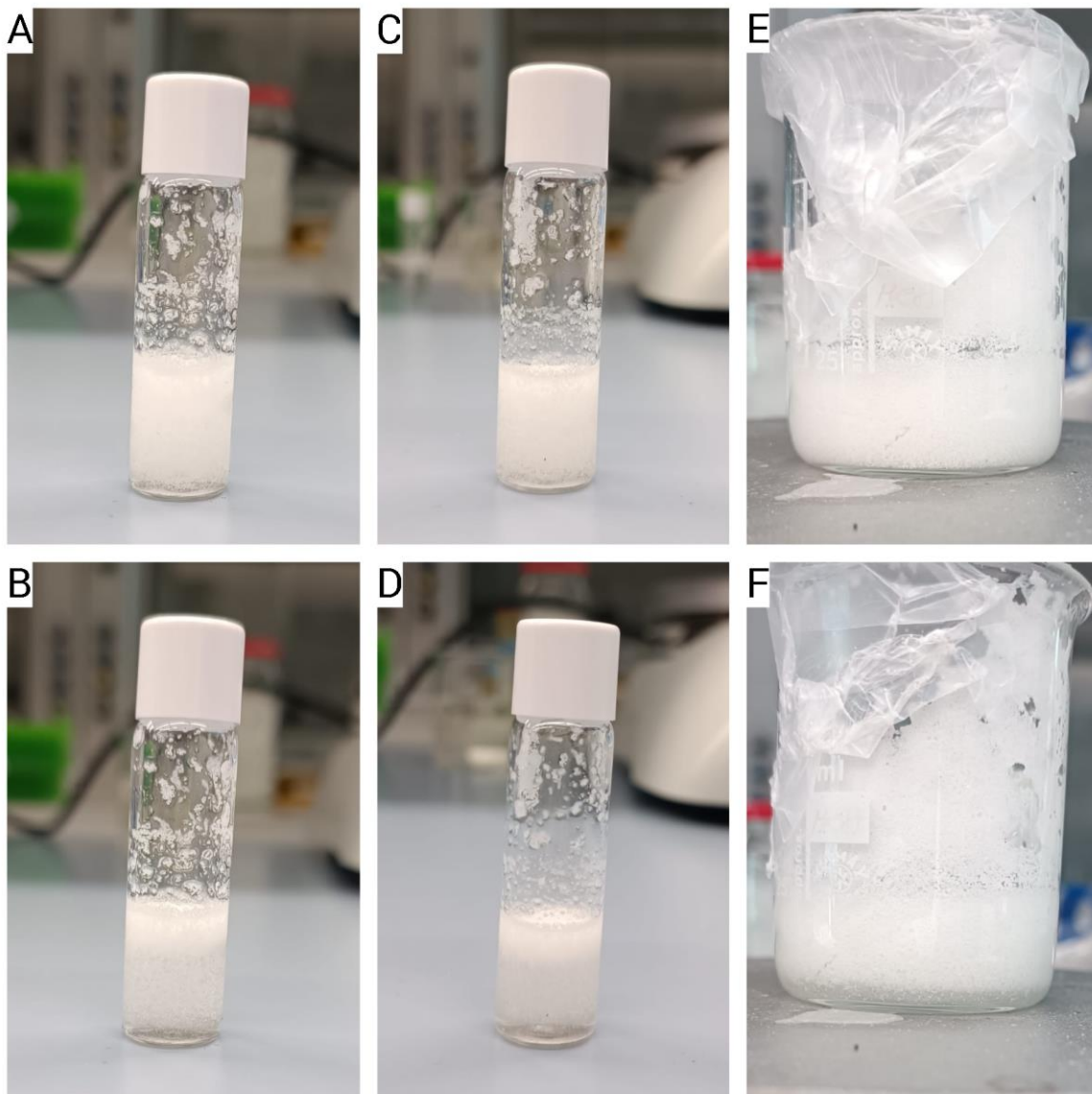
3) Idoneïtat dels vehicles per administrar PE-BPA i BPA lliure

- Proves de vehicle per al BPA-PE amb CMC

Es pot observar a la **figura 9** que a la concentració de CMC 0,5% hi ha una nul·la capacitat de retenció, augmentant aquesta capacitat de forma pronunciada segons s'augmenta la concentració de CMC. Degut a que per administrar el gavage es necessiten almenys 2 minuts (preparació de la rata, preparació de la cànula i administració), el temps de retenció desitjat havia de ser superior. A la **figura 10** es pot observar la separació de fases (PE verge i CMC) segons els temps de retenció de les concentracions de CMC 2 %, 4,5 % i 5 %.

