

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS ANALÍTICAS DE
EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES
MEDIANTE EL ACOPLAMIENTO DE TÉCNICAS DE
MICROEXTRACCIÓN, CROMATOGRAFÍA Y
ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN MUESTRAS DE AGUAS Y
FLUIDOS BIOLÓGICOS***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Doctor en Química por:

DANIEL JOSÉ ARISMENDI PEÑA

Director de Tesis
DR. PABLO RICHTER

Co-director de Tesis
DR. ALFONSO PAREDES

Santiago-CHILE
Septiembre 2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado en Química presentada por el candidato:

DANIEL JOSÉ ARISMENDI PEÑA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Química, en el examen público rendido el día

Directores de Tesis:

Dr. Pablo Richter

Dr. Alfonso Paredes

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Edwar Fuentes (presidente)

Dra. Sandra Orellana

Dr. Ricardo Salazar

Dr. Julio Raba

Por ti, Dios
Para ti, Madre
Por siempre, Pipina

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por siempre iluminar y guiar mi camino durante estos años de tanto trabajo y esfuerzo. Por darme las fuerzas que fueron necesarias para culminar este anhelado deseo personal y profesional. La espera valió la pena.

A mi Madre, María Fernanda, mamita como siempre te digo, te debo todo lo que soy y todo lo que tengo. No hubiese llegado a este camino sin todas esas enseñanzas de superación, dedicación, responsabilidad, compromiso, puntualidad, disciplina, valores y sobre todo de mucho amor por lo que hago. Gracias por tanto y por todo.

A ti Pipina, estos días felices los hubiese querido compartir contigo. Fue tan rápida y repentina tu partida que aún cuesta creerlo. Estoy seguro de que estás en lugar mejor, de la mano de Dios. Descansa en paz querida tía.

A José, mi fiel compañero. Gracias por tu apoyo, tu confianza y tu infinita comprensión. Vamos por mucho más.

A mi familia en general, todos aquellos que siempre me han apoyado y han sido personas importantes en mi vida. A mis tías, Marina, María del Carmen, María Dolores y María, realmente son como mis madres, las quiero y las respeto. A mi padre, hermana y sobrinos. A mi abuelita Lorenza, tu negrito siempre te lleva en sus pensamientos, Dios te siga concediendo mucha salud. A mi prima Jhoser y mi querido Santi, son muy especiales para mí. En general a todos mis tíos, tías, primas y primos, gracias por todo.

A mis amigos de siempre, esos que tengo tantos años conociendo desde el colegio, universidad, anterior trabajo y de la vida en general. Les agradezco mucho su amistad. Mi querida Karina, gracias por ser como una hermana. Y a ti mi querida Verónica, gracias por ser tan incondicional y buena amiga. La amistad de todos ustedes realmente vale oro.

A mi director de tesis, profe Pablo gracias por creer en mí, por tanto apoyo y por ser tan buen guía. Realmente es un gran ejemplo. A mi co-director, profe Alfonso, por

estar siempre cuando lo he necesitado. A todas las demás personas que han estado presentes durante estos años en la Facultad, gracias profe Inés, Loreto, María Carolina, Betsabet, Tatiana, Maruja, Jeanette, gracias por su hermosa compañía.

A esas personas que me abrieron las puertas en Chile y que me han hecho sentir como en casa, muchas gracias queridas Inmaculada, Mercedes, Vanty, Alejandra, siempre contarán conmigo. Y a todos esos compañeros que de una u otra manera fueron parte de mis años por el laboratorio. A Ana María, Catalina y Matías mis compañeros de mucho estudio al inicio del doctorado, gracias por su apoyo, ayuda y buen recibimiento.

A los profesores miembros de la comisión evaluadora, por ser un aporte con sus críticas constructivas e ideas para lograr un trabajo de tesis completo y con un buen nivel de productividad.

Al laboratorio de Bioanalítica de la Universidad de San Luis, Argentina y al grupo de Espectrometría Analítica y Bioanalítica de la Universidad de Oviedo, España, gracias por todas las enseñanzas y por haberme acogido de tan buena manera durante mis pasantías de investigación.

Al Laboratorio de Química Ambiental de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, gracias por haberme permitido formar parte de este gran lugar, fueron muchos los aprendizajes y buenos momentos.

A la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile por el apoyo al otorgarme la beca interna por dos años consecutivos. A ANID (ex-Conicyt) por haberme otorgado la beca de Doctorado Nacional por los años restantes del doctorado y por haber financiado la pasantía de investigación. Al proyecto FONDECYT 1180742 por el financiamiento otorgado a esta investigación.

A todas esas personas que también han sido importantes en este proceso y que he olvidado agradecer. A ustedes también, muchas gracias.

Daniel Arismendi

Título de Tesis: DESARROLLO DE NUEVAS ESTRATEGIAS ANALÍTICAS DE EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES MEDIANTE EL ACOPLAMIENTO DE TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN, CROMATOGRAFÍA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN MUESTRAS DE AGUAS Y FLUIDOS BIOLÓGICOS

Presentando por: Daniel José Arismendi Peña

Resumen

Las nuevas estrategias analíticas propuestas en la investigación sugieren mejoras considerables a métodos analíticos establecidos previamente. Desde el punto de vista ambiental, metodologías simultáneas de contaminantes emergentes en distintas muestras acuosas, permite conocer el grado de exposición a los que los seres humanos están expuestos diariamente a estos contaminantes, además contar con metodologías multiresiduo permite reducir costos, tiempos y gasto de reactivos. Desde el punto de vista biológico, la aplicación de estas estrategias analíticas propuestas con microextracción basada en RDSE y cromatografía/espectrometría de masas, permitió determinar con gran eficiencia biomarcadores en muestras de orina como hormonas sexuales y triclosán. Finalmente, para un mejor entendimiento de las afecciones por la exposición a triclosán, se desarrolló un experimento de exposición a ratas de laboratorio por este compuesto, y se evaluó el efecto luego de un mes de estudio. Se encontraron variaciones significativas en las concentraciones de hormonas sexuales y de crecimiento de las ratas, usando para ello el alto poder resolutivo de los espectrómetros de masas, lo cual no pudo ser diferenciado usando inmunoensayos comerciales.

Abstract

The new analytical strategies proposed in the research suggest considerable improvements to previously established analytical methods. From the environmental point of view, simultaneous methodologies of emerging pollutants in different aqueous samples, allow to know the degree of exposure to which humans are exposed daily to these pollutants, in addition to having multi-residue methodologies allow to reduce costs, time and expense of reagents. From the biological point of view, the application of these proposed analytical strategies with microextraction based on RDSE and chromatography/mass spectrometry, allowed to efficiently determine biomarkers in urine samples such as sex hormones and triclosan. Finally, for a better understanding of the problems caused by exposure to triclosan, an experiment of exposure to laboratory rats by this compound was developed, and the effect was evaluated after one month of study. Significant variations were found in the concentrations of sex hormones and growth in the rats, through the high-resolution power of mass spectrometers, which could not be differentiated using commercial immunoassays.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	7
ABREVIATURAS.....	8
1. INTRODUCCIÓN	9
2. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	11
2.1 Biomarcadores.....	11
2.2 Sistema endocrino y biomarcadores	13
2.3 Descripción de compuestos de interés	19
2.3.1 Kisspeptina-10 (Kiss-10).....	19
2.3.2 Hormonas Sexuales.....	23
2.3.3 Triclosán	30
2.4 Técnicas de interés para la investigación	32
2.4.1 Cromatografía de gases / Espectrometría de masas (GC-MS) [78].....	32
2.4.2 Cromatografía de Líquidos / Espectrometría de Masas (LC-MS) [79]. ..	33
2.4.3 Inmunoensayos.....	35
2.4.4 Métodos de microextracción	38
2.5 Matrices de interés para la investigación	42
2.5.1 Muestras de aguas	42
2.5.2 Orina humana	43
2.5.3 Suero de ratas	43
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	45
3.1. Hipótesis	45
3.2. Objetivo General	46
3.3. Objetivos específicos	46
4. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	47
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN POR OBJETIVOS	50
5.1. Objetivo 1: Determinación simultánea multiresiduo y multiclase de contaminantes emergentes en muestras de aguas empleando RDSE/ Derivatización/GC-MS.....	50

5.1.1 Parte Experimental	50
5.1.2 Resultados y Discusión.....	54
5.1.2.1 Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas	54
5.1.2.2 Estudio de reacción de derivatización	55
5.1.2.3 Estudio de la extracción simultánea multiclase de contaminantes emergentes mediante RDSE en matrices acuosas	62
5.1.2.4 Validación del método	64
5.1.2.5 Análisis de muestras reales.....	65
5.1.3 Conclusión	68
5.2. Objetivo 2: Extracción por sorción en disco rotatorio (RDSE) para la determinación de hormonas sexuales y triclosán en muestras de orina mediante GC-MS. Pasos de clean-up integrados y derivatización optimizada.....	69
5.2.1 Parte Experimental	69
5.2.2 Resultados y Discusión.....	71
5.2.2.1 Ensayos preliminares de derivatización de hormonas sexuales y TCS en orina.	71
5.2.2.2 Estudio de la reacción de derivatización de hormonas sexuales y TCS usando la mezcla MSTFA/DTE/TMIS.....	72
5.2.2.3 Separación e identificación de TCS, E2, Test y Prog mediante GC-MS	78
5.2.2.4 Estudio RDSE de hormonas sexuales y triclosán en muestras de orina	79
5.2.2.5 Cifras de mérito de la metodología desarrollada	87
5.2.2.6 Análisis de muestras reales.....	88
5.2.3 Conclusión	89
5.3. Objetivo 3: Determinación de kisspeptina-10, hormonas sexuales y triclosán en muestras de suero de ratas empleando VA-MSPD/UHPLC-ToF/MS.....	91
5.3.1 Parte Experimental	91
5.3.2 Resultados y Discusión.....	93
5.3.2.1 Consideraciones generales	93
5.3.2.2 Estudios de infusión directa de la muestra en el espectrómetro de masas (ESI-TOF/MS)	94
5.3.2.3 Estudio de reactivo para el medio ácido	98

5.3.2.4 Modo <i>trap</i> vs. <i>pulse</i>	99
5.3.2.5 Estudio cromatográfico UHPLC	100
5.3.2.6 Estudio de derivatización de la hormona E2 y TCS.....	102
5.3.2.7 Estudios de extracción de analitos desde muestras de suero usando dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) asistida por vórtex (VA).....	110
5.3.2.8 Cifras de mérito de la metodología propuesta para muestras de suero	118
5.3.3 Conclusión	119
5.4. Objetivo 4: Evaluación de posible correlación existente entre la exposición a EDCs y el sistema kisspeptina/hormonas sexuales. Efecto de la administración oral de TCS en la función reproductiva en ratas hembras.	120
5.4.1 Metodología paso a paso.....	120
5.4.2 Resultados y Discusión.....	124
5.4.2.1 Pesos de las ratas	124
5.4.2.2 Ciclo estral.....	126
5.4.2.3 Niveles de hormonas sexuales y kisspeptina-10 en suero de ratas	129
5.4.2.4 Comparación de los niveles de hormonas determinados mediante inmunoensayos (EIA)	131
5.4.3 Resumen del estudio de exposición de ratas a TCS	134
5.4.4 Conclusión	135
6. REFERENCIAS	136
ANEXO A. Pasantía de Investigación. San Luis, Argentina (Jun/Jul 2018).....	151
ANEXO B. Pasantía de Investigación. Oviedo, España (Ago/Dic 2019)	159

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de segregación de hormonas a partir del sistema GnRH.....	14
Figura 2. Formas estructurales de kisspeptinas humanas.	15
Figura 3. Interacción de factores hipotalámicos y señales periféricas en el inicio de la pubertad.	18
Figura 4. Estructura molecular kisspeptina-10 (humano)	19
Figura 5. Descripción de biosíntesis de la hormonas sexuales y receptores	24
Figura 6. Niveles de Kiss y hormonas sexuales durante el ciclo menstrual	26
Figura 7. Reacción de derivatización con MSTFA.....	33
Figura 8. Distribución de compuestos de acuerdo a su polaridad y masa molar para su medición por cromatografía / espectrometría de masas.....	35
Figura 9. Representación de un inmunoensayo	35
Figura 10. Realización de ensayos con inmunoafinidad/espectrometría de masa.....	39
Figura 11. Representación del disco rotatorio con cavidad.....	40
Figura 12. Esquema de preparación de muestra por MSPD.....	42
Figura 13. Cambios hormonales, ováricos y del epitelio vaginal en el ciclo estral	44
Figura 14. Cromatógrafo de Gases-Espectrómetro de masas. Thermo Scientific.	48
Figura 15. Cromatógrafo de Líquidos-Espectrómetro de Masas. Perkin Elmer. ...	48
Figura 16. Espectrómetro ATR-FT-IR. Thermo Scientific.....	49
Figura 17. Cromatograma de elución del método multiclase de contaminantes emergentes (a) TIC (b) parabenos (c) hormonas estrogénicas (d) antiinflamatorios no esteroideos y (e) triclosán y bisfenol A.	55
Figura 18. Espectros de masas (EI) para (a) Ket, (b) BFA y (c) AcM.....	56
Figura 19. Gráfico de Pareto de los efectos principales y las interacciones.....	58
Figura 20. Gráfico de contorno de superficie de respuesta para la derivatización simultánea de contaminantes emergentes.	61
Figura 21. Estudio estabilidad derivatización (de 0 a 30 h).....	62
Figura 22. Estudio comparativo de fases sorbentes para la extracción de CEs....	63
Figura 23. Perfiles de extracción para MP, E1, AAS, TCS y BPA	64
Figura 24. Mapa de la zona de procedencia de las muestras de aguas naturales	66

Figura 25. Espectros de masas por EI de a) TCS b) E2 c) Test y d) Prog	74
Figura 26. Gráfico de Pareto de los efectos principales para TCS, T, P y E2.	76
Figura 27. Efecto de la presencia y volumen de solvente orgánico en la derivatización de TCS, E2, Test y Prog con MSTFA/DTE/TMIS	77
Figura 28. Cromatograma de elución por GC-MS: TCS, Test, E2 y Prog	78
Figura 29. Estudio de fase sorbente y pH de la extracción de E2, TCS, Test, Prog desde orina mediante RDSE	80
Figura 30. Efecto en la respuesta por dilución inicial de la muestra de orina.....	81
Figura 31. Efecto de la concentración de MeOH utilizada en la etapa de limpieza sobre la respuesta relativa de los analitos.	83
Figura 32. Efecto de los solventes de desorción en la elución de analitos.....	83
Figura 33. A. Efecto de las etapas de limpieza en las recuperaciones y efecto matriz. B. Espectros infrarrojos de la superficie del disco rotatorio.....	85
Figura 34. Superficie de respuesta variables hidrodinámicas en RDSE en orina..	86
Figura 35. Espectro de masas Prog y Test en modo positivo	97
Figura 36. Espectros de masas Kiss-10 en modo positivo.....	96
Figura 37. Estudio de medio ácido en la ionización de analitos en ESI-ToF/MS...	99
Figura 38. Cromatograma inicial de los analitos usando UHPLC-ESI-ToF/MS...	102
Figura 39. Reacción de derivatización de E2 y Test mediante DMIS/NaHCO ₃ . .	103
Figura 40. Cromatograma y Espectro de masas para Test y Prog en presencia de DMIS/NaHCO ₃	104
Figura 41. Cromatograma y espectro de masas de Kiss-10 en presencia de DMIS/NaHCO ₃	105
Figura 42. Cromatograma y espectro de masas de E2-DMIS en presencia de DMIS/NaHCO ₃	105
Figura 43. Cromatograma y espectro de masas de TCS-DMIS en presencia de DMIS/NaHCO ₃	106
Figura 44. Cromatograma de elución del conjunto de analitos en presencia DMIS/NaHCO ₃	107
Figura 45. Cromatograma de elución de Kiss-10, T, P, E2 y TCS, sin y con derivatización vía DMIS/NaHCO ₃	107

Figura 46. Superficie de respuesta estimada de la derivatización de hormonas sexuales y TCS usando DMIS/NaHCO ₃	109
Figura 47. Estudio de cantidad de fase dispersiva C18 utilizada en MSPD para determinar Test y Prog en muestras de suero	113
Figura 48. Estudio del solvente de elución para la separación de Test y Prog desde muestras de suero con fase C18.....	114
Figura 49. Precipitación de proteínas en distintos solventes orgánicos	115
Figura 50. Estudio de volumen de ACN para la extracción de Test y Prog desde muestras de suero.....	116
Figura 51. Estudio de volumen de suero para MSPD en muestras reales	117
Figura 52. Diagrama gráfico de la estrategia analítica propuesta MSPD-UHPLC-ESI-ToF/MS para muestras de suero de ratas	118
Figura 53. Curvas de calibración obtenidas para la Prog (1 - 40 ng mL ⁻¹) en presencia y ausencia de la matriz suero y de la fase dispersiva.	119
Figura 54. Fotos de ratas sometidas al estudio en grupos de 3 o 4 animales por caja con ciclo de luz oscuridad controlada y con agua y alimento libre de soya	120
Figura 55. Fotos del suministro dosis de TCS y vehículo a ratas de laboratorio.	122
Figura 56. Células características de las 4 etapas del ciclo estral.	123
Figura 57. Registro diario del peso de cada rata expuesta al vehículo y TCS. ...	124
Figura 58. Registro promedio del peso de las ratas control y expuestas a TCS.	125
Figura 59. Ganancia de peso (g) de las ratas sometidas TCS y vehículo. ,05.	126
Figura 60. Registro del ciclo estral de las ratas del grupo control	127
Figura 61. Registro del ciclo estral de las ratas del grupo tratado con triclosán..	127
Figura 62. Número de ciclos de las ratas control y ratas expuestas a TCS	128
Figura 63. Representación de concentraciones promedios de Prog en suero de ratas control y expuestas a TCS mediante MSPD-UHPLC-ToF/MS	130
Figura 64. Comparación de Prog sérica en ratas control y TCS medidas por el método EIA y el método MSPD-UHPLC-ToF/MS.	131
Figura 65. Comparación de Test sérica en ratas control y TCS medidas por el método EIA y el método MSPD-UHPLC-ToF/MS.	1316

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de kisspeptina por diferentes metodologías.	21
Tabla 2. Métodos utilizados para la determinación de kisspeptina.....	22
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de hormonas sexuales en estudio	25
Tabla 4. Valores normales de hormonas sexuales en suero sanguíneo	26
Tabla 5. Concentraciones de hormonas sexuales en orina en ng/mL.....	27
Tabla 6. Determinación de hormonas sexuales basadas en métodos de GC/MS.	28
Tabla 7. Determinación de hormonas sexuales basadas en métodos de LC/MS .	29
Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas del triclosán.....	30
Tabla 9. Niveles de Triclosán en diferentes matrices biológicas.	32
Tabla 10. Condiciones cromatográficas/masas del método multi-CEs.....	50
Tabla 11. Tiempos de retención y iones usados para la detección de multi-CEs..	51
Tabla 12. Matriz screening para estudio de derivatización de multi-CEs.	57
Tabla 13. Diseño tipo Doehlert para optimizar el método derivatización de CEs. .	59
Tabla 14. Análisis de varianza de tercer orden para la derivatización de CEs	60
Tabla 15. Cifras de mérito de la metodología para la determinación multi-CEs....	65
Tabla 16. Concentraciones de analitos en diferentes muestras de aguas	67
Tabla 17. Condiciones GC-MS para el método hormonas sexuales y TCS.	69
Tabla 18. Tiempos de retención (min) e iones (m/z) para los analitos en estudio.	69
Tabla 19. Matriz screening para estudio de derivatización en MSTFA/DTE/TMIS	75
Tabla 20. Doehlert para evaluar variables hidrodinámicas de RDSE en orina.	86
Tabla 21. Cifras de mérito asociadas a la metodología RDSE en orina.....	87
Tabla 22. Concentraciones de analitos en las diferentes muestras de orina	89
Tabla 23. Condiciones LC/MS para el método Kiss10, Test, Prog, E2 y TCS.	91
Tabla 24. Tiempos de retención y los iones para el total de analitos	91
Tabla 25. Resultados por infusión directa de los analitos por ESI-ToF	98
Tabla 26. Diferencias de amplitudes para ensayos modo pulso y trampa	99
Tabla 27. Gradiente de elución seleccionado para la separación UHPLC.	101
Tabla 28. Doehlert para el estudio de derivatización con DMIS/NaHCO ₃	108
Tabla 29. % Re con el uso de distintas fases dispersivas para MSPD.	112
Tabla 30. Cifras de mérito asociadas al método MSPD para muestras de suero	119

ABREVIATURAS

- AAS: Ácido acetilsalicílico
- Ab-Kiss10: Anticuerpo kisspeptina-10
- AcM: Ácido Mefenámico
- ACN: Acetonitrilo
- AcOEt: Acetato de Etilo
- APCI: Ionización química a presión atmosférica
- BFA: Bisfenol A
- BP: Butil parabeno
- Clean-up: Etapa limpieza
- Dic: Diclofenaco
- DMIS: 1,2-dimetil-1H-imidazole-5-sulfonil cloruro
- DoE: Diseño de Experimentos
- DTE: Ditioeritol
- E1: Estrona
- E2: 17 β -Estradiol o Estradiol
- E3: Estriol
- EDCs: Compuestos disruptores endocrinos
- EE2: Etinilestradiol
- EI: Ionización electrónica
- EP: Etil parabeno
- ESI: Ionización electrospray
- GC: Cromatografía de gases
- H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
- HAc: Ácido acético
- HCOOH: Ácido fórmico
- He: Helio
- HFBA: Ácido heptafluorobutírico
- HLB: Hidrofilic-lipofílic balance
- Ibu: Ibuprofeno
- ISQ: Cuadropolo simple
- Ket: Ketoprofeno
- Kiss10 o KP-10: Kisspeptina-10
- Kiss54 o KP-54: Kisspeptina-54 o metastatin
- K_{o/w}: Constante octanol/agua
- LC: Cromatografía Líquida
- LOD: Límite de detección
- LOQ: Límite de cuantificación
- ME (%): Efecto matriz
- MeOH: Metanol
- MP: Metil parabeno
- MS: Espectrometría de masas
- MSPD: Dispersión de matriz en fase sólida
- MSTFA: N-metil-N-trimetil-trifluoro acetamida
- NaHCO₃: Bicarbonato de Sodio
- Nap: Naproxeno
- Prog: Progesterona
- PP: Propil parabeno
- Pyr: Piridina
- RDSE: Extracción por sorción en disco rotatorio
- Re (%): Recuperación
- rpm: Revoluciones por minuto
- RSD (%): Desviación estándar relativa
- s-DVB: Estireno divinil benceno
- SIM: Monitoreo selectivo de iones
- SMPE: Microextracción en fase sólida
- SPE: Extracción en fase sólida
- Test: Testosterona
- TCS: Triclosán
- TMIS: Trimetil iodo silano
- TOF: Tiempo de Vuelo
- UHPLC: Ultra cromatografía líquida de alta resolución

1. INTRODUCCIÓN

El rápido crecimiento de la tecnología, validación y elucidación de procesos en biología molecular, química analítica y bioinformática han aumentado la aplicación de biomarcadores en las investigaciones clínicas, toxicológicas y epidemiológicas, al ofrecer una poderosa y dinámica herramienta para la evaluación de riesgos en salud individual, pública y de los ambientes laborales. La medición precisa y sensible de biomarcadores en fluidos biológicos es un pilar fundamental de la comprensión mecanicista en la biología y medicina reproductiva [1].

Hasta la fecha, la espectrometría de masas no supera sustancialmente a los inmunoensayos para la evaluación de los niveles de biomarcadores. Muchos estudios indican que los inmunoensayos son suficientes para medir, por ejemplo, la testosterona con la especificidad requerida para el diagnóstico del hipogonadismo masculino. Sin embargo, la correlación entre los métodos basados en inmunoensayos y espectrometría de masas es pobre cuando se determinan bajos niveles de estradiol ($<40,7 \text{ pmol L}^{-1}$), en cuyo caso el inmunoensayo tiene un 13,3% menos sensibilidad en comparación con la espectrometría de masas [2]. Los inmunoensayos comerciales han sido el método de rutina para determinar los niveles de hormonas sexuales con fines clínicos durante más de 50 años. Sin embargo, ya que las técnicas de espectrometría de masas han aumentado en sensibilidad y reducido en costos, se ha promovido un cambio hacia la sustitución de este método por lo que se percibe como un enfoque más de "alta tecnología". De todas maneras "la selección de un ensayo debe ser impulsada por el rendimiento de la medición a la luz de la necesidad clínica y no por la tecnología del ensayo" [3].

Considerando que cada día son más las afecciones y/o enfermedades asociadas al sistema endocrino, ha surgido la necesidad de desarrollar metodologías analíticas confirmativas para determinar hormonas sexuales al nivel de concentración al cual se encuentran ($\mu\text{g L}^{-1}$ o ng L^{-1}). Por otro lado, se conoce que muchas de estas patologías son provocadas por compuestos exógenos conocidos como compuestos disruptores endocrinos (EDCs), los cuales son

capaces de bloquear o mimetizar la función endocrina provocando una alteración del sistema [4]. Muchos de estos compuestos ya han sido eliminados de productos comerciales, como parabenos (*free parabens*) y bisfenol A (*free BPA*), sin embargo, existen otros, como el triclosán, que aún se sigue utilizando como antibactericida en productos de cuidado personal a pesar de tener una acción negativa sobre el sistema hormonal [5]. Los péptidos y proteínas también presentan ciertas dificultades al momento de ser medidos a través de inmunoensayos. La reacción cruzada es una de las razones por la cual se tienen resultados denominados como “falsos positivos”. La principal ventaja de los inmunoensayos se refiere a la alta selectividad asociada a la interacción de un antígeno con su anticuerpo, sin embargo, es fuertemente dependiente de la existencia comercial del anticuerpo (lo que implica altos costos y tiempos) además de la clonalidad del mismo (monoclonal o policlonal).

La kisspeptina-145 es una proteína que está asociada a la señalización de la regulación neuroendocrina de la reproducción. Hoy en día, se considera un componente esencial de la regulación central de la reproducción, ya que, por ejemplo, la falta de genes *Kiss1* o receptores de kisspeptina (*Kiss1r* o *Gpr54*) causa hipogonadismo hipogonadotrópico en humanos y roedores [6]. Tras un proceso de degradación biológico (proteólisis) ocurre una ruptura de la proteína en varios péptidos cortos, kisspeptina-54, -14, -13 y -10, asociado éste último a su importante actividad biológica [7]. Por lo general, para la cuantificación de kisspeptina se utilizan kits comerciales de inmunoensayos basados en anticuerpos policlonales, sin embargo, su detección mediante técnicas confirmativas de gran envergadura como la espectrometría de masas se ha convertido en un gran reto. Esta técnica, asociada a otras como extracción, inmunoafinidad y cromatografía serán utilizadas en esta investigación en distintos acoplamientos para la determinación de hormonas sexuales, triclosán y kisspeptina-10. El propósito final es realizar un estudio de exposición de triclosán a ratas de laboratorio y evaluar las posibles alteraciones del sistema kisspeptidérgico (kisspeptina/hormonas sexuales), pero para ello, se necesita de todas las metodologías analíticas previamente desarrolladas, optimizadas y validadas.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 Biomarcadores

Los estudios de biomarcadores desempeñan un papel fundamental en la salud, y para garantizar su desarrollo sólido, se requieren investigaciones de varias disciplinas. Por ejemplo, disciplinas como biología molecular, genética, ingeniería, computación, epidemiología, diseño de ensayos clínicos, estadísticas, regulación y economía de la salud deben estar involucradas, y los desarrollos en química, particularmente química analítica, también son obligatorios para un progreso integral en este campo.

Hay varias definiciones precisas de biomarcadores en la literatura; según Strimbu y Tavel [8], "el término biomarcador se refiere a una amplia subcategoría de signos médicos, es decir, indicaciones objetivas del estado médico observadas desde fuera del paciente, que se pueden medir con precisión y reproduciblemente". De manera similar, la Organización Mundial de la Salud (OMS), en coordinación con las Naciones Unidas, ha definido un biomarcador como "cualquier sustancia, estructura o proceso que puede medirse en el cuerpo o sus productos e influir o predecir la incidencia de resultados o enfermedades" [9]. Los biomarcadores también se utilizan para examinar la exposición humana a contaminantes. En este contexto, un "biomarcador de exposición" se define como una sustancia xenobiótica o su(s) metabolito(s) o el producto de una interacción entre un agente xenobiótico y algunas moléculas o células diana o células, que se miden dentro de un compartimento de un organismo y puede estar relacionado con la exposición [10]. En general, estas definiciones indican que un biomarcador es un evento que se puede medir, se produce en un sistema biológico y se puede interpretar como un indicador del estado de salud. Lo más importante es que los biomarcadores se utilizan cada vez más para el diagnóstico, la prevención y el seguimiento de una enfermedad [9] o para examinar la salud pública y la exposición ocupacional [11].

Teniendo en cuenta su uso, es posible encontrar en la literatura diferentes clasificaciones de biomarcadores según el área de estudio en la que se abordan [12]–[16]. Al analizar las clasificaciones, se puede deducir que casi siempre se consideran tres clases de biomarcadores:

- ❖ Biomarcadores de riesgo, que proporcionan información sobre la predisposición a sufrir una patología.
- ❖ Biomarcadores de diagnóstico, que proporcionan información sobre si un paciente padece una enfermedad.
- ❖ Biomarcadores de exposición, que se refiere a sustancias exógenas encontradas en los organismos y que se pueden asociar con ciertas patologías.

Teniendo en cuenta que la aplicabilidad de los biomarcadores a la práctica médica es obligatoria, dentro del alcance de sus mediciones analíticas, es necesario considerar características tales como especificidad y sensibilidad, reproducibilidad, viabilidad, facilidad de muestreo, cinética de formación de biomarcadores y estabilidad. También es deseable que los biomarcadores se puedan obtener de forma menos invasiva a partir de medios comunes, como orina, plasma, saliva, uñas y cabello. Los biomarcadores maternos de exposición también se han medido en líquido amniótico y leche materna [10]. Como resultado, un paso fundamental en la tarea de encontrar biomarcadores es su validación [17]. La validación de biomarcadores requiere estudios extensos para demostrar dos aspectos básicos: (a) que las diferencias en los niveles de concentración de las muestras de la población de prueba son indicativos de una patología específica y (b) que los niveles anormales de este biomarcador específico indican claramente una patología. Según Dieterle y Marrer [18], el término validación se compone de tres niveles diferentes: (a) la validación de las hipótesis científicas derivadas del análisis de la perturbación de la expresión del metabolito; (b) una validación técnica, que significa medir la misma perturbación mediante el uso de diferentes plataformas tecnológicas; y (c) la validación del método del dispositivo utilizado para medir la perturbación. En consecuencia, se ha establecido que estos tipos de estudios de biomarcadores pueden involucrar diferentes técnicas y métodos analíticos [17], [18]. Para ser

elegibles, estos métodos deben ser confiables, económicos, fáciles de usar y automatizables, así como permitir la captura simple de datos y la validación directa.

Dentro de este conjunto de propiedades requeridas, está claro que para cualquier tipo de biomarcador o biomarcador candidato (que aún esté en validación), su detección y cuantificación en el organismo requiere mediciones confiables (bio)químicas y, en consecuencia, esta tarea específica cae naturalmente, dentro del dominio de la química analítica. Los desarrollos analíticos en este contexto proporcionarán metodologías con mejores cifras de mérito y, como resultado, mejorarán la calidad de la información. De esta manera, los químicos analíticos brindan una importante contribución a las redes de investigación en las que funcionan, brindando información de calidad para ser utilizada por expertos en biología molecular, diseño de ensayos clínicos, regulación y economía de la salud, entre muchos otros [19].

2.2 Sistema endocrino y biomarcadores

La capacidad reproductiva en el ser humano comienza en la pubertad con la activación de un complejo proceso de eventos neuroendocrinos. El control hormonal de la reproducción lo lleva a cabo el eje gonadotropo, que está compuesto por tres elementos fundamentales: la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH hipotalámica); las gonadotrofinas hipofisarias: hormona luteinizante (LH) y foliculoestimulante (FSH); y los esteroides sexuales producidos en las gónadas (Figura 1). Estos últimos son los mayores reguladores de la secreción de GnRH a través de circuitos de retroalimentación o feedback positivos y negativos bien conocidos. Lo que resulta un misterio es su verdadero gatillo de activación en el momento de la pubertad, pero desde el año 2001 ciertas investigaciones resultaron revolucionarias al poner a una familia de péptidos llamada kisspeptinas y su receptor GPR54 en el centro de las miradas [20].

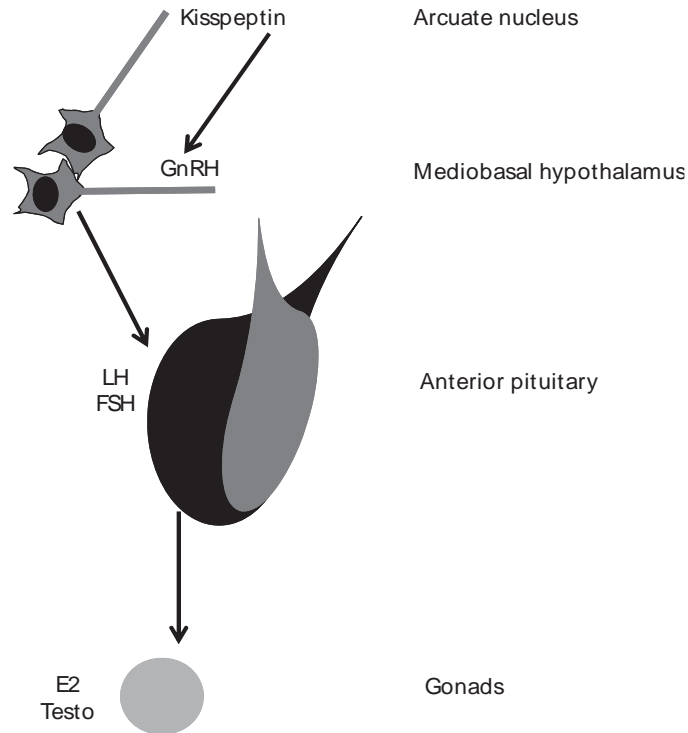


Figura 1. Proceso de segregación de hormonas a partir del sistema GnRH [21].

Kisspeptinas

El gen Kiss1 fue descrito en el año 1996 como un gen supresor de metástasis por su alta expresión en células tumorales no metastásicas de melanoma y mama. Este gen codifica una proteína de 154 aminoácidos perteneciente a la familia de hormonas amino peptídicas arginina fenilalanina. Es enzimáticamente clivada a un péptido de 54 aminoácidos conocido como kisspeptina-54 o “metastina”, así como en otros péptidos de 14, 13 y 10 aminoácidos (Figura 2). Todos comparten el decapeptido carboxilo-terminal requerido para su actividad biológica. El gen está ubicado en varios tejidos periféricos como placenta, ovario, testículo, páncreas e hígado [20].

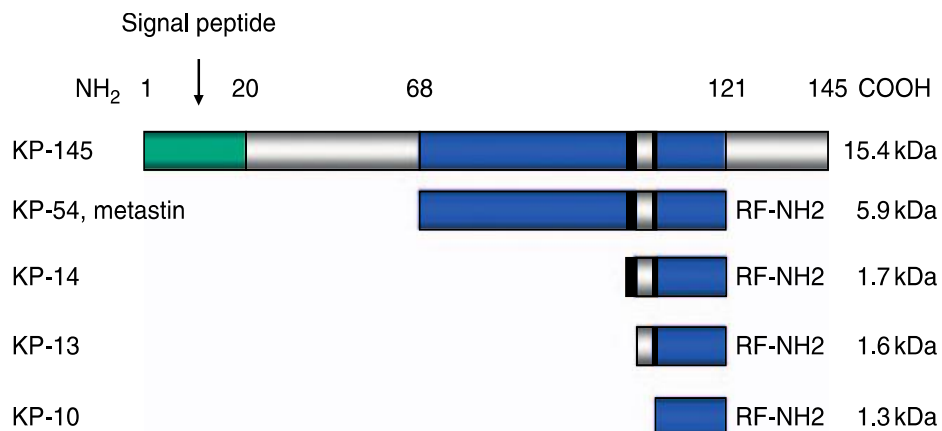


Figura 2. Formas estructurales de kisspeptinas humanas [7].

No solo se expresan en células tumorales, también se ha encontrado alta expresión de kisspeptinas en placenta, en neuronas y en regiones cerebrales que son importantes en la regulación de la secreción de GnRH como en el núcleo arcuato (Arc), núcleo periventricular (PV), núcleo anteroventral periventricular (AVPV), área preóptica anterodorsal y en el núcleo de la estría terminal. La expresión de neuronas kisspeptinas en el núcleo AVPV es sexualmente dimórfica y es mayor en mujeres, quizás porque esta área es de mayor volumen y contiene más neuronas. En el año 2001 se da a conocer su receptor GPR54 perteneciente a los receptores acoplados a proteína G, que media su acción a través de varios de varios mecanismos, por ejemplo: aumenta el calcio intracelular vía fosfatidilinositol y activación MAP-quinasa como los típicos procesos mediados por proteínas Gq. Este receptor se expresa en varios tejidos periféricos como placenta, páncreas, riñón, testículo e hipófisis, así como en distintas áreas del sistema nervioso central como hipotálamo, área preóptica, cerebro medio, hipocampo amígdala y médula. Las kisspeptinas estimulan la secreción de gonadotrofinas por activación de su receptor en neuronas GnRH hipotalámicas, y aunque no hay pruebas inequívocas que demuestren contacto sináptico directo entre sus neuronas, el bloqueo con acyline (antagonista GnRH) en ratas, ratones y primates impide el aumento de LH y FSH asociado con la administración central o periférica de kisspeptinas [20].

Kisspeptina como biomarcador diagnóstico

Se ha correlacionado el contenido de kisspeptina en fluido sanguíneo con el hipogonadismo en hombres y ciclo menstrual en las mujeres [22], preclamsia [23], resistencia a la insulina [24], mieloma múltiple [25] y en orina durante el embarazo [26]. Así como con tumores cancerígenos en los ovarios [27].

Es importante acotar, que en todos estos estudios realizados para determinar la expresión de kisspeptina como posible biomarcador en el organismo, se utilizaron kits comerciales de screening para la cuantificación. No se consideraron métodos analíticos confirmatorios de alta resolución, a pesar de la gran envergadura que tienen clínicamente.

Asociaciones entre las Kisspeptinas y los Compuestos Disruptores Endocrinos (EDCs)

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) define un EDC como "una sustancia química exógena que altera la estructura o funciones del sistema endocrino y que causa efectos adversos en el organismo o poblaciones de organismos, basados en principios científicos, datos, peso de la evidencia y el principio de precaución". A pesar de que sigue siendo un tema altamente controvertido, la Sociedad Endocrina emitió en 2009 una declaración apoyando la hipótesis y concluyendo que los estudios experimentales y epidemiológicos han convergido suficientemente con las observaciones clínicas humanas "para implicar a los EDCs como una preocupación significativa para la salud pública".

Estos compuestos están contenidos en una amplia gama de productos de consumo, incluyendo cosméticos y otros artículos de cuidado personal, plaguicidas, plásticos, materiales de construcción, recipientes para alimentos, equipos médicos, resinas epoxi, productos de papel, muebles, electrónica y como ingredientes "inertes" en productos farmacéuticos. También contaminan nuestro aire, el agua, el suministro de alimentos y los cuerpos, incluyendo los de los no nacidos. Sin embargo, no todos los EDCs son antropogénicos. Numerosos compuestos

derivados de plantas, especialmente los fitoestrógenos, también cumplen los criterios de definición de un EDC.

Los disruptores endocrinos ambientales han recibido gran atención en los últimos años, en parte debido a su omnipresencia, pero también porque la hipótesis de la disrupción endocrina proporciona una explicación plausible para la rápida prevalencia de numerosos trastornos neuroendocrinos. La interrupción del sistema de kisspeptina es una hipótesis atractiva porque la organización de este sistema podría manifestarse como una amplia gama de trastornos aparentemente dispares, pero relacionados, incluyendo la alteración de la pubertad, los problemas de fertilidad y el trastorno metabólico. Debido a que las vías de señalización de kisspeptina probablemente evolucionaron para ayudar a coordinar el estado reproductivo con señales ambientales sobresalientes, esto puede ser una responsabilidad infeliz de un sistema perfeccionado para optimizar la aptitud reproductiva. Por lo tanto, la comprensión de cómo las vías de señalización del kisspeptina están perturbadas por los EDC podría tener un profundo impacto en los campos de la ecología evolutiva y la toxicología al demostrar que la disrupción dentro de un sistema neuroendocrino se podría reflejar, por ejemplo, en la infertilidad, la obesidad y los trastornos neuroendocrinos relacionados [28].

La exposición a EDCs y su influencia sobre la expresión de kisspeptina solo ha sido evaluada en el suero sanguíneo de animales (mayoritariamente ratas). Entre los compuestos que han sido estudiados hasta la fecha se tienen: benzoato de estradiol (EB) o estradiol (E2) [29]–[32], bisfenol-A (BFA) [33], 17 α -etinil estradiol (EE2) [34], [35], zearalenona (ZEA) [36], plaguicidas (epoxiconazol, mancozeb, procloraz, tebuconazol y procimidona) [35], genisteína fitoestrogénica (G) [32], lodos de depuradoras (cóctel de EDC's) [37], familia de metabolitos de ftalatos (MMP, MEP, MBP, MBzP, MEHP, MEHHP, MEOHP) [38]. Se ha determinado en los estudios los cambios en la expresión de kisspeptina, así como de las hormonas leutinizante (LH), foliculoestimulante (FSH) o estradiol (E2), encontrado una variación significativa en sus concentraciones. Vale recalcar que las mediciones de kisspeptina y niveles hormonales realizadas en estos estudios solo incluyen

mediciones a través de kits comerciales de ELISA, inmunoensayos por reactividad (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA), reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) o microscopía confocal, dejando a un lado ensayos analíticos confirmativos de mayor precisión y exactitud.

Pueden esperarse nuevos datos sobre el efecto de los EDCs sobre la unión de hormonas esteroideas a proteínas selectivas de transporte de plasma, como la transcortina (transportadora de las hormonas cortisol, aldosterona y progesterona) y la globulina fijadora de hormonas sexuales (transportadora de testosterona y estradiol) y la globulina fijadora de tiroxina (transportadora de las hormonas T3 y T4) [39]. Existe poca información disponible sobre los efectos de los EDCs en los principales ejes hipotálamo-hipófisis-adrenales/gonadales, de los cuales el sistema kisspeptina/GPR54 es de particular importancia (Figura 3).