Concentració CMC (%)	Temps de retenció (min + s)
0,5	—
2	0 min 39 s
4,5	2 min 19 s
5	5 min

Figura 9. Taula on es poden observar els temps de retenció del PE en CMC segons la concentració en tant per cent (%) d'aquesta.



Figures 10. Imatges dels vials amb PE verge en: CMC 2% als t = 0 s (A) i t = 39 s (B); CMC 4,5 % als t = 0 s (C) i t = 2 min 19 s (D) i vas de precipitats amb PE verge en CMC 5 % als t = 0 s (E) i t = 5 min (F).

- [Proves de vehicle per al BPA lliure](#)

Per al BPA lliure es va fer una revisió bibliogràfica on es va trobar una gran quantitat de vehicles emprats (CMC, acetona, etanol, aigua, oli de blat de les índies, etc.) (Choi et al., 2021; Rehman et al., 2020; Z. Meng et al., 2019; X. Li et al., 2022). D'aquests se'n van seleccionar 4 (CMC etanol, aigua Mili-Q i oli).

Es va preparar un vehicle de CMC (5%) dissolent poc a poc 2,5 g de CMC en 50 mL d'aigua en un vas amb aplicació de calor i agitació. Posteriorment es van afegir 20 mg de BPA lliure. No es va dissoldre.

L'etanol fou suggerit com a vehicle intermig per al BPA lliure (ja que aquest darrer és soluble) per a després tractar-ho de incorporar a una solució de CMC (5%) i així només tenir un sol grup control. Es va realitzar una dissolució a 0,12 g / mL de BPA en etanol 96% i es va remenar amb vareta de vidre. Posteriorment es va incorporar al CMC (5%) on no es va integrar correctament.

Es va fer una dissolució a 0,0004 g / mL de BPA lliure en aigua Mili-Q en agitació sense aplicació de calor, de nou com a vehicle intermig per incorporar-ho amb CMC. No hi va haver dissolució.

Per a la prova amb oli es dissolgueren 0,01 g / mL de BPA lliure en oli de blat de les índies amb agitació i calor. El BPA es dissolgué en 30 minuts.

[4\) Administració dels compostos durant la fase pilot de l'experiment](#)

- [Vehicles del BPA-PE i BPA lliure](#)

Davant els resultats obtinguts es va elegir com a vehicle per al BPA-PE la dissolució de CMC al 5%.

Per a la prova pilot es decidiren emprar com a vehicle del BPA lliure l'oli, obligant així a tenir dos grups control en el disseny de l'experiment ja que l'oli lixivava el BPA del PE (K. E. Gonsalves et al., 1992) (**Figura 11**).

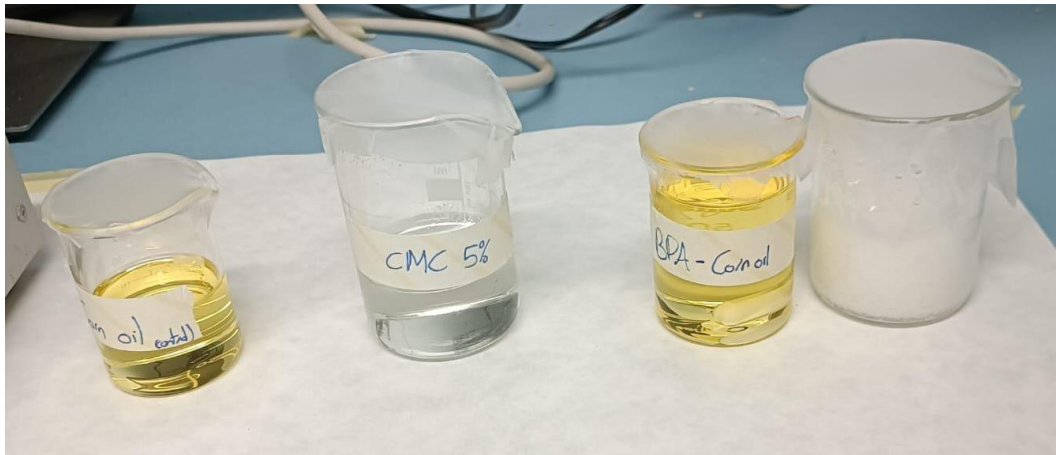


Figura 11. Imatge dels vehicles i els seus controls ja preparats emprats per l'administració a la fase pilot de l'experiment realitzada el dia 30/05/2023.