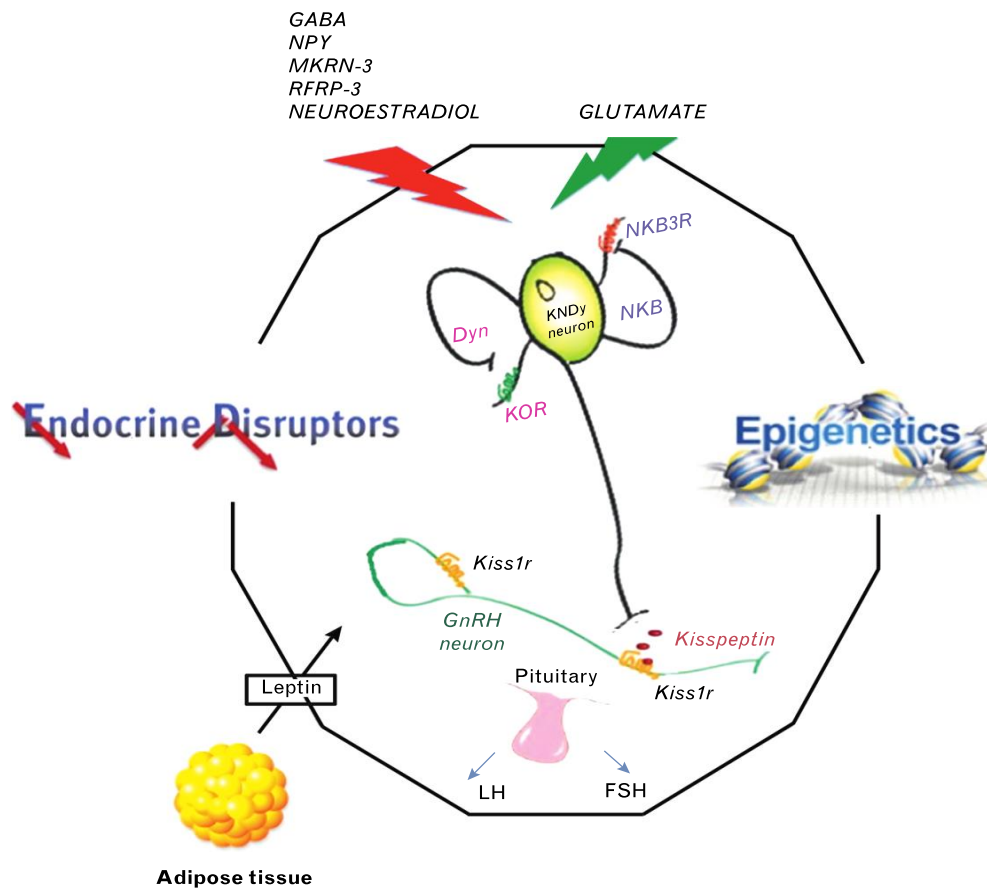


Figura 3. Interacción de factores hipotalámicos y señales periféricas en el inicio de la pubertad. Sensores de energía, hormonas, procesos epigenéticos y disruptores endocrinos participan en el proceso [40].

Existen muchos avances en el análisis de los EDCs, especialmente aquellos que persisten en el medio ambiente, en diversos fluidos corporales (plasma, orina, líquido seminal y fluido folicular). Sin embargo, se dispone de información relativamente escasa sobre la determinación simultánea de EDCs y esteroides en el mismo material biológico [39].

En función de lo antes expuesto, se planteó como interés para esta investigación el sistema kisspeptidérgico y la influencia de compuestos disruptores endocrinos en el mismo. Particularmente en el establecimiento de estrategias analíticas para la determinación simultánea de kisspeptina, hormonas sexuales y el compuesto disruptor endocrino, triclosán, en muestras biológicas.

2.3 Descripción de compuestos de interés

2.3.1 Kisspeptina-10 (Kiss-10)

Las kisspeptinas son un grupo de familia de compuestos con altos pesos moleculares, provenientes de una macroproteína y que a través de procesos biológicos ocurren rupturas peptídicas originando sus distintas formas de expresión, kisspeptina-54, -14, -13, -10.

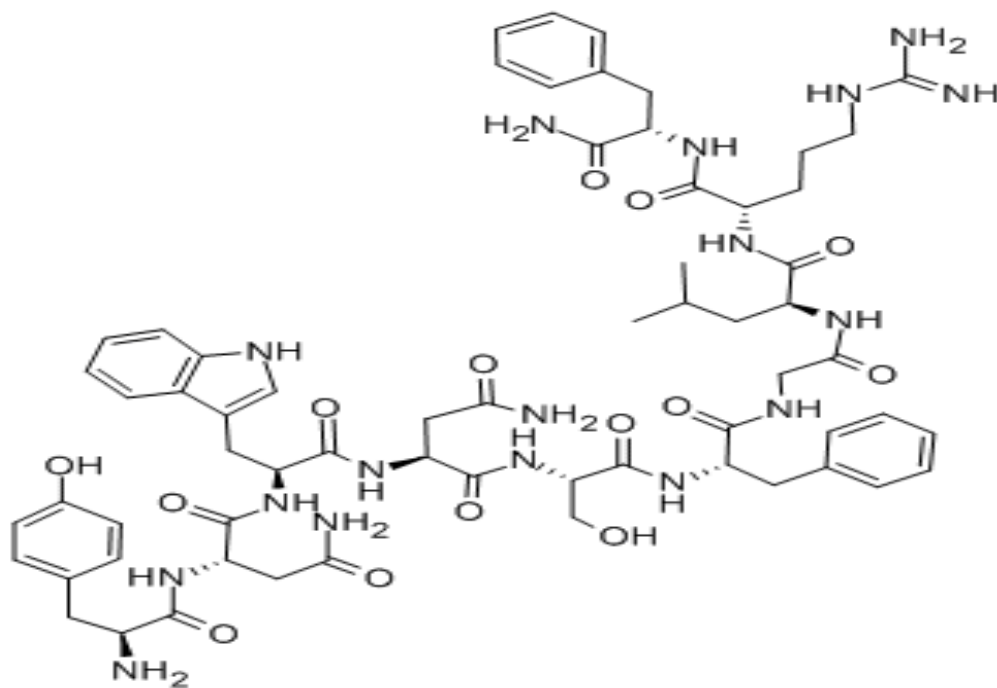


Figura 4. Estructura molecular kisspeptina-10 (humano) [41]

Como ya se mencionó anteriormente, el decapeptido terminal Kiss-10 (Figura 4) es el responsable de la actividad biológica asociada al sistema endocrino, es por ello que fue seleccionada como interés para esta investigación.

Propiedades (Physical property data is provided to ChemIDplus by SRC, Inc.)

- ❖ Fórmula molecular: $C_{63}H_{83}N_{17}O_{14}$
- ❖ Secuencia: YNWNSFGLRF
- ❖ Representación IUPAC: Tyr-Asn-Trp-Asn-Ser-Phe-Gly-Leu-Arg-Phe-NH₂
- ❖ Peso Molecular: 1302,45 g mol⁻¹
- ❖ Masa Monoisotópica: 1301,631 g mol⁻¹
- ❖ Solubilidad: 1 mg mL⁻¹ en agua

Determinación de kisspeptina

Aunque los métodos ELISA, EIA y RIA son métodos sensibles para la determinación de kisspeptina (la concentración detectada puede ser tan baja como 1 fmol mL⁻¹), sólo miden las kisspeptinas inmunorreactivas, que podrían incluir metabolitos o productos de degradación. Los métodos de inmunoensayo son muy sensibles y a veces son la única técnica que puede proporcionar los límites requeridos de cuantificación para moléculas muy grandes. Sin embargo, los inmunoensayos, al estar clasificados como técnicas de screening pueden demostrar a veces una pobre selectividad (particularmente para péptidos y proteínas más pequeñas), donde los anticuerpos pueden carecer de una especificidad adecuada, lo que resulta en interferencias de otras proteínas y péptidos presentes en la muestra, generando como resultados falsos positivos. De forma similar, un inmunoensayo es a veces incapaz de distinguir entre péptidos o proteínas estructural y químicamente similares (por ejemplo, progenitor y metabolitos), los cuales pueden diferir solamente por una modificación química muy pequeña fuera de la región reconocida por el anticuerpo. Los inmunoensayos a menudo sólo proporcionan rangos dinámicos lineales limitados para la cuantificación, y el aumento de anticuerpos puede llevar mucho tiempo y ser costoso, lo que no es

adecuado para el desarrollo temprano de alto rendimiento y el trabajo de cribado, especialmente si se espera que el número de péptidos en desarrollo aumente. En la tabla 1 se muestran concentraciones encontradas de kisspeptina en distintas matrices e individuos, las cuales son necesarias tomar en cuenta al momento de proponer el desarrollo de una metodología analítica.

Tabla 1. Concentraciones de kisspeptina por diferentes metodologías y condiciones clínicas. Los resultados de Kisspeptin fueron convertido a ng/mL para fines de comparación [51].

Condition	Authors	Study brief description	Methodology	Condition and results (mean ± SD)#			
Kisspeptin collected considering different phases of menstrual cycle	Latif & Rafique [54]	Serum kisspeptin during the menstrual cycle in 30 women (18 - 25 years old).	ELISA kit. Blood collected between 8-10 am, clotted sample, centrifuged within 30 min and frozen at -80°C.	Follicular phase 343.99 ±37.02	Pre-ovulatory phase 615.36 ±23.21	Luteal Phase 944.01 ±48.00	
	Rafique & Latif [96]	Serum kisspeptin levels in 14 women with BMI 18.5-24.99 and between 18 and 25 years old.	ELISA kit. Blood collected between 8-10 am, clotted sample, centrifuged within 30min and frozen at -80°C.	Follicular phase 338.38 ±26.70	Pre-ovulatory phase 584.02 ±32.04	Luteal Phase 922.40 ±64.47	
Kisspeptin collect in follicular phase of menstrual cycle	Zhai et al. [55]	Kisspeptin collected in 15 women submitted to IVF due male infertility between 23 and 35 years old.	KISS ELISA kit - all fractions (BlueGene, Shanghai, China). Collection in the morning, centrifuged, serum was frozen at -80°C collects in specific days.	0.23 ±0.03	0.51 ±0.12	0.40 ±0.16	
	Mumtraz et al. [88]	Kisspeptin dosage in 124 women (32.2±4.8 years old) submitted to IVF associated with pregnancy results.	KISS-1-ELISA kit (Shanghai, China). Serum collection on second day of menstrual cycle before begin the IVF treatment.	Pre-clinic abortion 0.22 ±0.03	Clinical pregnancy 0.30 ±0.01	Male infertility 0.40 ±0.06	Female infertility 0.26 ±0.02
Kisspeptin collect in women	Bacopoulou et al. [91]	Kisspeptin levels in adolescents (12 - 20 years old) with anorexia nervosa (AN) and amenorrhea.	Kp-54 ELISA kit (Bioscience, Netherlands). Serum collect in follicular phase (3-5 day) and randomly in amenorrhea, let 20 min row temperature, centrifuge 20 min at 3000 g, stored -80°C.	General dosage* 0.23 (0.10 - 0.71)	Typical AN* 0.21 (0.11 - 0.60)	Non-typical AN* 0.44 (0.17 - 0.64)	
	Chen et al. [27]	Plasma kisspeptin levels in adolescent (n=19) and women (n=23) with PSO and healthy teenagers (n = 20).	ELISA kit kp-54 (Phoenix Pharmaceuticals Inc. USA). Plasma collect at 9 am, sample extraction before dosage.	teenagers Undetectable	POS teenagers	PSO women	
Kisspeptin collect in adults	Andreozzi et al. [94]	Plasma kisspeptin levels in adults (216) (47±13 years old), 137 men.	EIA kit Kp-10 (Phoenix Pharmaceuticals Inc. USA). Plasma kisspeptin.	1 st tercile 0.33 ±0.07	2 nd tercile 0.62 ±0.14	3 rd tercile 1.80 ±0.71	
	Curtis et al. [89]	Kisspeptin in men with prostatic carcinoma and controls with other kinds of cancer.	RIA kit all kisspeptins No information about collect	Patients Undetectable	Controls		
Kisspeptin collected in patients with cancer	Canbay et al. [90]	Kisspeptin levels in 88 patients with CCR (57.9 ± 11.75 years old) and 59 healthy controls (57.1 ± 7.44 years old).	ELISA kit kp-54 (Phoenix Pharmaceuticals Inc. USA). Blood collect in EDTA (1mg/ml) tube, centrifuge at 1600g for 25min at 4°C, storage at -80°C and kisspeptin extraction before dosage.	CCR group 86.20 ±20.50	Control group 49.00 ±12.70		
	Ramachandran et al. [97]	Preanalytical factors affecting RIA measurement of kisspeptin in four pregnant (27 ± 8.83 weeks women).	RIA kit kp-54. Samples processed in different tubes (lithium heparin with 2000 U/tube of trasylol, citrate, EDTA and SST and times (0 and 4h).	EDTA 0h 35.73 ±12.89	SST 0h 8.79 ±3.51	EDTA 4h 20.50 ±7.61	SST 4h Undetectable
Kisspeptin concentrations in men	Horikoshi et al. [79]	Kisspeptin concentrations in men (12), women (10) and pregnant women in 1 st (11=G1), 2 nd (16=G2) and 3 rd trimester (12=G3).	In house ELISA ki. It used refrigerated tube with EDTA (1mg/mL) collected between 9-12 am. Sample centrifuged 1000g x 25min at 4 °C stored at -80 °C and diluted to dosage.	Men and women Undetectable	1 st trimester 1.60 ±0.45	2 nd trimester 5.98 ±0.72	3 rd trimester 12.49 ±2.14
	Nijher et al. [93]	Kisspeptin concentrations in pregnant woman (78), women with PIH (19) or pre-eclampsia (8).	RIA kit KP-54. Blood samples were collected into lithium-heparin tubes containing 5000 kallikrein inhibitor units of aprotinin (0.2 ml Trasylol), immediately centrifuged and plasma stored at -20°C.	PIH 3.51 ±0.39	Pre-eclampsia 4.58 ±0.46	Pregnant 3.75 ±0.20	
Kisspeptin collected in pregnant women	Jayasena et al. [81]	Kisspeptin serum levels in 981 pregnant women (5.9 to 22.1 weeks) during the antenatal booking visit.	In house RIA kit all dosage all kisspeptin fractions in plasma.	Abortion after collection 0.25 ±0.15	< 7 days 0.92 ±0.10	7 - 21days 1.24 ±0.93	Health pregnancy 2.93 ±1.36
	Jayasena et al. [80]	Kisspeptin serum and urinary levels in 49 pregnant women (34± 0.6 weeks) and 50 healthy non-pregnant women.	In house RIA kit all kisspeptins. Blood collected in lithium heparin tubes (plasma) and urine collected from all subjects in sterile containers. Samples were conserved with 5000 kallikrein inhibitor units of aprotinin, stored at -20°C and kisspeptin extraction before dosage.	Plasma, 3 rd Trimester 17.95 ±1.13	Plasma, non-pregnant 0.08 ±0.02	Urine, 3 rd Trimester 0.39 ±0.08	Urine, non-pregnant 0.10 ±0.02
Kisspeptin levels in pregnant women	Anne Armstrong et al. [82]*	Kisspeptin levels in pregnant women (317) (16-20 weeks) and women with pre-eclampsia (57) or growth restriction (118).	In house ELISA kp-10. Antibody from Phoenix Pharmaceuticals Inc, USA. Samples stored at -70°C.	Pre-eclampsia* 1.11 (0.60 - 1.9)	Growth restriction* 1.16 (0.44 - 3.9)	Normal gestation* 1.19 (0.49 - 2.30)	
	Logie et al. [95]	Kisspeptin levels in obese pregnant women.	ELISA kit kp-10 (Phoenix Pharmaceuticals Inc., Germany.) Blood collected in EDTA tube between 8 and 9 am, centrifuged 1500 g, 10 min at 4°C, plasma dosage.	Geral 16w 1.36 ±0.81	Geral 28w 2.23 ±1.70	Geral 36w 3.18 ±2.77	

Tabla 2. Resumen de métodos utilizados para la determinación de expresiones de kisspeptina, incluyendo matriz y cifras de mérito.

Método de análisis	Matriz	Analito	LOD	Rango de calibración	% Re	CV inter (%)	CV intra (%)	Más información
EIA [22], [42], [43]	Plasma humano	metastin-10-LI	0,1 pmol	0,1 - 32,5 pmol/mL	95 ± 4	13,4 (0,1 pmol/mL) 8,6 (32,5 pmol/L)	15,0 (0,1 pmol/mL) 8,8 (32,5 pmol/L)	N/R
	Plasma humano	kisspeptina-10-LI	0,52 fmol/mL	N/R	N/R	< 10	N/R	N/R
	Plasma bovino	kisspeptina-10-LI	0,1 ng/mL	0,1 - 200 ng/mL	Presenta EM	6,4 ± 0,4	6,9 ± 0,4	Sensibilidad: 8 ng/mL
RIA [44]–[48]	Plasma humano	kisspeptina-IR	2 pmol/L	N/R	N/R	8,3 (20 pmol/L)	10,2 (20 pmol/L)	N/R
	Plasma humano	kisspeptina-IR	2 pmol/L	N/R	N/R	< 9	< 11	N/R
	Plasma humano	kisspeptina-54-IR	2 pmol/L	N/R	N/R	8,3	10,2	N/R
	Tejido ratones	kisspeptina-10-IR	1,21 fmol/tube	1 - 100 fmol/tube	78 – 96	6,8 ± 1,7	8,2 ± 0,7	Sensibilidad: 0,81 ± 0,12 fmol/tube
	Plasma, saliva y orina humana	kisspeptina-IR	N/R	N/R	82	10,9	14,9	N/R
ELISA [23]	Plasma humano	kisspeptina	N/R	N/R	N/R	6	8,9	Sensibilidad (kiss): 47 pmol/L (endógeno) 62 pmol/L (sintético)
LC-MS/MS [49], [50]	Plasma rata	kisspeptina-10	0,1 ng/mL	0,1 - 1000 ng/mL	89 ± 12	7 ± 1	N/R	N/R
	Plasma humano	kisspeptina-10	NR	0,5 - 1000 ng/mL	N/R	16,5 (0,5 ng/mL) 4,2 (500 ng/mL)	N/R	N/R

La determinación de kisspeptina se realiza por lo general a través de inmunoensayos como: EIA [22], [42], [43]; RIA [44]–[48] y ELISA [23]. Después de una exhaustiva búsqueda bibliográfica, se encontraron muy pocos métodos analíticos basados en cromatografía y espectrometría de masas (LC-MS/MS) para cuantificar kisspeptina en plasma [49], [50]. En ellos investigaron la estabilidad y la farmacocinética de este péptido. Además, se identificó un nuevo metabolito en plasma de rata y se monitorizó su perfil de concentración-tiempo. Estos investigadores intentaron realizar un pretratamiento del suero sanguíneo que incluía extracción en fase sólida (SPE), sin embargo, encontraron un efecto matriz muy elevado, así como bajos porcentajes de recuperación. Es por ello, que el método solo cuenta con un pretratamiento mediante la precipitación de proteínas antes de la inyección en el sistema LC-MS/MS. En la tabla 2 se resumen los trabajos mencionados en la determinación de kisspeptina, incluyendo matriz de estudio y cifras de mérito.

El bioanálisis de péptidos y proteínas por LC-MS puede ofrecer varias ventajas sobre el inmunoensayo, incluyendo precisión y exactitud mejoradas y mayor rendimiento. Sin embargo, la mayor ventaja de LC-MS es el poder de resolución ortogonal de la separación cromatográfica seguida por la detección del MS, permitiendo distinguir entre sí péptidos y proteínas estructural o químicamente similares. Desarrollar y validar métodos de LC-MS para proteínas y péptidos puede ser un desafío, y presenta diferencias adicionales sobre los métodos convencionales para el tratamiento de pequeñas moléculas. Para la preparación de muestras (separación/limpieza), varios autores informan el uso de la purificación utilizando técnicas como la precipitación de proteínas y la SPE [52].

2.3.2 Hormonas Sexuales

Como ya se mencionó anteriormente, todo el proceso que regula la kisspeptina involucra la segregación de las hormonas sexuales por parte de las gónadas. El proceso de segregación se resume a continuación: Las hormonas esteroides se sintetizan principalmente en las gónadas, glándulas suprarrenales y la unidad feto-placentaria. Colesterol, que es el precursor común de todas las

hormonas esteroides, es el primero convertido en pregnenolona, y la vía esteroidogénica luego diverge hacia la formación de hormonas sexuales, glucocorticoides, o mineralocorticoides. En la vía de la hormona sexual, la pregnenolona se convierte primero en progesterona, que sirve como intermediario para la síntesis de andrógenos y estrógenos (Figura 5). Los estrógenos se sintetizan a partir de andrógenos por la formación de un anillo A aromático, y esta reacción se cataliza por la enzima aromatasa. Las hormonas esteroides sexuales actúan a través de sus receptores: estrógeno a través del receptor de estrógeno (ER α o ER β), progesterona a través del receptor de progesterona (PR-A o PR-B) y los andrógenos a través del receptor de andrógenos (AR) [53].

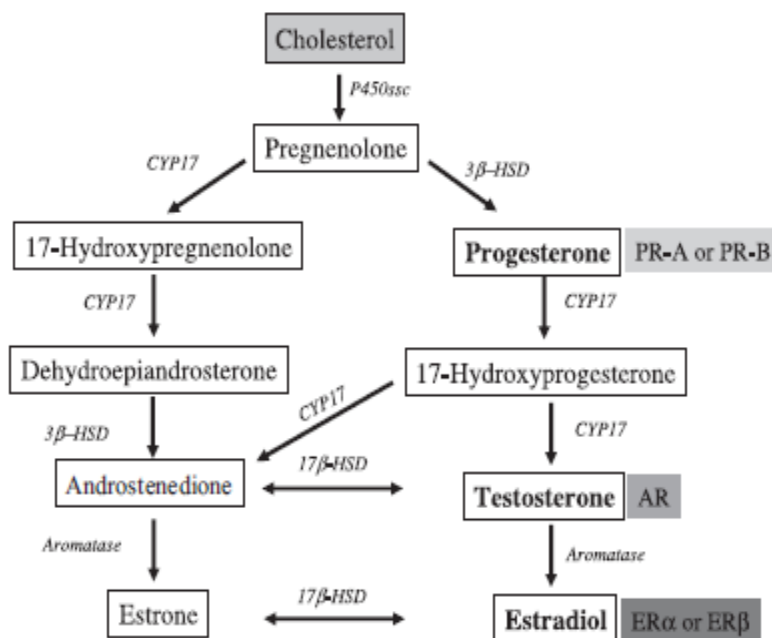


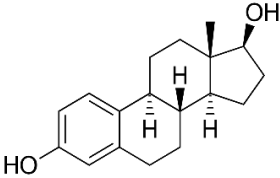
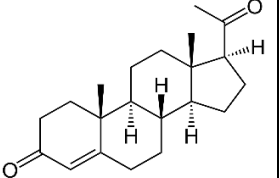
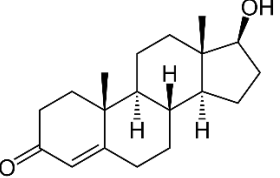
Figura 5. Descripción de la vía de biosíntesis de las hormonas esteroides sexuales y receptores nucleares asociados [53].

De las hormonas sexuales dependen aspectos como la fecundidad, el embarazo, el deseo sexual o el desarrollo de nuestro cuerpo. Las hormonas sexuales residen en nuestro cuerpo desde la infancia, pero no es hasta la pubertad cuando éstas alcanzan su mayor producción. Dependiendo del sexo, las hormonas reciben un nombre y función diferente: en la mujer, los estrógenos (representados principalmente por el estradiol y la estrona) y los progestágenos (progesterona) son

secretados por los ovarios y la placenta. En el hombre, se habla de andrógenos (siendo testosterona la principal representante), producidos por los testículos [54].

En vista de la fuerte interrelación que existe entre las hormonas sexuales y la kisspeptina, fueron seleccionadas tres de ellas como de interés para esta investigación: 17β -estradiol, testosterona y progesterona (una representante de cada grupo de estrógenos, andrógenos y progestágenos, respectivamente). En la tabla 3 se mencionan algunas propiedades fisicoquímicas de ellas de relevancia para desarrollar el trabajo.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de hormonas sexuales en estudio (Physical property data is provided to ChemIDplus by SRC, Inc.)

Hormona	17β -estradiol	Progesterona	Testosterona
Estructura molecular			
Fórmula molecular	$C_{18}H_{24}O_2$	$C_{21}H_{30}O_2$	$C_{19}H_{28}O_2$
Peso molecular (g/mol)	272,3856	314,4660	288,4282
Masa monoisotópica (g mol ⁻¹)	272,1780	314,2250	288,2090
Constante de acidez (pKa)	10,1	N/A	N/A
Hidrofobicidad (log K _{o/w})	4,01	3,87	3,32
Constante de Henry (atm·m ³ /mol) 25°C	3.64E-11	6,49E-08	3,53E-09
Solubilidad (agua, mg L ⁻¹)	3,60	8,81	23,4

Concentraciones de Hormonas Sexuales

Debido a la importancia que tienen las hormonas sexuales en el desarrollo y regulación de todo el sistema reproductor y algunas otras propiedades, se han establecido clínicamente las concentraciones normales que se deben encontrar en suero sanguíneo. Esto es utilizado por muchos laboratorios como valores de referencia al momento de establecer alguna patología o disfunción del sistema endocrino. En la tabla 42 se resumen los valores definidos para las hormonas de interés en sangre para esta investigación y los cuales son determinados normalmente mediante inmunoensayos. Además, en la Figura 6 se muestran los niveles relativos de kisspeptina y hormonas sexuales durante el ciclo menstrual.

Tabla 4. Valores normales de hormonas sexuales en suero sanguíneo [55].

	Nonpregnant females					
	Males	Follicular	Preovulatory	Luteal	Pregnant females	Menopausal females
Testosterone	2–15 ng/ml 6–50 nM	200–800 pg/ml 0.7–2.5 nM	200–800 pg/ml 0.7–2.5 nM	200–800 pg/ml 0.7–2.5 nM	1–1.4 ng/ml 3.5–5 nM	200–800 pg/ml 0.7–2.5 nM
Estradiol	15–50 pg/ml 50–200 pM	20–100 pg/ml 80–500 pM	150–400 pg/ml 0.5–1.5 nM	60–200 pg/ml 0.2–0.8 nM	1–40 ng/ml 1–150 nM	10–30 pg/ml 40–120 pM
Progesterone	250–900 pg/ml 0.8–2.8 nM	0.3–1.2 ng/ml 0.3–1.5 nM	0.7–2.5 ng/ml 2–10 nM	1–18 ng/ml 10–60 nM	9–300 ng/ml 25–1000 nM	<0.2–1.1 ng/ml 0.6–3.5 nM

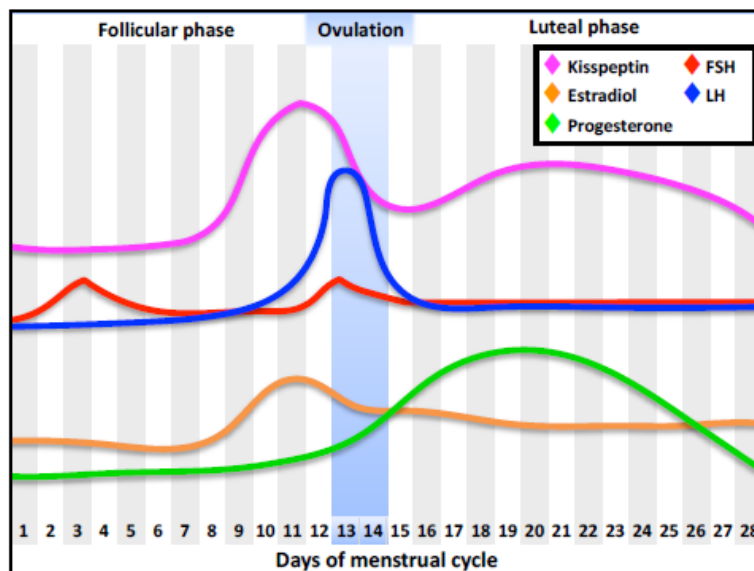


Figura 6. Niveles de Kisspeptina y hormonas sexuales durante el ciclo menstrual [51].

En cuanto a la concentración de estas hormonas en orina, no existen valores de referencia reportados. Sin embargo, en la tabla 5 se resumen algunos valores encontrados en otros trabajos.

Tabla 5. Concentraciones de hormonas sexuales en orina en ng/mL

Testosterona		Estradiol		Progesterona		Referencias
Hombre	Mujer	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer	
21,5 - 109,6	4,1 - 10,3	0,7 - 2,9	0,4 - 5,4	---	---	[56]
---	---	---	13	---	3,2	[57]
---	---	---	---	---	2,54*	[58]

*embarazada

Determinación de Hormonas Sexuales

Los métodos basados en CG cuentan con una etapa previa de derivatización del extracto a inyectar en el cromatógrafo debido a la baja volatilidad y estabilidad térmica de las hormonas, además se ha encontrado que dependiendo del tipo de hormona sexual (estrógeno, progestágeno o andrógeno) se utilizan métodos de derivatización diferentes. La razón principal de esta variabilidad es la naturaleza química entre ellas a pesar de poseer una estructura química similar. La reacción tradicional de sililación para la derivatización es una reacción con los grupos –OH fenólicos, a los cuales pueden ser inertes en ausencia de catalizador los grupos –OH alcohólicos, o simplemente no reaccionar ante compuestos que solo poseen grupos carbonilos. Para el caso de los estrógenos se suele usar la derivatización del hidroxilo fenólico catalizado por piridina, mientras que para andrógenos y progestágenos se utiliza la derivatización del grupo carbonilo. En la tabla 6, se resumen los trabajos enfocados principalmente a la determinación de los analitos de interés, donde se observa que solo en uno de los casos se determinan simultáneamente las tres hormonas de interés para nuestra investigación (progesterona, 17 β -estradiol y testosterona) [59]. En cuanto a los trabajos mediante LC (tabla 7) algunos autores reportan reacciones de derivatización debido a la ineficiente ionización de estrógenos en fuentes ESI y APCI. Para los sistemas MS/MS la cuantificación resulta sin pasos previos de derivatización.

Tabla 6. Determinación de hormonas sexuales basadas en métodos de GC con detección MS o MS/MS.

Técnica	Muestra	Volumen muestra (mL)	Derivatización			Tiempo de Extracción (min)	Tiempo cromatográfico (min)	LOD (ng L ⁻¹)			Exactitud (%Re)	Precisión (%RSD)	Referencias	
			Agente	Volumen (μL)	Temperatura (°C)			Test	Prog	E2				
MNPs-SPE-GC-MS/MS	agua potable, de río, de pozo y efluente	10	MSTFA/TMIS /DTE (1000:2:5, v/w/v)	100	25	5	45	17	---	4	---	94,6 - 109,7	< 9	[60]
SPE-GC-MS	plasma	0,3 - 0,5	BSTFA (10%TMS) / ACN	50/50	56	25	15	24	---	46	161	83,4 - 97,3	8 - 14	[61]
SPE-GC-MS/MS	orina	1	MSTFA/NH ₄ /BTE (1000:2:6, v/w/v)	50	60	20	15	22	100	---	80	82 - 95	8 - 16	[56]
LLE-SPE-GC-MS/MS	suero humano	0,25	pyr:AcOET (1:99)/PFB-Cl	500/50	60	30	27	30	30	---	1	79,5 - 99,0	< 7	[62]
			PFB-NH ₂ en pyr (1mg/ml)	100	60	30			---	50	---			
MSPD-GC-MS	manteca	0,5 g	HFBA:ACN (1:5)	360	60	65	25	15	---	500	300	84,5 - 111,2	1,9 - 8,9	[63]
SPE-GC-MS	Agua residual	nr	NH ₂ OH.HCl/H MDS/TFA	125/225/25	70	30	15	25	18,8	1,88	---	79 - 106	1,5 - 5,8	[64]
GC-MS	solvente	0,1	MSTFA/TMIS /DTE (1000:2:5, v/w/v)	100	25	5	N/A	33	---	1000	10	nr	nr	[65]
SPE-GC-MS/MS	suero bovino	> 1	MSTFA:TMIS :DTE (1000:2:50, v,v,v)	50	60	60	15	25	360	360	160	78 - 120	1 - 8	[59]

Tabla 7. Determinación de hormonas sexuales basadas en métodos de LC con detección DAD, MS o MS/MS

Técnica	Muestras	Volumen de muestra (mL)	Derivatización	Tiempo de Extracción (min)	Tiempo cromatográfico (min)	LOD (ng L ⁻¹)			Exactitud (%Re)	Precisión (%RSD)	Referencias
						T	P	E2			
SPE-LC-MS/MS	plasma y suero humano	2	50µLNaHCO ₃ / 50µLCloruro de dansilo a 60°C x 3 min (para E2)	75	27	1000	1000	1000	nr	< 14	[66]
SPE-UPLC-MS/MS	plasma / cerebro	0,5	50ul QAO: 950ulMetanol/H2O (7:3) 50/950 a 25°C x 60 min	15	8	1	5	---	85,3 - 107,9	5,2 - 20,5	[67]
SBSE-HPLC-DAD	orina	20	No	60 (a 600 rpm)	13	180	120	---	21,2 - 81,8	4,2 - 10, 0	[58]
SBSE-LD-HPLC-DAD	aguas ambientales / orina	30	No	240 (a 750 rpm)	40	---	300	1000	11,1 - 100,2	2,1 - 17,1	[57]
Precipitación Proteínas-UHPLC-ESI-MS/MS	suero caballo	0,4	No	30	11	20	200	20	85,6 - 99,4	7 - 18	[68]
SPE-LC-MS/MS	sedimentos	5 g	No	510	18	60	70	220	78 -108	0,7 - 14,0	[69]
LLE-LC-MS/MS	suero	0,2	No	90	8	10	---	2,5	93 - 110	< 15	[70]
SPE-kit-HPLC-MS/MS	suero	0,5	No	300	12	10 - 32000			68,2 - 99,2	5,2 - 14,8	[71]
SPE-LC-MS/MS (APCI)	suero o plasma	0,1	No	15	15	100	100	100	80 - 114	< 8,25	[72]
SPE-LC-MS (Qtrap)	Suero	0,1	No	15	4	20	30	40	80 - 114	< 15	[73]
LC-MS/MS APPI	Suero	0,2	No	Nr	nr	1,5 - 10			90 - 110	3,5 - 12.2	[74]

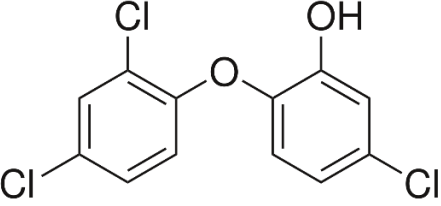
2.3.3 Triclosán

Definición, estructura y propiedades

Además de los compuestos mencionados anteriormente, y en función a las posibles afecciones que ocasionan en el sistema endocrino algunos contaminantes, se ha seleccionado el triclosán, como analito de interés para esta investigación. Se ha comprobado que este compuesto tiene efectos negativos en el sistema endocrino, por ejemplo en el sistema hormonal tiroideo [5], lo cual lo categoriza como compuesto disruptor endocrino (EDC).

El triclosán [5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol], TCS, es un fenoxifenol triclorado que presenta propiedades antibacterianas. Es un polvo blanquecino escasamente soluble en agua, hidrolíticamente estable y poco volátil, con una elevada hidrofobicidad. La tabla 8 resume algunas propiedades relevantes del TCS para el desarrollo de metodologías analíticas.

Tabla 8. Propiedades fisicoquímicas del triclosán (Physical property data is provided to ChemIDplus by SRC, Inc.)

Compuesto	Triclosán
Estructura molecular	
Fórmula molecular	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂
Peso molecular (g mol ⁻¹)	289,536
Masa monoisotópica (g mol ⁻¹)	287,951
Acidez (pKa)	7,9
Polaridad (log Kow)	4,76
Constante de Henry (atm·m ³ /mol a 25°C)	4,99E-09
Solubilidad (agua, mg L ⁻¹)	10

El triclosán está presente en múltiples productos relacionados con la desinfección en un rango que va desde 0,1 a 0,3 % (1000-3000 µg/g), como jabones, desodorantes, limpiadores, champús y cosméticos. Además, es adecuado para su introducción en polímeros y fibras, en almohadillas de colchón, tableros de corte, zapatos y ropa deportiva. Para los polímeros y tejidos, contenidos de triclosán (Microban®) de 300 µg/g ofrecen protección contra las bacterias Gram+, 750-1000 µg/g frente a bacterias Gram + y -, 300-5000 µg/g protección adicional al desarrollo de hongos; con 4000 µg/g es posible mantener las propiedades antibacterianas en aquellos productos que son lavados con frecuencia. Su uso más conocido es como aditivo en dentífricos, ya que se considera un agente activo contra la gingivitis, ejerciendo esta acción a concentraciones superiores a 0,05-0,06 mM (14-17 µg g⁻¹) [75].

Distribución en matrices ambientales y biológicas

En la bibliografía existente, se ha puesto de manifiesto la presencia de triclosán en distintas matrices medioambientales, tales como aguas residuales y superficiales, sedimentos, lodos, e incluso muestras de material biológico (músculo y grasa de pescado, leche materna, plasma y orina). En el caso de muestras acuosas, las concentraciones varían enormemente entre aguas residuales y aguas superficiales, pero también en distintas zonas del planeta. Salvo alguna excepción, el nivel medio de triclosán en el agua residual sin tratamiento es del orden de 2 ng mL⁻¹, mientras que en el agua residual tratada, los niveles son inferiores a 0,1 ng mL⁻¹ [76].

Las concentraciones de TCS documentadas en diferentes matrices biológicas humanas se presentan en la Tabla 9. La presencia de TCS en aguas residuales, leche humana y plasma demuestra sistémica distribución en humanos, pero absorción local por aplicación dérmica de cosméticos y uso de ropa interior que lo contienen. Una correlación ha sido reportada entre los niveles de TCS en plasma y leche y el uso de productos de cuidado personal tales como pasta de dientes, jabón y desodorantes axilares que contienen TCS. La detección de TCS en la leche materna plantea nuevas preguntas sobre los posibles efectos

adversos en una etapa sensible de la vida y tiene implicaciones para el riesgo de lactantes por ingestión oral. Se ha informado que TCS causa disrupción endocrina y es citotóxico, tiene propiedades estrogénicas débiles (agonista) y posee actividad antagonista de estrógenos a mayor concentración. Una revisión reciente sobre estudios de humanos con respecto a las exposiciones a triclosán y el riesgo de cáncer concluyeron que los estudios carecen de número y alcance. Fue particularmente notado que se necesitan estudios epidemiológicos de riesgo asociados con la exposición al triclosán.

Tabla 9. Niveles de Triclosán en diferentes matrices biológicas de todo el mundo [77].

Matriz	Concentración	País	Años de muestreo
Orina	19,9 $\mu\text{g g}^{-1}$	USA	2007 – 2008
Orina	13,0 ng mL^{-1}	USA	2003 – 2004
Suero	14,9 ng mL^{-1}	USA	1998 – 2003
Suero	19,0 ng g^{-1}	Australia	2002 – 2003
Suero	8,5 ng mL^{-1}	Hong Kong	N/A
Suero	1,71 ng mL^{-1}	Bélgica	N/A
Plasma	16,0 ng mL^{-1}	Suecia	2003 – 2004
Leche	0,54 ng mL^{-1}	Suecia	2003 – 2004
Leche	9,3 ng mL^{-1}	USA	N/A

2.4 Técnicas de interés para la investigación

2.4.1 Cromatografía de gases / Espectrometría de masas (GC-MS) [78].

La cromatografía de gases es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en cromatografía de gases

capilar. Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente.

En el caso de mezclas complejas, el cromatograma obtenido puede presentar muchos picos, algunos de ellos muy próximos, resultando difícil la identificación rápida y fiable de algún compuesto de interés. Cuando se desea explícitamente localizar la presencia de uno o varios compuestos determinados, de espectro conocido, con la mayor rapidez o con la máxima sensibilidad posible se recurre a la técnica de detección SIM ("selected ion monitoring"). En esta modalidad de trabajo se detectan solamente algunas masas de interés, en lugar de trabajar con el total de los iones (TIC). De esta forma, se aumenta la selectividad del método, reduciéndose las interferencias. Sin embargo, esta técnica analítica está fuertemente limitada a la volatilidad y polaridad de los analitos. En algunos casos, es posible disminuir la polaridad y aumentar la volatilidad de los compuestos mediante protocolos de derivatización previos a la inyección cromatográfica. En la figura 7 se muestra la reacción típica de derivatización (sililación) de grupos hidroxilos usando como reactivo N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA), y que por lo general se hace en presencia de un catalizador para promover la reacción.

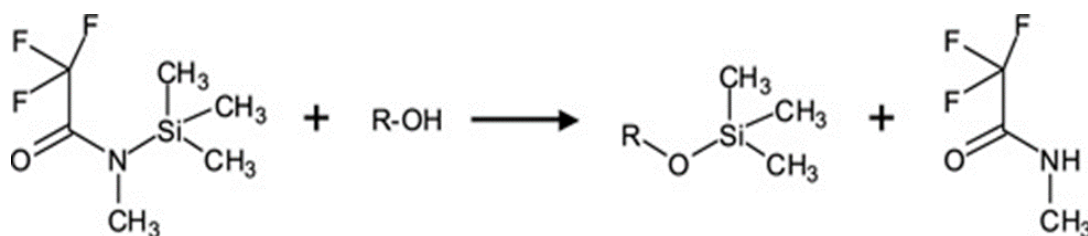


Figura 7. Reacción de derivatización con MSTFA

2.4.2 Cromatografía de Líquidos / Espectrometría de Masas (LC-MS) [79].

La cromatografía de líquidos es la técnica de separación más comúnmente utilizada para llevar a cabo la separación de compuestos polares (y

no polares) y su determinación en distintas matrices. La fase móvil es un líquido (o mezcla de varios), su uso es más universal y no está limitado por las propiedades de los compuestos ya que, a diferencia de la cromatografía de gases y en la mayoría de los casos, no se requiere una etapa de derivatización previa a la inyección cromatográfica.

Si se combina la cromatografía de líquidos con la espectrometría de masas el resultado es una técnica analítica de elevada selectividad y sensibilidad. Los primeros trabajos que utilizaron métodos LC-MS emplearon fuentes de ionización por termopulverización. Posteriormente y siguiendo la evolución de las técnicas de ionización en espectrometría de masas acoplada la cromatografía de líquidos, el TSP fue desplazado por las técnicas de ionización a presión atmosférica (API), que incluyen la electropulverización o electrospray (ESI) y la ionización química a presión atmosférica (APCI). En la fuente ESI la muestra líquida se introduce a través de un capilar al que se aplica un elevado potencial ($\pm 3-5$ kV), lo que permite producir un spray de microgotas cargadas, las cuales debido a repulsiones electrostáticas se dividen hasta provocar la desolvatación y evaporación de los iones. En las fuentes de APCI la fase móvil se introduce a través de una cámara de vaporización cilíndrica que se encuentra a elevada temperatura, lo que provoca la evaporación del efluente cromatográfico. La ionización química a presión atmosférica es una técnica de ionización suave, sin embargo, en algunos casos además de los iones correspondientes a la molécula protonada o desprotonada pueden aparecer fragmentos en el espectro.

Los iones generados en la interfase son acelerados hacia el analizador y separados en función de su relación masa/carga (m/z) mediante la aplicación de campos eléctricos (trampa de iones, IT), magnéticos (cuadropolo, Q o triple cuadropolo, QqQ) o simplemente determinando el tiempo de llegada a un detector (tiempo de vuelo, ToF). Los iones que llegan al detector producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador para finalmente generar el espectro de masas. En la Figura 8 se observa de forma general que

tipo de compuestos, de acuerdo a su polaridad y masa molecular, pueden ser analizados por las técnicas mencionadas anteriormente.