- **Prova en agitació per simular condicions experimentals**

Del vas de precipitats en agitació constant es canularen 2 mL de dispersió de CMC (5%) amb BPA-PE amb xeringa de vidre de 2 mL de capacitat i diàmetre = 1,50 mm a la part més estreta de la punta en un vial de vidre. No hi hagué cap mena de problema i el BPA-PE quedava integrat per a una canulació adequada (temps de retenció referit a resultats de la prova de vehicle per al BPA-PE amb CMC) (**Figura 12**).

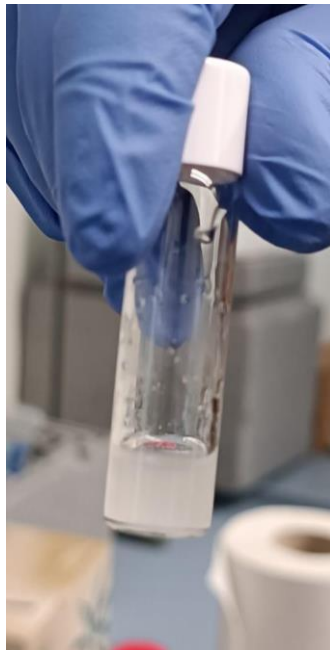


Figura 12. Imatge del vial en el qual es descartar el contingut de la cànula de la prova d'agitació.

El gavage per als 4 grups experimentals (mencionats a l'apartat de materials i mètodes) de la prova pilot es va dur a terme el dia 30/05/2023 a l'estabulari de la UIB per un usuari autoritzat.

La quantitat de BPA administrada a les rates fou de 2 mg / kg BW de BPA lliure i 2 mg / kg de pes corporal de BPA adsorbit a PE, implicant una administració de 2 g de PE / kg pes corporal. Aquesta dosi fou seleccionada ja que de forma idònia s'administrarien 10 mg BPA / kg BW (dosi més emprada en estudis de toxicologia), no obstant, implicaria l'administració de 10 g de PE / kg BW, essent excessiva. Per tant es va reduir la dosi per tal d'administrar un quantitat raonable de PE des del punt de vista ecotoxicològic.

Per als dos grups control, consistint un amb oli i l'altre amb CMC al 5%, així com per al grup al qual s'administra BPA lliure dissolt en oli, no hi hagué complicacions (**Figura 13**).

Al grup que va rebre BPA-PE en CMC (5%), degut a una mala dispersió del BPA-PE en CMC, així com problemes amb la cànula i la xeringa (en aquest cas es va emprar inicialment la xeringa de 5 mL de capacitat i 0,87 mm de diàmetre a la seva part més estreta i posteriorment es va intentar amb la xeringa de 10 mL i 1,50 mm de diàmetre), es va decidir suspendre l'administració per evitar perjudicar a les rates (rates 18, 19 i 20 no administrades).



Figura 13. Tècnica d'administració del *gavage* a les rates dia 30/05/2023. A la imatge es pot veure el moment en el que s'administra una de les rates control amb oli.

Discussió

Gràcies als resultats dels blancs amb aigua un cop analitzats amb LC-MS es pot apreciar com el protocol de neteja és efectiu, ja que s'observa molt poca quantitat de renou, que es pot atribuir a la contaminació generada pels materials de plàstic emprats durant el procés d'anàlisi (guies de la visiprep o taps dels vials) i a la pròpia brutícia del LC-MS.