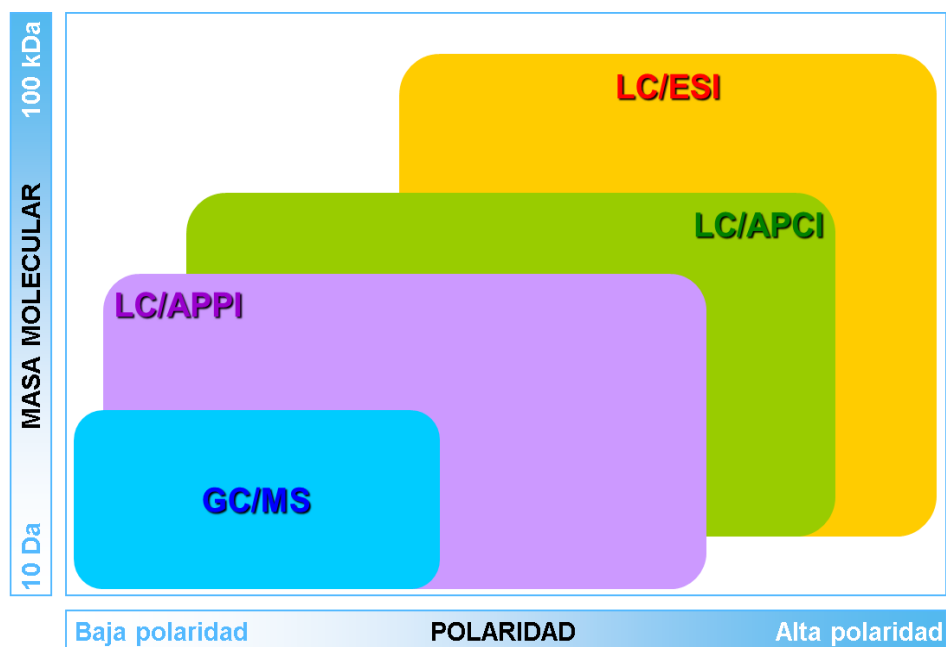


Figura 8. Distribución de compuestos de acuerdo a su polaridad y masa molar para su medición por cromatografía / espectrometría de masas.

2.4.3 Inmunoensayos

Un inmunoensayo es una prueba que usa complejos de anticuerpo (Ab) y antígeno (Ag) como medio para generar un resultado perceptible. Un complejo anticuerpo:antígeno también es conocido como inmuno-complejo. “Inmuno” se refiere a una respuesta inmunológica que hace que el cuerpo genere anticuerpos, y “ensayo” se refiere a una prueba. Entonces, un inmunoensayo es una prueba que utiliza inmunocomplejos cuando se unen los anticuerpos y los antígenos.

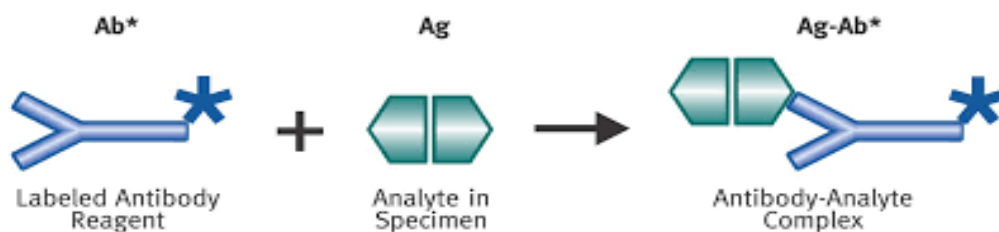


Figura 9. Representación de un inmunoensayo

La técnica se basa en la gran especificidad y afinidad de los anticuerpos por sus antígenos específicos. Los anticuerpos pueden ser monoclonales (obtenidos en el laboratorio) o de sueros policlonales (obtenidos de animales), siendo más específicos los monoclonales. Su gran sensibilidad y especificidad permite la cuantificación de compuestos presentes en distintas matrices en concentración reducida, del orden ng/mL o hasta de pg/mL.

Las técnicas de inmunoensayo pueden ser clasificadas de acuerdo a diferentes criterios: por la técnica de medición (competitivo y no competitivo), por el medio donde se realiza la medición (homogéneo y heterogéneo) o por el tipo de marcador (RIA, EIA, FPIA, entre otros). Se considera que los inmunoensayos con formato homogéneo no competitivo son los más sensibles y específicos.

Desventajas en el uso de inmunoensayos

Los métodos basados en inmunoensayos presentan algunas dificultades, en los que se puede mencionar de manera general lo siguiente:

- ❖ Pobre selectividad para péptidos pequeños.
- ❖ La especificidad disminuye al usar anticuerpos policlonales.
- ❖ Respuesta cruzada con algunos analitos estructural y químicamente similares al de interés.
- ❖ Poseen rangos dinámicos lineales sólo en el rango de cuantificación.
- ❖ Requieren de anticuerpos y antígenos los cuales son de muy costosa obtención y en algunos casos no se encuentran comercialmente disponibles.

Limitaciones en la determinación de hormonas sexuales mediante inmunoensayos [80]

Los inmunoensayos rápidos para hormonas sexuales a menudo concuerdan pobremente, especialmente a concentraciones normales y bajas. Estos problemas son el resultado de una baja especificidad del ensayo, una estandarización inadecuada y una pobre optimización de los métodos en un amplio rango de concentraciones observadas clínicamente. Estos sistemas a menudo no

son aptos para aplicaciones clínicas que requieren un límite de detección bajo, como los siguientes:

- ❖ Mediciones de estradiol en hombres (<30 pg/mL) o niños (<5 pg/mL a 45 pg/mL).
- ❖ Determinaciones de progesterona durante la estimulación ovárica, con valores <1 ng/mL el día de la administración de gonadotropina coriónica humana predictiva del embarazo en FIV-ET;
- ❖ Ensayos de testosterona para niños (<0.1 ng/mL a 1.5 ng/mL) y mujeres (0.7 ng/mL).

Se han comparado distintos límites de detección de kits comerciales de inmunoensayos para la determinación de estradiol y progesterona en plasma, encontrando para el estrógeno LODs entre 3 - 37 pg/mL y, para el progestágeno, entre 0,06 - 0,17 ng/mL.

Inmunoensayos y Espectrometría de Masas [81]

En esta combinación se quiere aprovechar lo mejor de cada tecnología, es decir, de los inmunoensayos la selectividad por cada péptido o proteína a través de su afinidad con los anticuerpos (inmunoafinidad) y, de la espectrometría de masas, la identificación inequívoca que permite resolver la reactividad cruzada que experimentan algunos compuestos. Si además se añade un sistema LC que permite separar los componentes de la muestra previamente a la detección, se disminuye considerablemente los problemas propios del efecto matriz con respecto a métodos que miden directamente la muestra.

La inmunoafinidad reduce significativamente la complejidad del extracto final de la muestra y, por lo tanto, se facilita la detección del analito por masas. Un factor crítico para la realización exitosa de ensayos es la disponibilidad de anticuerpos de la calidad apropiada. Anticuerpos monoclonales (mAb) o policlonales (pAb) de diferentes especies (ratón, conejo, cabra, etc.) se han utilizado con frecuencia para estos fines, aunque las estrategias de extracción basadas en receptores también se han usado. Mientras que los anticuerpos monoclonales

(diseñados contra uno epítopo definido) actúan como anticuerpos predecibles, los policlonales actúan sobre diversos epítopes y, por lo tanto, también pueden unirse a análogos estructurales, metabolitos o productos de degradación del analito primario. Por lo tanto, la elección del Abs necesita consideración cuidadosa a la luz del objetivo analítico deseado.

La inmovilización de los anticuerpos se realiza utilizando diferentes estrategias como el acoplamiento a perlas magnéticas, proteína A/G o estrategias similares, por ejemplo, la incubación de la matriz biológica en los pocillos ELISA comercialmente disponibles se describen con mucha frecuencia. Después de lavar el conjugado anticuerpo-antígeno inmovilizado, el péptido se eluye con eluyentes compatibles con MS (ácidos orgánicos, bases, etc.). En principio, dos opciones diferentes se establecen aquí: (a) una opción de captura directa con anticuerpos primario directamente inmovilizados en la superficie o (b) un efecto indirecto de captura con anticuerpos primarios que se unen a anticuerpos inmovilizados secundarios (por ejemplo, proteína A/G o estreptavidina) antes de capturar el péptido diana. Las estrategias son válidas para péptidos, así como para proteínas. Mientras que con la opción (a), la muestra de elución contiene el péptido/proteína objetivo solo, en la opción (b), eluye el péptido/proteína diana junto con el anticuerpo primario. La coelución del anticuerpo primario se evita potencialmente al entrecruzar la química de los compuestos, que es posible para ambos casos. Esto se resume en la Figura 10.

2.4.4 Métodos de microextracción

Por otro lado, para la extracción de muchos compuestos desde su matriz original, se han utilizado varias técnicas analíticas, que se caracterizan por contribuir con los principios de la química verde, usando pequeñas cantidades de disolventes orgánicos en etapas de acondicionamiento, extracción y limpieza, las técnicas más utilizadas microextracción en fase sólida (SPME), extracción por sorción en barra de agitación (SBSE), extracción por sorción en disco rotatorio (RSDE), microextracción en fase sólida (μ SPE) o microextracción por sorbente empaquetado (MEPS), dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), extracción en fase líquida

dispersiva (DLLE), entre muchas otras. En cuanto al interés en nuestra investigación, solo se describirán dos de ellas, RDSE y MSPD.

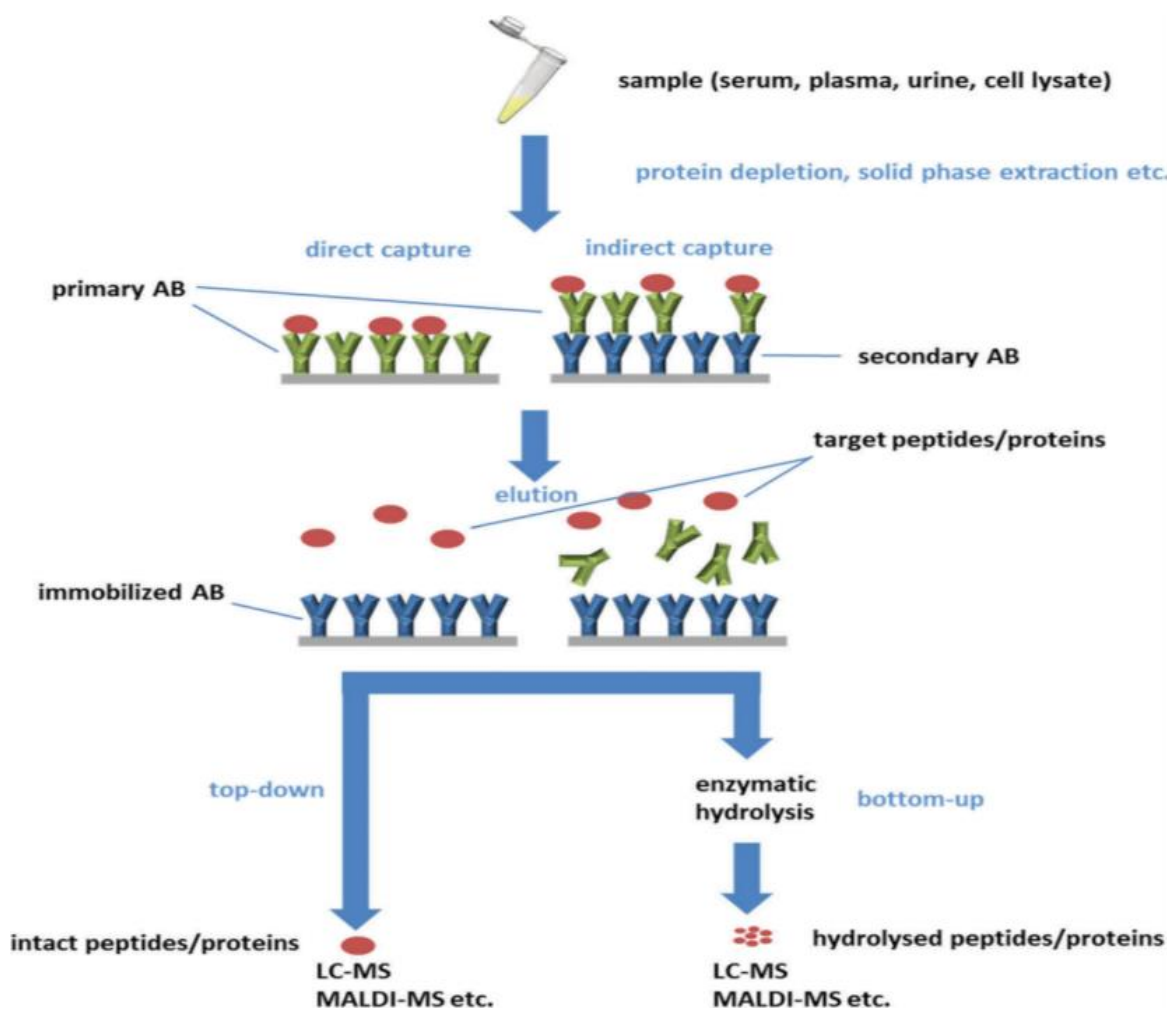


Figura 10. Esquema de las opciones de realización de ensayos por inmunocaptura directa o indirecta seguida de análisis por espectrometría de masas [81].

Extracción por sorción en disco rotatorio (RDSE)

En nuestro grupo de investigación, basándose en la tecnología de biorreactores rotatorios, se desarrolló la técnica de extracción por sorción en disco rotatorio (RDSE), con la finalidad de mejorar desventajas preexistentes en otras metodologías similares como SPME y SBSE (por ejemplo, poca versatilidad de fases sorbentes y deterioro de los dispositivos de extracción).

La RDSE consiste en un disco de teflón con una mini barra magnética en su interior, inicialmente recubierto con una fase sorbente de PDMS, inmovilizada en

una de sus superficies [82]. El disco tiene una fase con una alta razón superficie/volumen, y el disco puede rotar a muy altas velocidades (hasta 3000 rpm) superior a la barra de agitación utilizada en SBSE, sin que ésta se dañe, ya que, la fase sorbente sólo está en contacto con la muestra y no con el fondo del vial. PDMS es una fase sorbente que ha demostrado funcionar para compuestos químicos de baja polaridad, sin embargo, existen otras fases que extraen eficientemente compuestos con características más polares, como Oasis® HLB y St-DVB que han sido utilizadas. El dispositivo de extracción de RDSE fue modificado para poder inmovilizar este tipo de fases sorbentes, adaptándose mediante una cavidad central en la cual se introduce una fase sorbente en forma de polvo y se cubre con una lámina circular de fibra de vidrio, que es soportada por un anillo de teflón. RDSE es una técnica versátil, de fácil automatización, cumple con varios principios de la química verde [83], además de ser una técnica rápida y económica, resultando adecuada en el desarrollo de metodologías analíticas de diversos contaminantes medio ambientales como: antiinflamatorios no esteroideos [84], antibióticos [85], surfactantes [82], antisépticos [86], colorantes [87], PAHs [88], estrógenos [89], ftalatos [90], parabenos [91] y simultáneamente distintos contaminantes emergentes [92] y pesticidas [93]. La mayoría de estos estudios han sido en agua potable, de ríos y residuales, sin embargo existe muy poco en la literatura de la aplicación de esta técnica de extracción a fluidos biológicos [85], [94], [95]. En la Figura 11 se observa la conformación de disco rotatorio con cavidad (donde se añade la fase sorbente), el cual fue de interés en esta investigación.

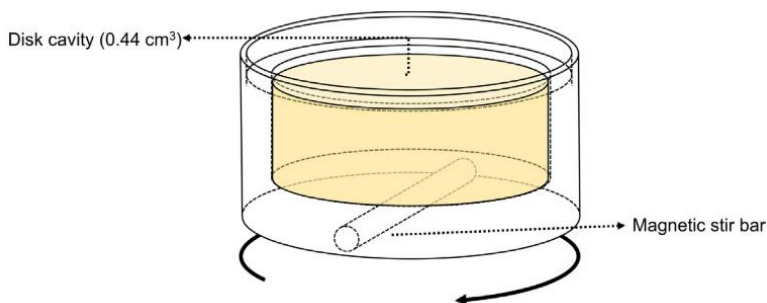


Figura 11. Representación del disco rotatorio con cavidad [93].

Dispersión de matriz en fase sólida (MSPD)

En esta técnica la muestra se mezcla con un sorbente para obtener una mezcla homogénea. La mezcla resultante se transfiere y se empaqueta en una columna de extracción. Luego se pasa el solvente a través de la columna para llevar a cabo el paso de lavado y elución para la extracción y aislamiento de analitos de la matriz. En algunos casos, se podría cargar un sorbente adicional en la parte inferior de la columna para limpiar aún más el eluyente. En general, el extracto final se puede analizar directamente por técnicas cromatográficas. En comparación con el método clásico de extracción con solvente, MSPD elimina los pasos de centrifugación repetida y/o filtración, y procedimientos de re-extracción [96]. Esta técnica se aplica principalmente a muestras de alimentos, matrices ambientales y tejidos biológicos.

En detalle, la muestra sólida, líquida o semisólida se mezcla junto con un soporte sólido, usando un mortero de vidrio y una mano de mortero, para obtener la interrupción completa y la dispersión de la muestra en el soporte sólido. La mezcla se tritura con una mano de mortero. Durante esta operación, la fase unida y su soporte cumplen varias funciones, incluyendo: a) proceso abrasivo que promueve la interrupción mecánica de la estructura de la muestra, b) ayuda a la interrupción de la muestra y la lisis de las membranas celulares similares a un solvente, y c) adsorción de los analitos u otros compuestos de interés de la muestra. La muestra se empaqueta en una columna vacía o encima de un sorbente de extracción en fase sólida. Sin embargo, la principal diferencia entre MSPD y SPE es que la muestra se dispersa por toda la columna y no se retiene solo en los primeros milímetros de la columna. La elución se puede realizar de dos maneras. En el primer método, los analitos objetivo se retienen en la columna y los compuestos interferentes se eluyen en la etapa de lavado, mientras que los analitos objetivo se eluyen posteriormente con un disolvente diferente. En el segundo método, los componentes de la matriz interferente se retienen selectivamente en la columna y los analitos diana se eluyen directamente [97]. La figura 12 resumen el método de preparación de muestra. Los valores típicos de muestra que se utilizan son 0,1 - 0,5 g o mL. La cantidad de fase

sólida añadida depende de la cantidad de muestra, y típicamente se usa un exceso de 4 a 6 veces mayor que la muestra [98].

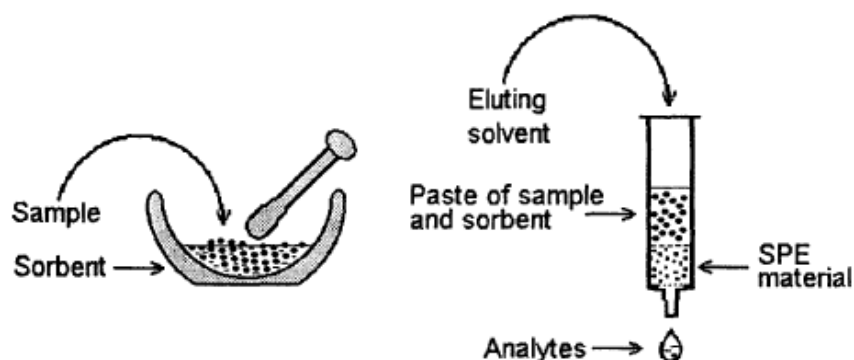


Figura 12. Esquema de preparación de muestra por MSPD [98].

Finalmente, la extracción de los analitos de la matriz está influenciada tanto por las propiedades del analito como por el sorbente. El sorbente ideal debe caracterizarse por una selectividad satisfactoria, buena estabilidad y cinética de adsorción y alta capacidad de adsorción, características que dependen del tamaño y distribución de poro, la superficie específica y la química superficial del sorbente. Debido a la naturaleza compleja de las biomuestras y la muy baja concentración de los analitos a determinar, la preparación selectiva de muestras se hace necesaria para superar las dificultades impuestas por estas dos limitaciones. Durante la última década se han desarrollado y optimizado nuevos enfoques de síntesis química, tales como sol-gel y tecnologías de impresión molecular, permitiendo la preparación de nuevos materiales para la preparación de muestras incluyendo grafeno y derivados, materiales magnéticos, líquidos iónicos, polímeros con impresión molecular, ecofases, y muchos más [99].

2.5 Matrices de interés para la investigación

2.5.1 Muestras de aguas

En el caso de la presente investigación, el primer objetivo se enfoca en el análisis de distintos tipos de muestras de aguas mediante la técnica RDSE para la evaluación simultánea multiclase de contaminantes emergente. Los contaminantes emergentes (CEs) son un conjunto de compuestos que se encuentran regularmente

en los sistemas acuáticos debido a su continua introducción a través de las aguas servidas. Los CEs se encuentran en las aguas porque los procesos aplicados para tratar aguas urbanas no son lo suficientemente efectivos para su eliminación [100]. Tienen un origen natural o antropogénico, que incluye componentes de productos de cuidado personal (PCPs), medicamentos, pesticidas, hormonas, industria química, entre muchos otros [101]. Se aplicará la metodología optimizada para evaluar los niveles de estos contaminantes en los sistemas de aguas en la Región Metropolitana de Chile, incluyendo efluente y afluente de la planta de tratamiento “El Trebal”, ríos, pozos y agua potable de la región de San Antonio.

2.5.2 Orina humana

La orina es un fluido biológico de fácil acceso del cual se puede extraer información valiosa, como por ejemplo la metabolización de las hormonas sexuales. Está compuesta principalmente por agua (>90%) y el resto son compuestos orgánicos como urea, creatinina, ácido úrico, enzimas, carbohidratos, hormonas, ácidos grasos, pigmentos e iones inorgánicos [102]. Su recolección no invasiva y fácil acceso a grandes volúmenes de muestra se convierte en una matriz ideal para el desarrollo de métodos analíticos. La principal limitante de la orina es su elevado efecto matriz que se ha demostrado afecta, por ejemplo, en la extracción de estrógenos. Previamente se ha reportado que la urobilina, producto de degradación de la bilirrubina, que afecta por ejemplo la estimación total de proteínas [103], su alto contenido en la orina de 0,1 a 2,5 mg dL⁻¹ [104] la convierte en un gran candidato a interferente de matriz. Es por ello por lo que se hará un estudio exhaustivo de *clean-up* para esta matriz y así mejorar las cifras de mérito asociadas al método, basado principalmente en la eliminación de la coloración amarilla intensa que permanece en los extractos de muestra luego de la extracción.