En quant a les proves d'anàlisi del BPA lliure en plasma, on es volia comprovar l'eficàcia del tampó Acetat d'amoni 5 mM + Àcid fòrmic 1 % front a no emprar cap mena de tampó. Al grup BS es podien observar les concentracions basals del plasma de rata. Al grup BT, on hi va haver un augment proporcional del BPA en detriment del BPA-G (\approx 5 ppb), corresponent a l'activitat enzimàtica de la β -Glucuronidasa. En el grup DS, on es van afegir l'enzim (a 23 u.c.) i dopatge (5 ppb de BPA i 5 ppb de BPA-G), no s'observar pèrdua de compostos en l'anàlisi ja que es mantenien els nivells observats en BS amb l'addició dels nivells de dopatge, podent-lo comparar amb el grup DT, observant-se en aquest una gran disminució dels nivells de BPA-G respecte a DS, no obstant, aquesta conversió no fou del 100% com en el cas de BT, ja que s'observava una disminució de BPA-G de 10 ppb mentre que l'augment de BPA va ser de 7 ppb. Davant aquests resultats, apart del possible error humà, es va plantejar la possibilitat que la dilució intermitja a 100 ppb no fos correcta, no obstant, de ser així els nivells de BPA i BPA-G al grup DS no haurien sortit com s'esperaven. Per tant, es va hipotetitzar que l'eficiència de la β -Glucuronidasa no era del 100 % o es trobava saturada (degut als baixos nivells emprats), motiu pel qual es van decidir realitzar les proves sobre la concentració de u.c. òptimes per a la detecció del BPA i BPA-G (resultats no obtinguts per trencament del LC-MS).

Per a les proves de vehicle per al BPA-PE, es va observar que, tot i que la literatura emprava majoritàriament CMC (0,5%), en el nostre cas era inviable degut a les propietats hidrofòbiques del PE, motiu pel qual es decidí augmentar la concentració de CMC fins a trobar un temps de retenció dels MPs en el vehicle que permetés administrar a les rates la concentració de MPs desitjada, últimament escollint la concentració de CMC al 5% amb un temps de retenció de 5 minuts. El dia de l'administració no va funcionar correctament, essent diversos motius possibles l'experiència i velocitat d'administració dels encarregats i la tècnica emprada, així com no haver realitzat proves amb xeringues de volums superiors a 2 mL, a partir dels quals en l'administració les cànules s'obstruïren, i per evitar administrar quantitats incorrectes de PE (i per tant de BPA) es va decidir aturar l'administració al grup amb CMC (5%) + BPA-PE. La resta de grups foren tots correctament administrats sense problemes. En quant al per què de tenir dos grups control, un d'oli per al BPA lliure i un amb CMC dissolt en aigua, es va decidir degut a les propietats de lixiviació que l'oli presenta en

front al BPA-PE (K. E. Gonsalves et al., 1992), resultant en la impossibilitat d'administrar ambdós grups (BPA lliure i BPA-PE) amb el mateix vehicle.

Com s'ha comprovat a l'experiment pilot, hi ha limitacions presents en el procediment que s'han de resoldre per abordar la fase 2. Es planteja obtenir partícules a una càrrega major de BPA (3000 µg BPA / g_{PE}) que permetria minvar en tres cops la quantitat de PE per administrar a les rates, així com la possibilitat d'administració mitjançant una cànula amb major diàmetre (dues cànules de 4 mm i dues de 6,4 mm, ambdues d'acer inoxidable) evitar obstruccions d'aquesta i realitzar més proves de canulació tractant de replicar els temps i la tècnica d'administració que s'emprarà.

Conclusions

- 1) Els protocols de neteja per polaritat amb diclorometà-hexà, etanol i aigua, i mitjançant calcinació per mufla eliminen la contaminació de les mostres biològiques.
- 2) L'ús d'un tampó apunta a una millora de l'eficàcia de la β-Glucuronidasa en la quantificació del BPA en plasma de rata.
- 3) Els vehicles més adequats per a l'administració per *gavage* a rates per al BPA lliure i BPA-PE són l'oli de blat de les índies i CMC, respectivament.
- 4) Es necessita millorar la viabilitat del procediment en quant a preparació del vehicle per al BPA-PE i els instruments emprats a l'hora d'administrar a les rates.

Agraïments

- a Alberto Fuster Aparisi, per les seves ensenyances, guia i assessorament en el laboratori i en el curs de la meva estància.
- A Marta Llobera, per la seva ajuda i assistència en el laboratori a l'hora de comprendre procediments.
- A Gabriel Escarrer i Joan Truyols, per la resolució de dubtes que sorgiren al llarg de la meva estància.