2.5.3 Suero de ratas

Las ratas y ratones son los animales más estudiados para investigaciones biomédicas ya que son los modelos idóneos para estudiar la evolución y tratamiento de numerosas enfermedades. A través de ellas se puede mostrar cómo reacciona el organismo de un mamífero frente a una agresión, una infección o una intoxicación

experimental. El hecho de que prácticamente todos los genes implicados en las enfermedades que padecen los seres humanos también estén presentes en ella, la convierten un modelo ideal para la investigación médica. Actualmente, la rata es el modelo animal preferido para estudiar patologías como diabetes, hipertensión, obesidad, trastornos renales y desórdenes del comportamiento. La principal desventaja del uso de ratas para ensayos bioquímicos es la poca accesibilidad a sus fluidos biológicos, orina y saliva son prácticamente inaccesibles y al suero o plasma (comúnmente usado) solo se pueden acceder entre 1-1,5 mL. Su ciclo estral es tan solo de 4 días y está compuesto por 4 etapas: proestro, estro, metaestro, diestro. En la Figura 13, se muestra el ciclo regular de una rata hembra junto a los niveles hormonales durante el ciclo y su ciclo circadiano.

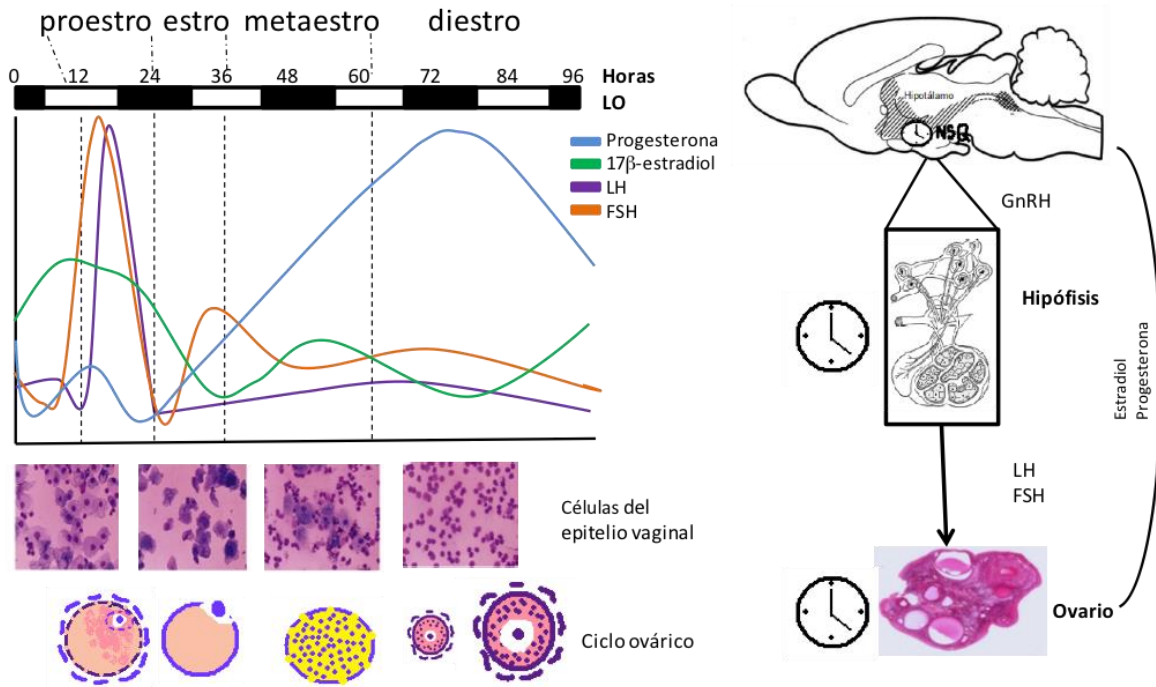


Figura 13. Cambios hormonales, ováricos y del epitelio vaginal durante el ciclo estral, y su control circadiano en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario [105]

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1. Hipótesis

Teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas, características estructurales de los analitos y las matrices de interés se contrastará la siguiente hipótesis general:

Hipótesis principal:

“El diseño e implementación de estrategias analíticas que contemplan RDSE, MSPD e inmunoafinidad para la determinación de biomarcadores (kisspeptina-10, hormonas sexuales y triclosán) en matrices biológicas mediante cromatografía y espectrometría de masas, permitirán la obtención de resultados con mejores cifras de mérito comparados con los obtenidos con metodologías basadas en SPE, LLE y medición directa vía screening”.

Hipótesis derivadas:

“El acoplamiento entre microextracción-cromatografía-espectrometría de masas, permitirá establecer metodologías de multideterminación de distintos EDCs junto con la factibilidad de conocer el efecto conjunto en el sistema endocrino del organismo”.

“La exposición a EDCs afectaría el sistema endocrino de ratas de laboratorio particularmente el proceso de acción de la kisspeptina y las hormonas asociados al sistema sexual del organismo”.

3.2. Objetivo General

Desarrollar estrategias analíticas que permitan extraer y cuantificar el péptido kisspeptina-10, así como las hormonas sexuales 17β -estradiol, testosterona y progesterona, y el compuesto disruptor endocrino triclosán, desde fluidos biológicos, utilizando las técnicas de microextracción, inmunoafinidad y cromatografía acoplada a espectrometría de masas.

3.3. Objetivos específicos

- ❖ Desarrollar y optimizar una metodología para la determinación simultánea de contaminantes emergente en muestras de aguas empleando RDSE/ Derivatización/GC-MS.
- ❖ Desarrollar y optimizar una metodología para la identificación, separación y cuantificación de hormonas sexuales y triclosán en muestras de orina empleando RDSE/Derivatización/GC-MS.
- ❖ Desarrollar y optimizar una metodología para la identificación, separación y cuantificación de kisspeptina-10, hormonas sexuales y triclosán en muestras de suero empleando MSPD/Derivatización/UHPLC-ToF/MS.
- ❖ Determinar el contenido de kisspeptina-10, hormonas sexuales y triclosán en fluidos biológicos.
- ❖ Evaluar la posible correlación existente entre la exposición a ratas de laboratorio de Triclosán y el comportamiento del sistema kisspeptidérgico (kisspeptina-10/hormonas sexuales).

4. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

Estándares

- ❖ Metil Parabeno, Butil Parabeno, Etil Parabeno, Propil Parabeno, Estrona, Estriol, 17 α -Ethinilestradiol, 17 β -Estradiol, Naproxeno, Triclosán, Bisfenol A, Testosterona, Progesterona, PCB 77, Triclosan-2,3,5-D₃ (Dr. Ehrenstorfer GmbH).
- ❖ Ácido Salicílico, Ácido Mefenámico, Diclofenaco, Ketoprofeno, Ibuprofeno, Testosterona-2,3,4-13C₃, Anticuerpo IgG Anti-ratón (Sigma-Aldrich).
- ❖ Kisspeptina-10, Kisspeptina-10-biotina, Anticuerpo-Kisspeptina-10, Kit comercial inmunoensayo enzimático (Phoenix Pharmaceuticals).

Reactivos

- ❖ N-Metil-N-trimetil-trifluoroacetamida (MSTFA), bicarbonato de sodio, piridina, cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato ácido de sodio, fosfato di ácido de potasio, agua MilliQ, ácido acético, acetato de sodio (Merck).
- ❖ Trimetildiosilano, ditioeritrol, cloruro de 1,2-dimetil-1H-imidazole-5-sulfonilo, Tween® 20 (Sigma-Aldrich).

Solventes y gases

- ❖ Metanol, acetonitrilo, acetato de etilo, diclorometano, agua, grado HPLC y grado LC-MS (Merck).
- ❖ Nitrógeno, N₂ 99,995%. (Linde), Helio, He 99,9999% (Indura).

Materiales

- ❖ Fases sorbentes: Oasis® HLB, Oasis® HLB PRiME (Waters corp). Sílice enlazada a grupos octadecilo (C18) y estireno-divinilbenceno St-DVB (Merck).
- ❖ Discos rotatorios de Teflón con cavidad y soporte con anillo. Filtros de fibra de vidrio. Tubos eppendorf de 1,5 mL.
- ❖ Viales de vidrio de extracción de 10, 25, 40 y 60 mL.
- ❖ Viales cromatográficos y de derivatización de 2 mL.

Equipos principales

- ❖ Cromatógrafo de Gases (Trace 1300) con detector selectivo de masas (ISQ). Thermo Scientific. Columna capilar Restek RTX-5MS (30m×0.25mm; 0.25µm), 5% phenyl - 95% methylpolysiloxane.



Figura 14. Cromatógrafo de Gases-Espectrómetro de masas ISQ. Thermo Scientific

- ❖ Cromatógrafo de Líquidos de Ultra Resolución con detector de masas por tiempo de vuelo (ToF). PerkinElmer Inc. Columna PerkinElmer SPP-C18 (2.1 mm×75 mm, 2.7µm). Sistema de bomba binario, depurador al vacío, inyector automático de enfriamiento y compartimento de columna termostaticado.



Figura 15. Cromatógrafo de Líquidos (UHPLC)-Espectrómetro de Masas ToF. Perkin Elmer.

- ❖ Espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) Nicolet iS5, Thermo Scientific. Acoplado a un accesorio de muestreo inteligente de reflectancia total atenuada (ATR) iTX-iD7 con cristal de diamante.



Figura 16. Espectrómetro ATR-FT-IR. Thermo Scientific.

- ❖ Equipos auxiliares: pH-metro, agitador magnético (hasta 3000 rpm), vórtex, evaporador con corriente de nitrógeno y temperatura controlada, placa calefactora para derivatización, destilador de agua desionizada. Medidor de placas para inmunoensayos.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN POR OBJETIVOS

5.1. Objetivo 1: Determinación simultánea multiresiduo y multiclase de contaminantes emergentes en muestras de aguas empleando RDSE/ Derivatización/GC-MS.

5.1.1 Parte Experimental

5.1.1.1 Condiciones GC-MS

En la Tabla 10, se resumen las condiciones cromatográficas y de espectrómetro de masas

Tabla 10. Condiciones cromatográficas/masas del método optimizado la multiclase de Ces en aguas.

Cromatógrafo de Gases	Espectrómetro de Masas
Volumen de inyección: 2 μ L	Tipo de Fuente: Ionización
Modo Inyección: Splitless	Electrónica (EI)
Temperatura del inyector: 250°C	Analizador: Cuadrupolo
Rampas de calentamiento:	Simple (ISQ)
C ₀ = 75°C x 1 min	Temperatura línea de
C ₁ = 150 °C a 20 °C min ⁻¹ x 5min	transferencia: 250°C
C ₂ = 300 °C at 10 °C min ⁻¹ x 5min	Temperatura de la fuente:
Gas de Arrastre: Helio (He)	300°C
Flujo: 1 ml min ⁻¹	Dwell time: 0,1 s x cada m/z.
Tiempo de análisis: 27 min	
Solvent delay: 7 min	

En la tabla 11 se muestran los tiempos de retención a los que eluye cada analito, así como sus respectivos iones cuantificadores y calificadores usados para la detección.

Tabla 11. Tiempos de retención (min) y iones (m/z) usados para la detección de contaminantes emergentes en aguas.

Analito	Tiempo de retención (min)	Ión cuantificador (m/z)	Ión calificador (m/z)
Metil parabeno (MP)	9,61	209	224
Ácido Acetilsalicílico (AsA)	10,05	267	268
Etil parabeno (EP)	11,19	238	223
Ibuprofeno (Ibu)	12,31	234	278
Propil parabeno (PP)	13,06	210	195
Butil parabeno (BP)	14,66	195	210
Naproxeno (Nap)	18,48	302	287
Triclosán (TCS)	19,02	200	345
Bisfenol A (BPA)	19,63	357	358
Ácido Mefenámico (MAc)	19,70	298	313
Ketoprofeno (Ket)	19,70	311	282
Diclofenaco (Dic)	20,59	214	242
Estrona (E1)	23,44	257	342
Estradiol (E2)	23,67	285	416
Etinilestradiol (EE2)	24,53	425	440
Estriol (E3)	25,17	345	504

5.1.1.2 Protocolo de Derivatización

Se estudió el protocolo de derivatización de un estándar múltiple de 250 µg L⁻¹. Se añaden 100 µL del multiestándar a un vial de 2 mL y se evapora bajo una corriente de N₂. Se añaden 70 µL de volumen de agente de derivación (MSTFA) y 50 µl de piridina y se agita en un vórtex para homogeneizar la solución. La reacción de derivatización se lleva a cabo en una placa de calentamiento a 80 °C y 35 min. Después de enfriar, se analiza en GC-MS. Los tres parámetros para la derivatización: el volumen de MSTFA, la temperatura y el tiempo de reacción se optimizaron mediante un diseño de experimentos. La repetibilidad del método final seleccionado para derivatizar se evaluó a partir de seis muestras replicadas

preparadas. La estabilidad de las muestras derivatizadas se evaluó inyectando la misma muestra repetidamente durante un período de 48 h.

5.1.1.3 Protocolo de Extracción

El disco rotatorio tiene una cavidad de 0,44 cm³ en una de sus superficies, en la cual se cargaron 40 mg de Oasis® HLB. La cavidad se cubrió con un filtro de fibra de vidrio (1,4 cm de diámetro, 3 mm de tamaño de poro medio) y se selló con un anillo de teflón. Antes de la extracción, el disco que contenía la fase sorbente se acondicionó con acetato de etilo, metanol y agua desionizada durante 5 minutos cada uno a 2000 rpm.

Este procedimiento ha sido descrito por diferentes autores y se modificó de la siguiente manera: se añadió una alícuota de 20 mL de una muestra estándar o de agua en un vial y se ajustó a un pH 6 con tampón de acetato. El disco rotatorio que contenía la fase Oasis® HLB se colocó dentro del vial, y el disco se hizo rotar a 3000 rpm durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de la extracción, el disco se colocó en un vial de 10 ml que contenía 10 ml de metanol como disolvente de desorción y se agitó durante 10 min a 2000 rpm. El extracto de metanol que contenía el analito fue concentrado y se evaporó a sequedad bajo una corriente de N₂. El extracto se derivatizó mediante el método de derivación previamente optimizado y se analizó mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas en modo SIR. La fase sorbente empleada y el tiempo de extracción óptimo de equilibrio fueron examinados mediante ensayos univariados.

5.1.1.4 Validación del método

Los resultados de linealidad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), repetibilidad (%RSD), efecto de matriz (%ME) y la recuperación (%Re) se consideraron los parámetros esenciales para garantizar la validación del método analítico. La curva de calibrado fue realizada con muestras de aguas (matriz) dopadas a 6 niveles de concentración (0,1 - 20 µg L⁻¹) y la linealidad fue expresada en función de los valores de los coeficientes de correlación (r²). Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ) fueron determinados

en base a 3 y 10 veces la desviación estándar relativa de una curva a baja concentración ($0,1 - 1 \mu\text{g L}^{-1}$) y la pendiente del calibrado para cada analito. La repetibilidad del método final fue evaluada en 6 réplicas de muestras preparadas a $4 \mu\text{g L}^{-1}$ en cada matriz. La recuperación y la tasa de efecto de la matriz se calcularon en base a las siguientes ecuaciones:

$$\text{Re (\%)} = \frac{A_{S4} - A_{S3}}{A_{S2}} \quad \text{eq. 1} \quad \text{ME (\%)} = \frac{A_{S2} - A_{S3}}{A_{S1}} \quad \text{eq. 2}$$

Donde cada término corresponde al área o área relativa de:

S1: multiestándar a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ of each analyte. S2: extracto de muestra real obtenido usando RDSE y que fue enriquecido a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ antes de la inyección. S3: extracto obtenido directamente desde una muestra real (blanco). S4: extracto obtenido de una muestra real dopada a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ desde el inicio de la extracción por RDSE. Vale acotar, que usando estas ecuaciones, las recuperaciones obtenidas están libres de efecto matriz y viceversa.

El factor de enriquecimiento (%EF) fue calculado en base a la relación entre el factor de preconcentración teórico y las recuperaciones absolutas de cada analito.

5.1.1.5 Muestras reales

Las muestras de agua naturales: río, pozo y potables fueron recolectadas en las cercanías de la ciudad de San Antonio, Chile. Los efluentes y afluentes fueron obtenidos desde una planta de tratamiento de aguas de la ciudad Santiago, Chile. Para su preservación, se filtraron para eliminar posibles impurezas y se congelaron a $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ antes del análisis. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

5.1.2 Resultados y Discusión

De acuerdo con la importancia expuesta en el marco teórico respecto a los contaminantes emergentes (CEs) inicialmente se planteó la necesidad de desarrollar una metodología para determinar algunos de ellos simultáneamente en muestras de aguas. Existe escasa información de métodos de mutideterminación de distintas familias de compuestos, esto se debe principalmente a que sus estructuras químicas y sus propiedades fisicoquímicas afectan directamente a los pasos intermedios del análisis (por ejemplo, extracción y derivatización), lo cual repercute finalmente en metodologías más complejas y con la necesidad de ser optimizadas. En este caso, los compuestos de interés corresponden a una familia de parabenos (metil, etil, propil y butil) usados como preservantes, hormonas estrogénicas (estrone, estradiol, estriol y etinilestradiol) de origen natural y sintético, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (ácido acetilsalicílico, ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, diclofenaco y naproxeno), triclosán (bactericida o fungicida) y bisfenol A (plastificante).

5.1.2.1 Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas

Se hicieron múltiples ensayos para lograr la separación del total de compuestos realizando variaciones en las rampas de temperaturas del horno cromatográfico. Inicialmente se hicieron ensayos modo Full Scan para identificar los iones cuantificadores y calificadores que serán usados subsiguientemente en el modo de trabajo SIM. Debido a la cantidad de analitos, se realizaron ventanas de tiempo en las cuales sólo se monitorean un conjunto de masas, esto permite principalmente aumentar la sensibilidad en la detección, la cual es necesaria al trabajar en los niveles tan bajo que se encuentran estos contaminantes en aguas (en el orden de los $\mu\text{g L}^{-1}$ y ng L^{-1}).

En la Figura 17, se ilustra el cromatograma de elución del total de analitos en modo SIM. El cromatograma (a) representa el total de compuestos (TIC), y los siguientes se separan por familias de compuestos, es decir, en el (b) se observa la familia de parabenos, en la (c) la familia de hormonas, en la (d) la familia de antiinflamatorios y, en la (e) el triclosán y el bisfenol A.

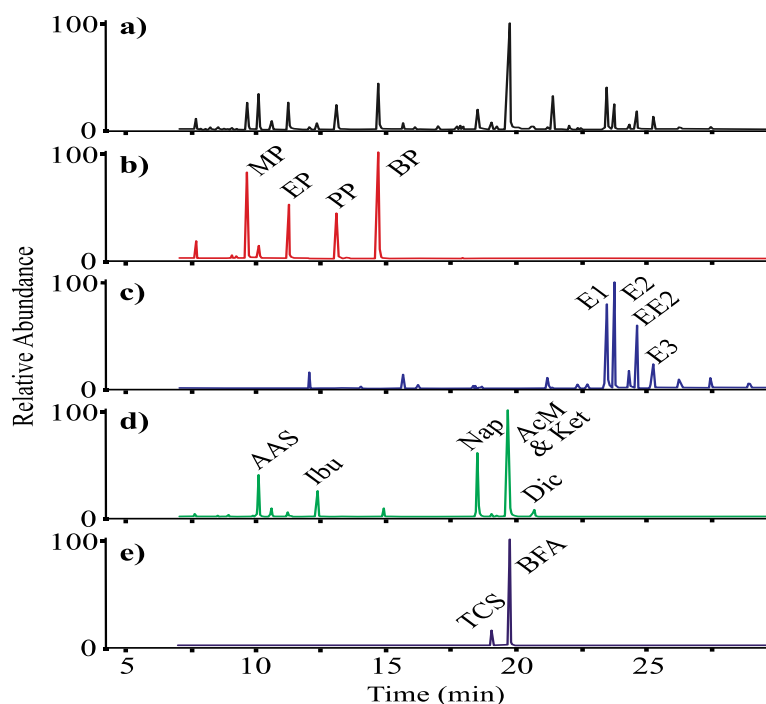


Figura 17. Cromatograma de elución del método multiclase de contaminantes emergentes (a) TIC (b) parabenos (c) hormonas estrogénicas (d) antiinflamatorios no esteroidales y (e) triclosán y bisfenol A.

Se hicieron varios intentos para separar los compuestos que coeluyen a 19,63 - 19,70 min (AcM, Ket y BFA), sin embargo, no se obtuvieron resultados positivos ni modificando el flujo del gas de arrastre ni variando la temperatura en el horno. Es por lo que se decidió trabajar bajo esta condición tomando en cuenta que ninguno de los iones seleccionados interfiere con alguno de los iones de los otros dos analitos. En Figura 18 se pueden observar los espectros de masas para los tres compuestos donde se corrobora lo anteriormente mencionado.

5.1.2.2 Estudio de reacción de derivatización

En vista de las diferencias estructurales y fisicoquímicas de los compuestos en estudio, se decidió estudiar a profundidad la reacción de derivatización previa a la inyección en el GC-MS. Como ya se mencionó previamente, una de las reacciones de derivatización más utilizada es la sililación de grupos $-OH$ usando reactivos como la N-metil-N-trimetil-trifluoroacetamida (MSTFA). Para favorecer la reacción de derivatización de compuestos impedidos como la hormona EE2, se utiliza piridina en exceso como catalizador de la reacción.