Bibliografia

- Alimi, O. S., Budarz, J. F., Hernandez, L. L., & Tufenkji, N. (2018). Microplastics and Nanoplastics in Aquatic Environments: Aggregation, Deposition, and Enhanced Contaminant Transport. *Environmental Science & Technology*, 52(4), 1704-1724. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05559>
- Baker, F., Silverton, R., & Luckcock, E. D. (1976). Introduction to Medical Laboratory Technology. In *Elsevier eBooks*. <https://doi.org/10.1016/c2013-0-06213-5>

- Barnes, D., Galgani, F., Thompson, R. F., & Barlaz, M. A. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 364(1526), 1985-1998. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0205>
- Browne, M. A. O., Crump, P., Niven, S. J., Teuten, E. L., Tonkin, A., Galloway, T. S., & Thompson, R. F. (2011). Accumulation of Microplastic on Shorelines Worldwide: Sources and Sinks. *Environmental Science & Technology*, 45(21), 9175-9179. <https://doi.org/10.1021/es201811s>
- Browne, M. A. O., Dissanayake, A., Galloway, T. S., Lowe, D. J., & Thompson, R. F. (2008). Ingested Microscopic Plastic Translocates to the Circulatory System of the Mussel, *Mytilus edulis* (L.). *Environmental Science & Technology*, 42(13), 5026-5031. <https://doi.org/10.1021/es800249a>
- Choi, Y. S., Park, J. Y., Lim, Y. P., Seo, S., & Hwang, D. Y. (2021). *In vivo* impact assessment of orally administered polystyrene nanoplastics: biodistribution, toxicity, and inflammatory response in mice. *Nanotoxicology*, 15(9), 1180-1198. <https://doi.org/10.1080/17435390.2021.1996650>
- Conti, G. O., Ferrante, M., Banni, M., Favara, C., Nicolosi, I., Cristaldi, A., & Zuccarello, P. (2020). Micro- and nano-plastics in edible fruit and vegetables. The first diet risks assessment for the general population. *Environmental Research*, 187, 109677. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109677>
- Enyoh, C. E., Verla, A. W., Verla, E. N., Ibe, F. C., & Amaobi, C. E. (2019). Airborne microplastics: a review study on method for analysis, occurrence, movement and risks. *Environmental Monitoring and Assessment*, 191(11). <https://doi.org/10.1007/s10661-019-7842-0>
- European Commission, Directorate-General for Health and Food Safety. (2018, 14 febrero). *Commission Regulation (EU) 2018/213 of 12 February 2018 on the use of bisphenol A in varnishes and coatings intended to come into contact with food and amending Regulation (EU) No 10/2011 as regards the use of that substance in plastic food contact materials.* <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32018R0213>
- Geyer, R., Jambeck, J., & Law, K. L. (2017). Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*, 3(7). <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>
- Gonsalves, K. E., Patel, S. H., & Trivedi, D. H. (1992). Development of potentially degradable materials for marine applications. III. Polyethylene- polyethylene oxide blends. *Journal of applied polymer science*, 45(2), 217-225.
- Gregory, M. R., & Andrady, A. L. (2003). Plastics in the Marine Environment. *Plastics and the Environment*, 379-401. <https://doi.org/10.1002/0471721557.ch10>