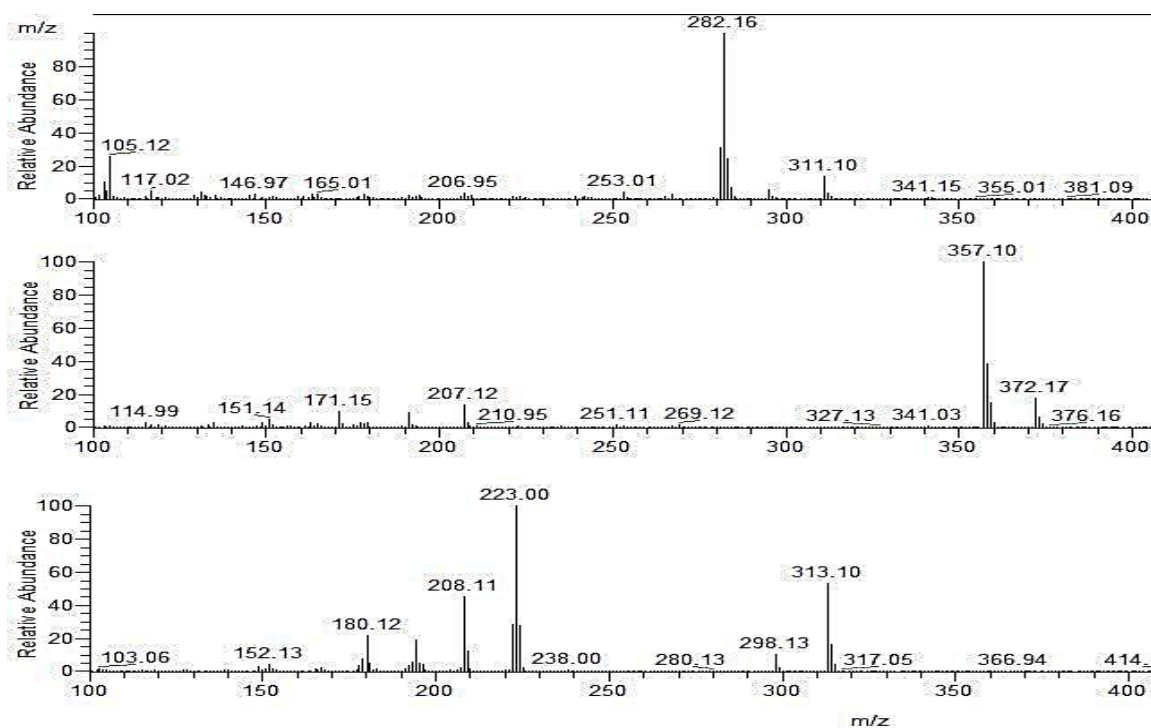


Figura 18. Espectros de masas (EI) para (a) Ket, (b) BFA y (c) AcM

Se ha reportado que estas reacciones se rigen por variables como volumen de agente derivatizante (K1), temperatura (K2) y tiempo de reacción (K3). El uso de herramientas quimiométricas como el Diseño de Experimentos (DoE) permite un estudio simultáneo de estos factores que controlan la reacción. En primera instancia se hizo un estudio de tipo screening para determinar qué factores son significativos en la reacción. Seguidamente, se procedió con una optimización tipo Doehlert con los factores significativos en la siliación, para finalmente utilizar la función Deseabilidad de Derringer para encontrar la condición óptima de trabajo.

Estudio tipo Screening

Este involucra un total de 2^K experimentos, donde K es el número de factores en estudio. En este caso, para $K=3$, un total de 8 experimentos más 2 centros fueron ejecutados. En la tabla 12 se resumen los valores codificados y reales de los experimentos ejecutados.

Tabla 12. Matriz screening para estudio de derivatización de contaminantes emergentes.

Experimento	Valores codificados			Valores reales		
	A	B	C	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Volumen de MSTFA (µL)
1	-1	-1	-1	40	20	30
2	1	-1	-1	80	20	30
3	-1	1	-1	40	60	30
4	1	1	-1	80	60	30
5	-1	-1	1	40	20	70
6	1	-1	1	80	20	70
7	-1	1	1	40	60	70
8	1	1	1	80	60	70
9	0	0	0	60	40	50
10	0	0	0	60	40	50

La influencia de cada factor se determinó a partir de la estimación de la varianza experimental con una prueba t y se mostró en un gráfico de interacciones de factores en un intervalo de confianza del 95%.

Los resultados reflejaron lo siguiente:

- ❖ Comportamiento similar entre los compuestos de la misma familia, lo cual era de esperarse considerando que las variaciones estructurales intrafamilias son muy pocas.
- ❖ Comportamientos interfamilias muy distintos, lo cual también corresponde a lo reportado en la literatura donde, por ejemplo, la familia de hormonas se ven afectadas positivamente por el aumento de temperatura, mientras que para los parabenos ocurre lo contrario.
- ❖ En cuanto a la significancia (al 95%), se encontró que para algunos compuestos (como el estradiol), ninguno de los factores estudiados tiene relevancia en la derivatización, mientras que, para otros como el naproxeno, todos los factores

son significativos en la reacción. En la figura 19 se observan los diagramas de Pareto para algunos compuestos, donde se observan dichas diferencias.

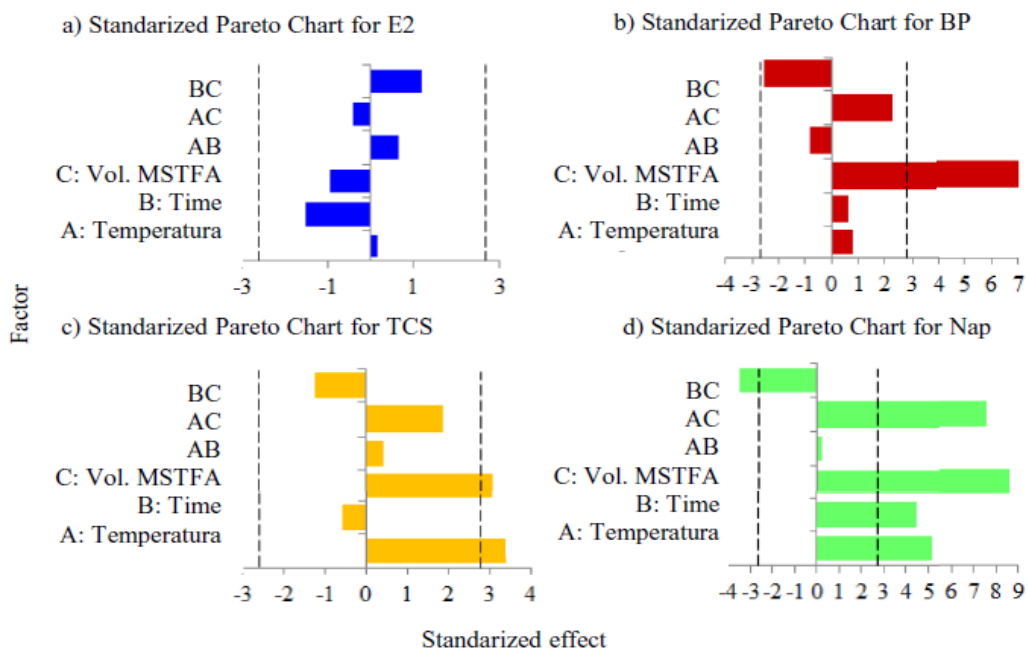


Figura 19. Gráfico de Pareto de los efectos principales y las interacciones cruzadas. La línea punteada vertical indica el intervalo de confianza del 95% para E2, BP, TCS y Nap.

En vista de este resultado, y considerando la importancia que implica un método de derivatización que favorezca la mayor cantidad de analitos posible, se decidió considerar los tres factores (volumen de derivatizante, tiempo y temperatura de reacción) para el estudio de optimización y superficie multirespuesta.

Estudio de Optimización

Existen distintos métodos de optimización los cuales se basan principalmente en el aumento del número de experimentos intermedios con respecto al screening, de manera de poder hacer un estudio más amplio y ajustado a la realidad de la variación de los factores. El método utilizado en este caso es conocido como Doehlert [106], este se rige por la expresión $K^2 + K + 1$ para determinar el número de experimentos, si $K=3$ entonces el número de experimentos es 13. La ventaja que ofrece este diseño con respecto a otras matrices de optimización es que se pueden variar los factores en distintas proporciones, para el caso de 3 factores las opciones de variación son tres, cinco y siete. De esta manera

se le puede asignar al factor más significativa la mayor variación y, por el contrario, la menos influyente sólo se varía tres veces. Al evaluar los resultados del screening se encontró que la temperatura de reacción fue el factor más significativo, mientras que el volumen de derivatizante el que menos influye para el total de analitos. En la tabla 13 se muestra la matriz para este estudio, donde se observan los valores codificados, así como los valores reales de cada experimento. Se añadieron dos centros a la matriz y fueron ejecutadas en orden aleatorio.

Tabla 13. Matriz del diseño tipo Doehlert para optimizar el método de derivatización de CEs.

Experimento	Valores codificados			Valores reales		
	X1	X2	X3	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Volumen de MSTFA (µL)
1	0	0	0	60	75	60
2	1	0	0	100	75	60
3	0,5	0,866	0	80	120	60
4	-0,5	0,866	0	40	120	60
5	-1	0	0	20	75	60
6	-0,5	-0,866	0	40	30	60
7	0,5	-0,866	0	80	30	60
8	-0,5	-0,289	-0,816	40	60	40
9	0	0,577	-0,816	60	105	40
10	0,5	-0,289	-0,816	80	60	40
11	-0,5	0,289	0,816	40	90	80
12	0	-0,577	0,816	60	45	80
13	0,5	0,289	0,816	80	90	80
14	0	0	0	60	75	60
15	0	0	0	60	75	60

La importancia del modelo general y de cada coeficiente de regresión se evaluó mediante análisis de varianza. La Tabla 14 muestra el poder de predicción del modelo basado en la importancia de los modelos de regresión (p -value, regresión/error residual), carencia de ajuste (p -value, carencia de ajuste/error puro) y el coeficiente de determinación ajustado (R^2). El p -value para regresión/error

residual $<0,05$ para todos los compuestos demuestra la viabilidad del modelo. Por otro lado, valores $>0,05$ en la carencia de ajuste/error puro indican la idoneidad de los modelos cuadráticos debido a la variación del error analítico [107]. Finalmente, el R^2 ajustado se refiere al ajuste del modelo con respecto a una ecuación polinomial, en este caso, los antiinflamatorios tienen un mayor ajuste (mayor del 70%), mientras que los demás compuestos tienen valores entre 33 y 55%, sin embargo, estos resultados se consideran aceptables considerando el gran número de analitos bajo estudio con propiedades tan bien diferenciadas.

Tabla 14. Análisis de varianza para el modelo Doehlert de tercer orden para la derivatización de CEs

Compuesto	ρ -Value REG/RE	ρ -Value LOF/PE	R^2 ajustado (%)
Metil parabeno	0,01	0,07	74,12
Etil parabeno	$< 0,01$	0,06	85,21
Propil parabeno	0,02	0,05	37,63
Butil parabeno	0,01	0,06	52,19
Estrona	0,02	0,25	55,06
Estradiol	0,03	0,08	45,55
Estriol	0,04	0,32	33,14
Etinilestradiol	0,04	0,60	39,75
Ibuprofeno	0,02	0,06	34,79
Naproxeno	$< 0,01$	0,40	80,72
Ácido Mefenámico	0,04	0,23	72,95
Diclofenaco	0,01	0,36	74,59
Ketoprofeno	$< 0,01$	0,69	85,68
Ácido Acetilsalicílico	$< 0,01$	0,76	78,70
Triclosán	$< 0,01$	0,67	77,68
BPA	0,01	0,69	74,70

REG: regression, RE: residual error, LOF: lack of fit, PE: pure error.

Después de la evaluación de las superficies de respuesta para cada analito, se empleó la optimización de superficie de respuesta multicriterio basada en la función de deseabilidad de Derringer. La función deseabilidad de cada analito se combinaron usando la media geométrica (dando la misma importancia para cada

uno de ellos), para obtener la deseabilidad general D. La deseabilidad general para todos los analitos fue 0.93415. La figura 20 muestra la superficie respuesta global (volumen de MSTFA vs. tiempo de reacción) en el punto más alto de temperatura (condición óptima). Los valores óptimos extraídos de esta superficie de respuesta global fueron: 35 min, 80°C y 70 µL para tiempo, temperatura de reacción y volumen de MSTFA, respectivamente.

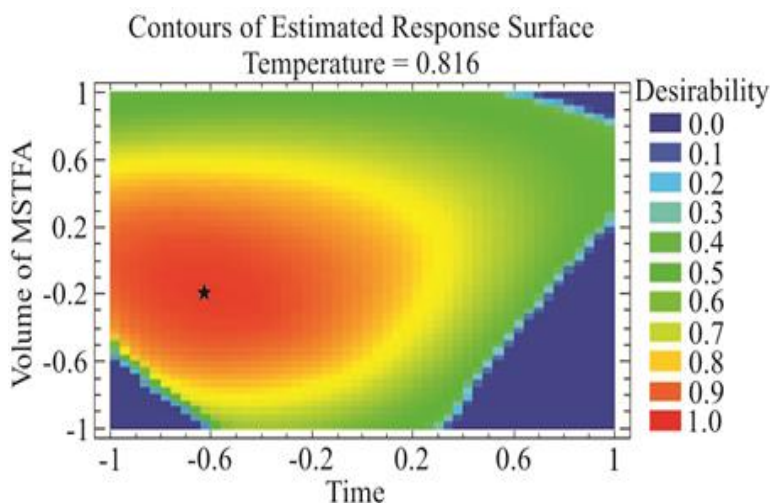


Figura 20. Gráfico de contorno de superficie de respuesta para la derivatización simultánea de contaminantes emergentes.

El método de derivatización optimizado fue lineal ($R^2 > 0.99$) en el rango de concentración de 0,1 - 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para todos los compuestos. Los resultados de repetibilidad ($n = 6$) de la derivatización muestran $\text{RSD} < 6\%$ para el total de los analitos, valores muy aceptables considerando que el paso previo a la derivatización es la extracción, el cual genera mayor imprecisión en la metodología (detallado en la sección de validación del método). La Figura 21 muestra los estudios de estabilidad, en los que se midió la misma muestra derivatizada en un período de 30 horas (0, 4, 8, 16, 24 y 30 horas). Para algunos compuestos como el ácido acetilsalicílico, el bisfenol A y la familia parabenos (metilo, etilo, propilo y butilo) se observa una disminución del 30% en su área cromatográfica después de 8 horas. Este resultado es información valiosa para asegurar la calidad de los resultados cuando la metodología se aplica a un alto número de muestras. En vista de ello,

todas las muestras sometidas a la metodología se derivatizaron y se midieron por GC-MS en un período no mayor a 4 horas.

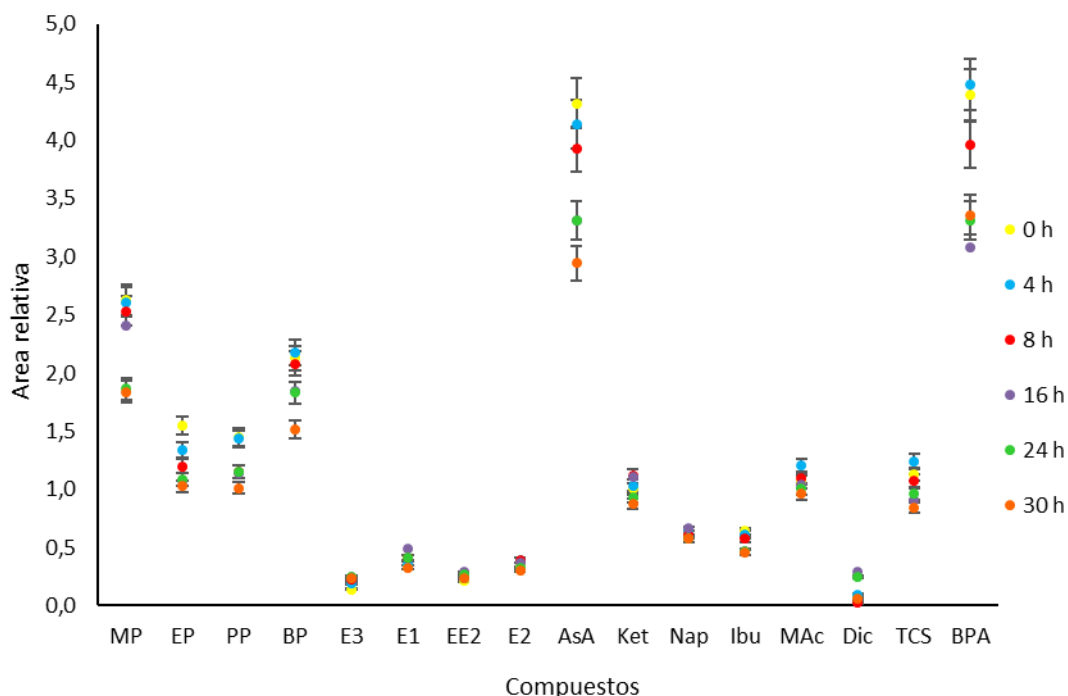


Figura 21. Respuesta cromatográfica relativa de los analitos obtenidos después de la inyección del producto de derivatización en diferentes tiempos (de 0 a 30 h).

5.1.2.3 Estudio de la extracción simultánea multiclase de contaminantes emergentes mediante RDSE en matrices acuosas

Debido al número de analitos en este trabajo y que previamente no habían sido estudiados simultáneamente por la estrategia analítica RDSE, se estudiaron variables clave para la extracción como la fase sorbente y el tiempo de extracción. Otros, como la velocidad de extracción y el volumen de muestra, fueron tomados de trabajos previos [86],[89],[108], considerando que la premisa que a mayor velocidad de extracción (> 2000 rpm) se favorece la transferencia de masa de la solución a la fase sorbente. Con volúmenes intermedios de muestras (20 a 30 mL), se necesitan tiempos de extracción más bajos y, al mismo tiempo, se alcanzan grandes factores de preconcentración, en este caso 167 veces. Las variables se estudiaron en agua desionizada y muestras reales dopadas con concentraciones conocidas de los analitos.

Estudio de fase sorbente

Considerando la variedad de analitos en estudio, se realizó un estudio de diferentes fases de sorbente como Oasis® HLB, estireno-divinilbenceno (St-DVB) y C18. Se utilizó un tiempo de extracción de 60 min para el estudio comparativo. Como se puede ver en la Figura 22, Oasis® HLB mostró las mejores recuperaciones para todos los compuestos, y esto se debe al hecho de que esta fase tiene un equilibrio hidrofílico-lipofílico, lo que la hace capaz de interactuar con las grupos polares y apolares de los diferentes analitos [108], produciendo una extracción más eficiente que aquellos obtenidos con C18 y St-DVB. A pesar de esto, St-DVB podría ser considerada como una fase alternativa donde se obtienen áreas similares (menos para los compuestos polares como MP y AsA), por la buena afinidad de esta fase con compuestos semipolares y apolares a través de interacciones del tipo π - π . De todas maneras, Oasis® HLB fue seleccionada como fase sorbente para la extracción de los 16 contaminantes emergentes.

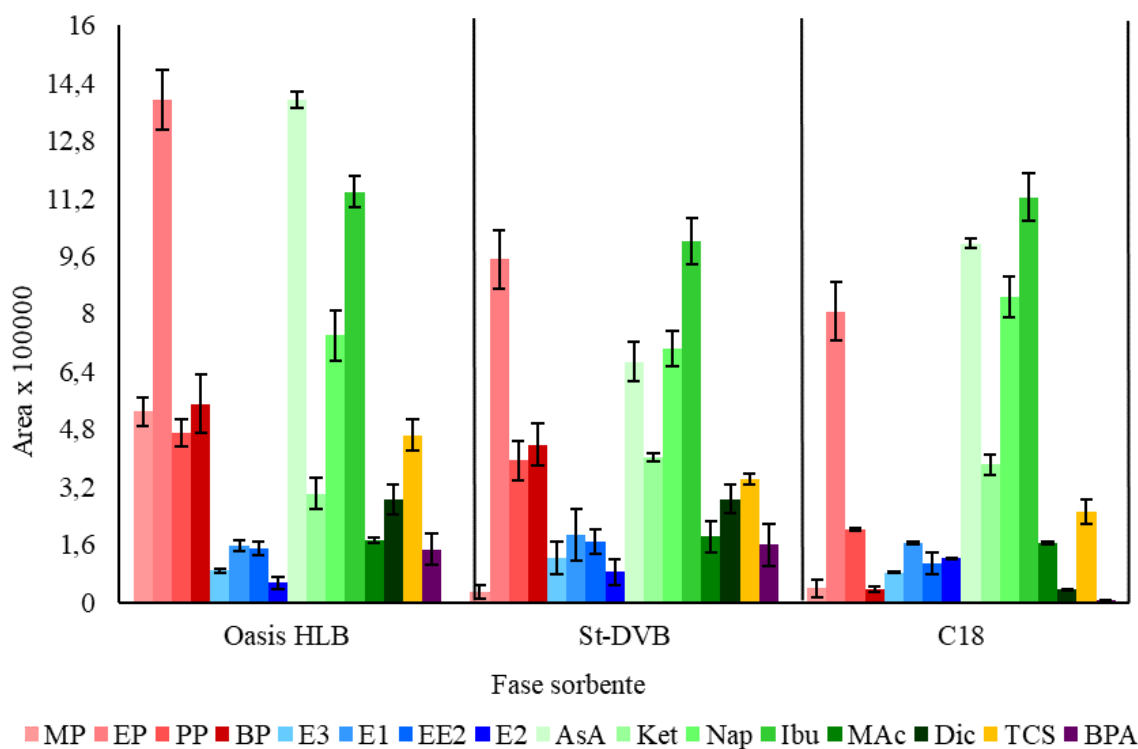


Figura 22. Estudio comparativo de fases sorbentes para la extracción de CEes aplicado a RDSE en muestras acuosas.