- Herberz, T., Barlow, C. Y., & Finkbeiner, M. (2020). Sustainability Assessment of a Single-Use Plastics Ban. *Sustainability*, 12(9), 3746. <https://doi.org/10.3390/su12093746>
- Huang, J., Dong, G., Liang, M., Wu, X., Xian, M., An, Y., Zhan, J., Xu, L., Xu, J., Sun, W., Chen, S., Chen, C. Y., & Liu, T. (2022). Toxicity of micro(nano)plastics with different size and surface charge on human nasal epithelial cells and rats via intranasal exposure. *Chemosphere*, 307, 136093. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136093>
- Huang, Y., Wong, C. K. C., Zheng, J., Bouwman, H., Barra, R., Wahlström, B., Neretin, L. N., & Wong, M. H. (2012). Bisphenol A (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environment International*, 42, 91-99. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2011.04.010>
- Imhof, H. K., Schmid, J. A., Niessner, R., Ivleva, N. P., & Laforsch, C. (2012). A novel, highly efficient method for the separation and quantification of plastic particles in sediments of aquatic environments. *Limnology and Oceanography-methods*, 10(7), 524-537. <https://doi.org/10.4319/lom.2012.10.524>
- Íñiguez, M., Conesa, J. A., & Fullana, A. (2017). Microplastics in Spanish Table Salt. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09128-x>
- Kenyon, K. W., & Kridler, E. (1969). Laysan Albatrosses Swallow Indigestible Matter. *The Auk*, 86(2), 339-343. <https://doi.org/10.2307/4083505>
- Kurebayashi, H., Betsui, H., & Ohno, Y. (2003). Disposition of a Low Dose of ¹⁴C-Bisphenol A in Male Rats and Its Main Biliary Excretion as BPA Glucuronide. *Toxicological Sciences*, 73(1), 17-25. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfg040>
- Li, B., Ding, Y., Cheng, X., Sheng, D., Xu, Z., Rong, Q., Wu, Y., Zhao, H., Ji, X., & Zhang, Y. (2020). Polyethylene microplastics affect the distribution of gut microbiota and inflammation development in mice. *Chemosphere*, 244, 125492. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125492>
- Li, X., Zhang, T., Lv, W., Wang, H., Chen, H., Xu, Q., Cai, H., & Dai, J. (2022). Intratracheal administration of polystyrene microplastics induces pulmonary fibrosis by activating oxidative stress and Wnt/ β -catenin signaling pathway in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 232, 113238. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2022.113238>
- Li, L., Wang, Q., Zhang, Y., Niu, Y., Yao, X., & Liu, H. (2015). The Molecular Mechanism of Bisphenol A (BPA) as an Endocrine Disruptor by Interacting with Nuclear Receptors: Insights from Molecular Dynamics (MD) Simulations. *PLOS ONE*, 10(3), e0120330. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120330>

- Marciniak, J., Zalewska, A., Popko, J., & Zwierz, K. (2006). Optimization of an enzymatic method for the determination of lysosomal N-acetyl- β -D-hexosaminidase and β -glucuronidase in synovial fluid. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, *44*(8). <https://doi.org/10.1515/cclm.2006.177>
- Meng, X., Zhang, J., Wang, W., Gonzalez-Gil, G., Vrouwenvelder, J. S., & Li, Z. (2021). Effects of nano- and microplastics on kidney: Physicochemical properties, bioaccumulation, oxidative stress and immunoreaction. *Chemosphere*, *288*, 132631. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132631>
- Meng, Z., Tian, S., Yan, J., Jia, M., Yan, S., Li, R., Zhang, R., Zhu, W., & Zhou, Z. (2019). Effects of perinatal exposure to BPA, BPF and BPAF on liver function in male mouse offspring involving in oxidative damage and metabolic disorder. *Environmental Pollution*, *247*, 935-943. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.116>
- Moore, C. E. (2008). Synthetic polymers in the marine environment: A rapidly increasing, long-term threat. *Environmental Research*, *108*(2), 131-139. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2008.07.025>
- Palanza, P., Howdeshell, K. L., Parmigiani, S., & Saal, F. S. V. (2002). Exposure to a low dose of bisphenol A during fetal life or in adulthood alters maternal behavior in mice. *Environmental Health Perspectives*, *110*(suppl 3), 415-422. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110s3415>
- Pollock, T., & deCatanzaro, D. (2014). Presence and bioavailability of bisphenol A in the uterus of rats and mice following single and repeated dietary administration at low doses. *Reproductive Toxicology*, *49*, 145-154. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2014.08.005>
- Pottenger, L. H. (2000). The Relative Bioavailability and Metabolism of Bisphenol A in Rats Is Dependent upon the Route of Administration. *Toxicological Sciences*, *54*(1), 3-18. <https://doi.org/10.1093/toxsci/54.1.3>
- Qin, Z., Mou, J., Chao, C. Y., Chopra, S. S., Daoud, W. A., Leu, S. Y., Ning, Z., Tso, C. Y., Chan, W. C., Tang, S., Hathi, Z., Haque, A. K. M. A., Wang, X., & Lin, C. S. K. (2021). Biotechnology of Plastic Waste Degradation, Recycling, and Valorization: Current Advances and Future Perspectives. *Chemosuschem*, *14*(19), 4103-4114. <https://doi.org/10.1002/cssc.202100752>
- Rainieri, S., & Barranco, A. (2019). Microplastics, a food safety issue? *Trends in Food Science and Technology*, *84*, 55-57. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.12.009>
- Re-evaluation of the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs. (2023). *EFSA Journal*, *21*(4). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.p210401>

- Rehman, A. U., Akhtar, T., Hameed, N., & Sheikh, N. A. (2021). In vivo assessment of bisphenol A induced histopathological alterations and inflammatory gene expression in lungs of male Wistar rats. *Human & Experimental Toxicology*, 40(3), 538-549. <https://doi.org/10.1177/0960327120958459>
- Rubio, C., Alejandro-Vega, S., Paz-Montelongo, S., Gutiérrez, Á. J., Carrascosa, C., & La Torre, A. G. (2022). Microplastics as Emerging Food Contaminants: A Challenge for Food Safety. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(3), 1174. <https://doi.org/10.3390/ijerph19031174>
- Scippo, M.-L. (2011). Bisphenol A in our food: same toxicological studies but different risk assessment and risk management decisions around the world. *Food Science & Law*. https://orbi.uliege.be/bitstream/2268/134365/1/papier_BPA.pdf
- Serveis Científicotècnics, UIB. (s. f.). *Imatge LC-MS (SCT,UIB)*. <https://sct.uib.cat/Instruments-i-equipos-dels-Serveis-Científicotècnics/Area-de-espectrometria-de-masses/Espectrometria-de-masses-dalta-ressolucio.cid108102>
- Shim, W. H., Hong, S., & Eo, S. (2018). Marine Microplastics: Abundance, Distribution, and Composition. En *Elsevier eBooks* (pp. 1-26). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-813747-5.00001-1>
- Thompson, R. F., Olsen, Y. S., Mitchell, R. N., Davis, A. P., Rowland, S. J., John, A. W., McGonigle, D. F., & Russell, A. E. (2004). Lost at Sea: Where Is All the Plastic? *Science*, 304(5672), 838. <https://doi.org/10.1126/science.1094559>
- Tominaga, T., Negishi, T., Hirooka, H., Miyachi, A., Inoue, A., Hayasaka, I., & Yoshikawa, Y. (2006). Toxicokinetics of bisphenol A in rats, monkeys and chimpanzees by the LC–MS/MS method. *Toxicology*, 226(2-3), 208-217. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.07.004>
- Ullah, A., Pirzada, M., Jahan, S., Ullah, H., Shaheen, G., Rehman, H., Siddiqui, M. F., & Butt, M. A. (2018). Bisphenol A and its analogs bisphenol B, bisphenol F, and bisphenol S: Comparative in vitro and in vivo studies on the sperms and testicular tissues of rats. *Chemosphere*, 209, 508-516. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.089>
- Upmeier, A., Degen, G. H., Diel, P., Michna, H., & Bolt, H. M. (2000). Toxicokinetics of bisphenol A in female DA/Han rats after a single i.v. and oral administration. *Archives of Toxicology*, 74(8), 431-436. <https://doi.org/10.1007/s002040000144>
- Ward, J. J., & Kach, D. J. (2009). Marine aggregates facilitate ingestion of nanoparticles by suspension-feeding bivalves. *Marine Environmental Research*, 68(3), 137-142. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.05.002>

- Wright, S. L., Thompson, R. F., & Galloway, T. S. (2013). The physical impacts of microplastics on marine organisms: A review. *Environmental Pollution*, 178, 483-492. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.031>
- Ye, X., Zhou, X., Hennings, R., Kramer, J. A., & Calafat, A. M. (2013b). Potential External Contamination with Bisphenol A and Other Ubiquitous Organic Environmental Chemicals during Biomonitoring Analysis: An Elusive Laboratory Challenge. *Environmental Health Perspectives*, 121(3), 283–286. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206093>
- Zhang, Q., He, Y., Cheng, R., Li, Q., Qian, Z., & Lin, X. (2022). Recent advances in toxicological research and potential health impact of microplastics and nanoplastics in vivo. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(27), 40415-40448. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19745-3>