Estudio de tiempos de extracción

Se probaron tiempos de extracción entre 30 y 120 minutos usando la fase sorbente Oasis® HLB. La Figura 23 muestra los perfiles de extracción para algunos compuestos que representan a cada familia en estudio, metil parabeno, estrona, ácido acetilsalicílico y bisfenol A, donde se muestra que a los 60 min se alcanza el equilibrio de extracción para todos los analitos. Este tiempo de extracción, es el mismo encontrado en trabajos previos con menor número de analitos. Por ende, se puede inferir que el tiempo de extracción no es una variable que dependa directamente del número de compuestos extraídos. Por lo tanto, se seleccionó 60 minutos como tiempo de extracción en la metodología.

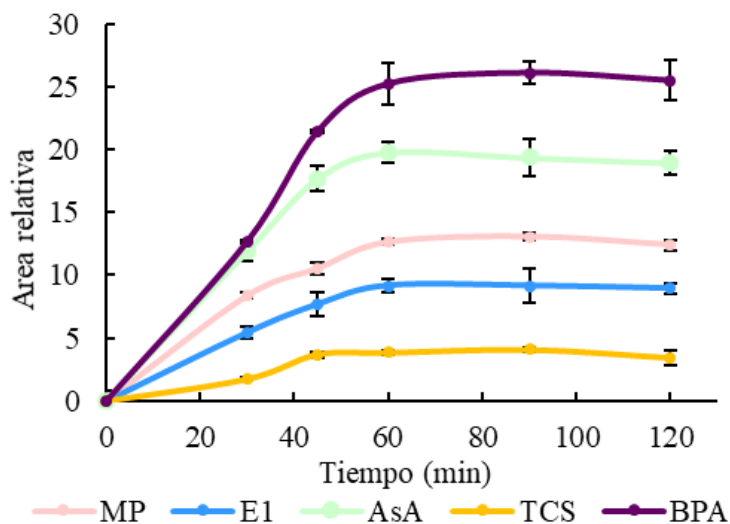


Figura 23. Perfiles de extracción para MP, E1, AAS, TCS y BPA en RDSE de muestras acuosas

5.1.2.4 Validación del método

Para garantizar la correcta cuantificación de los contaminantes emergentes en estudio, se evaluaron los parámetros de calidad de la metodología analítica propuesta: sensibilidad (curva de calibrado), linealidad (R^2), precisión (%RSD) límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ), recuperación (%Re) y efecto matriz (%EM), los cuales se resumen en la tabla 15. Los análisis por GC-MS se realizaron en modo SIM para mejorar la sensibilidad y selectividad de la determinación.

La precisión intradiaria (n=6) e interdiaria (n=3) expresada como desviación estándar relativa (%RSD) fue medida a una concentración de 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito en agua, encontrando valores menores a 13 y 20%, respectivamente. Los LOD y LOQ encontrados para el método tienen valores que varían de 0,02 a 0,15 y de 0,06 a 0,44 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, los cuales fueron calculados considerando los factores de enriquecimientos implícitos en la RDSE. Se encontraron buenas recuperaciones (> 74%) para la mayoría de los analitos en estudio, particularmente para la familia de parabenos (MP, EP, PP, BP), hormonas menos polares (E1, E2 y EE2), algunos antiinflamatorios (Ibu y Ket) y el BFA. Se obtuvieron bajas recuperaciones para compuestos tales como AsA, E3, Nap, AcM, Dic y TCS (11-44%). Es importante señalar que la RDSE es una tecnología de extracción basada en el equilibrio de partición (no exhaustiva), de manera similar a otros como SPME y SBSE, esto significa que después del equilibrio de extracción parte de los analitos pueden permanecer en la muestra de agua. Teniendo esto en cuenta, las recuperaciones absolutas inferiores al 50% son comunes en este tipo de técnicas, para ello se usa lo que se conoce como curva de calibrado en matrix (matrix-matched calibration) para la correcta cuantificación de los analitos.

En este contexto, para compensar el efecto de la matriz, las curvas de calibrado se obtuvieron dopando muestras de aguas a seis niveles de concentración (entre 0,1-20 $\mu\text{g L}^{-1}$, estas concentraciones no consideran el factor de concentración). El efecto matriz (%ME) fue calculado en aguas de ríos, valores cercanos al 100% indican un efecto de matriz bajo, mientras que cercanos a 0% reflejan un efecto de matriz alto. Para la mayoría de los compuestos se encontró bajo efecto matriz, excepto para Dic (33%), Ket (38%), EE2 (45%) y E2 (48%).

5.1.2.5 Análisis de muestras reales

Se seleccionaron diferentes aguas del sector de San Antonio, Chile: potable, pozo, y río para evaluar la aplicabilidad de la metodología (Figura 24). Además, el afluente e influente estudiados provienen de plantas de tratamiento de aguas de la ciudad de Santiago.

Tabla 15. Cifras de mérito de la metodología analítica para la determinación simultánea de CEs

Analitos	Sensibilidad (L µg ⁻¹)	Linealidad (R ²)	LOD (µg L ⁻¹)	LOQ (µg L ⁻¹)	%Re	% RSD (n=6) y (n=3)		%EM	%EF
						Intradiario	Interdiario		
MP	11039	0,9904	0,08	0,23	75	10	13	90	125
EP	5697,3	0,9960	0,07	0,20	74	11	12	83	124
PP	5450,7	0,9943	0,11	0,33	81	11	12	77	135
BP	9915,2	0,9949	0,04	0,11	97	12	16	74	162
E3	452,64	0,9968	0,07	0,21	38	9	16	51	63
E1	4642,4	0,9982	0,04	0,11	75	10	14	65	125
EE2	3066,7	0,9935	0,07	0,21	79	6	16	45	132
E2	4068,7	0,9929	0,04	0,11	80	13	15	48	134
AsA	17547	0,9994	0,03	0,10	11	7	16	61	18
Ket	340,95	0,9911	0,15	0,44	82	8	17	38	137
Nap	3150,1	0,9996	0,07	0,20	31	11	15	58	52
Ibu	2499,4	0,9966	0,03	0,08	75	10	15	74	125
MeA	1312,7	0,9965	0,09	0,27	30	11	14	74	50
Dic	1413,9	0,9898	0,04	0,12	33	11	20	33	55
TCS	4757,9	0,9971	0,07	0,21	44	10	16	54	73
BPA	6118,6	0,9989	0,02	0,06	94	10	18	61	157

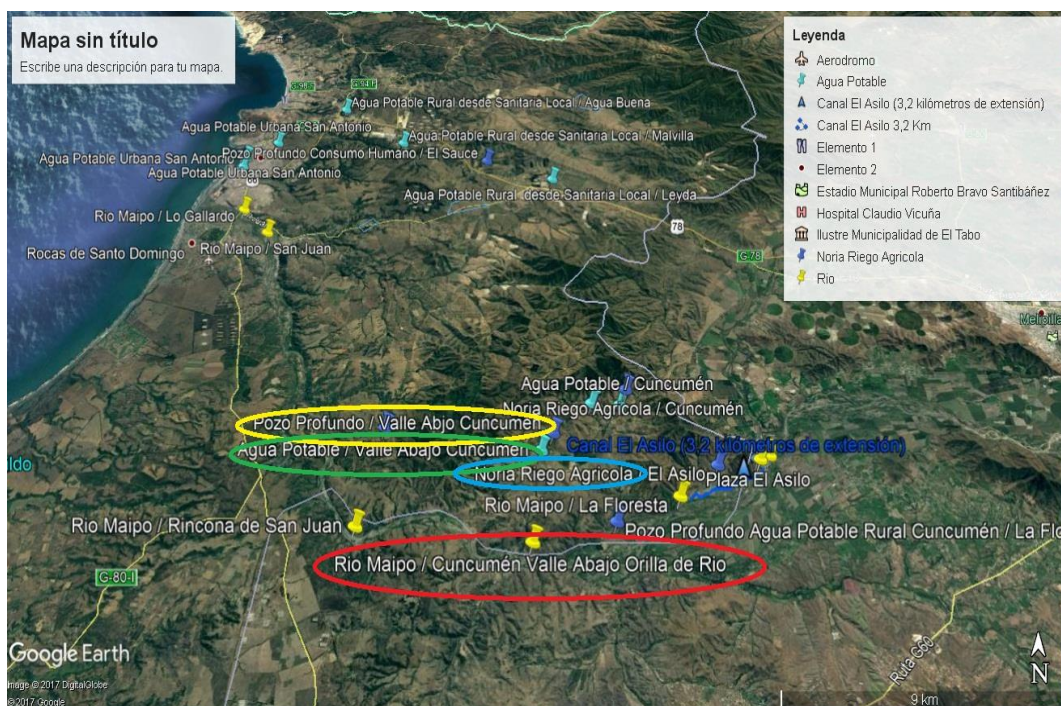


Figura 24. Mapa de la zona de procedencia de las muestras de aguas naturales

En la Tabla 16 se resumen las concentraciones encontradas en las aguas estudiadas. En el agua potable, ninguno de los analitos en estudio fue detectado. En el pozo 1, se detectó la presencia de EP y AsA, pero las concentraciones fueron no cuantificables (<LOQ). En el pozo 2 y en las aguas del río, fue posible cuantificar estos dos analitos, con concentraciones no superiores a 0,38 y 0,28 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Esta es la primera vez que las concentraciones de estos compuestos han sido reportadas en estas matrices específicamente. En las muestras de efluentes y afluentes, se cuantificaron los mismos analitos, además de triclosán y naproxeno en ambos tipos de aguas, e ibuprofeno se cuantificó solo en el afluente. En estas aguas las concentraciones máximas de CEs encontradas fueron 3.1 y 4.2 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

Se han encontrado concentraciones similares de AsA, Nap, Ibu y TCS en países de América del Norte, Europa y África [109]–[112]. Se debería destacar según estos resultados, que las concentraciones de CEs encontradas en aguas naturales en la región de San Antonio son más bajas que las concentraciones encontradas en el efluente de aguas residuales de la ciudad de Santiago, quizás debido a los efectos de dilución y degradación de la compuestos o absorción en sedimentos, lodos, plantas, peces u otros organismos vivos durante su transporte natural.

Tabla 16. Concentraciones de analitos encontrados en diferentes muestras de aguas en $\mu\text{g L}^{-1}$.

Ces	Potable	Noria	Pozo	Río	Efluente	Afluente
EP	nd	< LOQ	0,24 ± 0,05	0,38 ± 0,03	0,43 ± 0,03	0,62 ± 0,03
PP	nd	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOQ	< LOQ
AsA	nd	< LOQ	0,15 ± 0,05	0,28 ± 0,04	3,1 ± 1,1	3,4 ± 0,9
Nap	nd	< LOD	< LOQ	< LOQ	0,5 ± 0,2	4,16 ± 0,07
Ibu	nd	nd	nd	nd	nd	1,13 ± 0,09
TCS	nd	nd	nd	nd	0,9 ± 0,2	1,02 ± 0,04

nd: no detectado

< LOD: menor al límite de detección

< LOQ: menor al límite de cuantificación

Se hizo un cuadro comparativo con otras metodologías ya reportadas. Para más detalle consultar la publicación resultante de este objetivo [92].

5.1.3 Conclusión

Se ha propuesto un método eficiente para la determinación multiclase de CE's en muestras de agua utilizando la estrategia analítica optimizada de derivatización-RDSE-GC/MS. Este estudio confirmó que la fase sorbente Oasis® HLB, normalmente usado en extracción en fase sólida, también puede ser utilizada en RDSE con un buen rendimiento de extracción para los compuestos de diferentes polaridades. En general, los compuestos con bajas polaridades y solubilidades en agua presentan mayores porcentajes de recuperación debido a su buena afinidad por la fase sorbente. La metodología optimizada de derivatización con MSTFA mostró mejoras claras con respecto a otras alternativas desde la perspectiva de costo, tiempo y ecoeficiencia [92].

La aplicación del método propuesto nos permitió informar, por primera vez, la presencia de algunos de estos compuestos ($<0,38 \mu\text{g L}^{-1}$) en aguas de pozos y ríos chilenos, lo que nos lleva a considerar los riesgos potenciales del consumo de estas aguas, sabiendo que compuestos como los parabenos han sido categorizados como compuestos disruptores endocrinos. Estos resultados sugieren que se deben realizar más estudios detallados con un plan de muestreo en todo el río Maipo, en el cual se descargan los efluentes de las principales plantas de tratamiento de aguas residuales.

La publicación resultante de este objetivo se muestra al final del escrito.

5.2. Objetivo 2: Extracción por sorción en disco rotatorio (RDSE) para la determinación de hormonas sexuales y triclosán en muestras de orina mediante GC-MS. Pasos de clean-up integrados y derivatización optimizada.

5.2.1 Parte Experimental

5.2.1.1 Condiciones GC-MS

En la tabla 17, se resumen las condiciones cromatográficas, así como las del espectrómetro de masas optimizadas. En la tabla 18, se muestran los tiempos de retención a los que eluye cada analito, así como sus respectivos iones cuantificadores y calificadoros.

Tabla 17. Condiciones GC-MS para el método hormonas sexuales y TCS.

Cromatógrafo de Gases	Espectrómetro de Masas
Volumen de inyección: 2 μ L	Fuente: Ionización Electrónica (EI)
modo de inyección: Splitless	Analizador: Cuadrupolo Simple (ISQ)
Temperatura del inyector: 250°C	Temperatura línea de transferencia: 250°C
Rampas de calentamiento: C ₀ = 75°C x 1 min, C ₁ = 250 °C a 35 °C min ⁻¹ , C ₂ = 300 °C at 5 °C min ⁻¹ x 2min	Temperatura de la fuente: 200°C
Gas y Flujo: Helio (He) / 1 ml min ⁻¹	Dwell time: 0,1 s x cada m/z
Tiempo de análisis: 15 min	

Tabla 18. Tiempos de retención (min) e iones (m/z) para los analitos en estudio

Analito	Tiempo de retención (min)	Ión cuantificador (m/z)	Ión calificador (m/z)
TCS	7,94	345	347,360
TCS-D ₃	7,94	350	365
E2	11,66	416	285
Test	11,69	432	433
Test- ¹³ C ₃	11,69	435	436
Prog	13,52-13,64	458	443

5.2.1.2 Protocolo de Extracción

A 2 mL de muestra de orina se le añaden 18 mL de H₂O MilliQ (factor de dilución 10x) y se ajusta el pH a 6 con una solución tampón de acetato de sodio/ácido acético. El disco rotatorio que contenía 50 mg de la fase Oasis® HLB se colocó dentro del vial que contiene la muestra (previamente acondicionado según procedimiento en 5.1.1.3), y se hizo rotar a 2000 rpm durante 60 minutos a temperatura ambiente. Después de la extracción, el disco es sometido a una etapa de limpieza con una solución de MeOH al 10% y se agita durante 5 min a 2000 rpm. Finalmente, se hace la desorción de los compuestos con 10 mL de AcOEt durante 20 min a 2000rpm. Este extracto se evapora a sequedad bajo una corriente de N₂, se derivatiza mediante el método de derivatización previamente optimizado y se analiza mediante GC-MS en modo SIM. Las condiciones de fase sorbente, pH, dilución de muestra de orina, limpieza con MeOH, variables hidrodinámicas y solvente de desorción fueron estudiadas a través de ensayos univariados.

5.2.1.3 Protocolo de Derivatización

Se añaden 100 µL del multiestándar o extracto de muestra (después de RDSE) a un vial de 2 mL y se evapora bajo una corriente de N₂. Se añaden 50 µL de la mezcla de derivatización MSTFA/DTE/TMIS (1000/5/2, v/p/v) y 50 µL de AcOEt y se agita en un vórtex por 5 min para completar la reacción. El extracto derivatizado se traspasa a un vial con inserto y se analiza por GC-MS. Inicialmente se hizo un estudio tipo screening para evaluar la significancia de los parámetros, luego se estudiaron diferentes solventes orgánicos como parte de la reacción de derivatización para reducir el gasto volumen de la mezcla de derivatización, y finalmente, se evaluó la relación de volumen de solvente seleccionado y mezcla de derivatización para encontrar la condición óptima de trabajo.

5.2.1.4 Validación del método

Igual al empleado en el punto 5.1.1.4

5.2.1.5 Aplicación de la metodología a muestras reales de orina. Estudio de hidrólisis enzimática.

Se recogieron muestras de orina en envases estériles y se almacenaron a -20 °C. Las muestras se diferenciaron según sexo, edad y una mujer embarazada (5 meses) y se recolectaron de la primera orina del día. Antes del análisis, las muestras de orina se centrifuga a 3500 rpm durante 10 minutos, de esta manera se decantan todos los cristales y sólidos presentes. Las muestras se analizaron por triplicado.

Las mismas muestras reales también fueron analizadas considerando un paso previo de la hidrólisis enzimática descrita por otros autores [113]. A los 2 mL de muestra de orina en el vial de extracción, se le agregan 2 mL de tampón de acetato de sodio/ácido acético a 1 mol L⁻¹ ajustado a pH 5.2. La solución se homogeniza en vórtex durante 10 segundos y luego se añaden 20 µL (2000 U) de la enzima β-glucuronidasa y se homogenizan manualmente durante unos segundos y se dejan en una incubadora a 37°C durante 24 horas. Después de este tiempo, se aplicó la metodología RDSE optimizada. Las muestras reales se cuantificaron utilizando orina de niño (5 años) mediante curva de calibración en matriz para ambos casos. Se estudiaron en total la orina de 5 voluntarios sano, fueron previamente informados acerca del procedimiento y la naturaleza del estudio analítico. Todos los individuos firmaron un formulario de consentimiento antes de realizar cualquier acción.

5.2.2 Resultados y Discusión

5.2.2.1 Ensayos preliminares de derivatización de hormonas sexuales y TCS en orina.

Considerando el trabajo previo de multideterminación de contaminantes emergentes, se planteó inicialmente la misma metodología para derivatizar un multiestándar (250 µg L⁻¹) de E2, Test, Prog y TCS, esto es 70µL de MSTFA + 50µL de piridina por 35 min a 80°C. Se encontraron resultados interesantes que se resumen a continuación:

- (a) E2 y TCS se derivatizan de manera exitosa bajo estas condiciones, esto es concordante con lo encontrado previamente.

(b) Luego de la derivatización de Test y Prog, se observaron varias señales cromatográficas para cada compuesto, esto indica distintos productos de reacción en distintos grupos de las moléculas. La principal desventaja de este hecho es la disminución en la sensibilidad en la detección, sin contar que existe una alta dispersión en las proporciones de los productos para distintas réplicas, por ende, se hizo necesario proceder con alguna técnica de derivatización alternativa.

5.2.2.2 Estudio de la reacción de derivatización de hormonas sexuales y TCS usando la mezcla MSTFA/DTE/TMIS.

Luego de una exhaustiva revisión bibliográfica, se encontró que las hormonas sexuales suelen determinarse por familias, es decir, estrógenos, andrógenos y progestágenos por separado. Esto se debe a que los estrógenos (como la hormona E2) sufren fácilmente reacciones de derivatización de los grupos hidroxilos ($-OH$), mientras que los progestágenos y andrógenos suelen derivatizarse fácilmente a en el grupo cetona ($C=O$). Son pocos los trabajos reportados donde determinen simultáneamente distintos tipos de hormonas sexuales, a través de un mismo protocolo de derivatización.

Se ha reportado que, para poder realizar esta determinación simultánea de compuestos, es necesaria una modificación previa de los grupos derivatizables, es decir, o se convierten los grupos hidroxilos a grupos cetona a través de una oxidación, o por el contrario se hace una reducción de los grupos cetona a hidroxilo, para luego derivatizarlos con un mismo reactivo. Según un estudio de disponibilidad de reactivos, costos, tiempo y factibilidad de trabajo, se propuso seguir la vía de reducción de cetonas hasta grupos hidroxilos para luego derivatizar con MSTFA.

Uno de los reactivos ampliamente conocidos como agente reductor es el Dithioerythritol (DTE). Este es un azúcar derivado del monosacárido eritrosa de 4 carbonos, de fórmula molecular $C_4H_{10}O_2S_2$. Además, para completar la reacción de derivatización no basta con la reducción de los grupos cetonas, sino también es necesario el uso de un catalizador para promover la silylación con MSTFA. En este

caso, y de acuerdo a la compatibilidad de los reactivos, se usa el trimetildosilano (TMIS) como catalizador.

Existen algunos trabajos donde se ha usado la mezcla MSTFA/DTE/TMIS (v/p/v) como agente derivatizante para hormonas sexuales en solventes, aguas y suero bovino (ver Tabla 6), pero no se había utilizado en orina previamente. En ellos se optimizaron las cantidades de los reactivos, encontrando para cada reactivo 1000 μL , 5 mg y 2 μL , respectivamente [65]. En vista de que las cantidades optimizadas son mínimamente aceptables, se decidió utilizar esta condición experimental para las subsiguientes optimizaciones.

El primer paso consistió en probar esta mezcla de reacción con cada analito individualmente. Este ensayo se hizo a temperatura ambiente y agitación asistida por vórtex por 1 min. En primera instancia se inyectaron en modo Full Scan para identificar el patrón de fragmentación de cada analito derivatizado (Figura 25). Los resultados encontrados se resumen a continuación:

- (a) E2 y TCS eluyen como una única señal, exactamente igual a lo encontrado en la derivatización con MSTFA/pyr. Esto es concordante con el hecho que ninguno de estos compuestos sufre algún cambio con el nuevo procedimiento de derivatización.
- (b) Test eluye como un único compuesto, muy cercano a la E2 derivatizada. Esto indica que efectivamente la reacción de derivatización tuvo éxito obteniendo un sólo producto en 100%.
- (c) Prog eluye en dos señales cromatográficas muy cercanas (isómeros que se forman luego de la reducción). Al repetir el experimento varias veces, la proporción de los productos fue exactamente igual en todos los casos, lo que indica que es posible cuantificar el analito mediante la sumatoria de todas las áreas. Esto es concordante con lo encontrado en trabajos previos.

En base a estos resultados esperados, se decidió hacer un estudio a profundidad de las variables involucradas en la derivatización, en primer lugar, de tipo screening, para después hacer estudios de optimización.

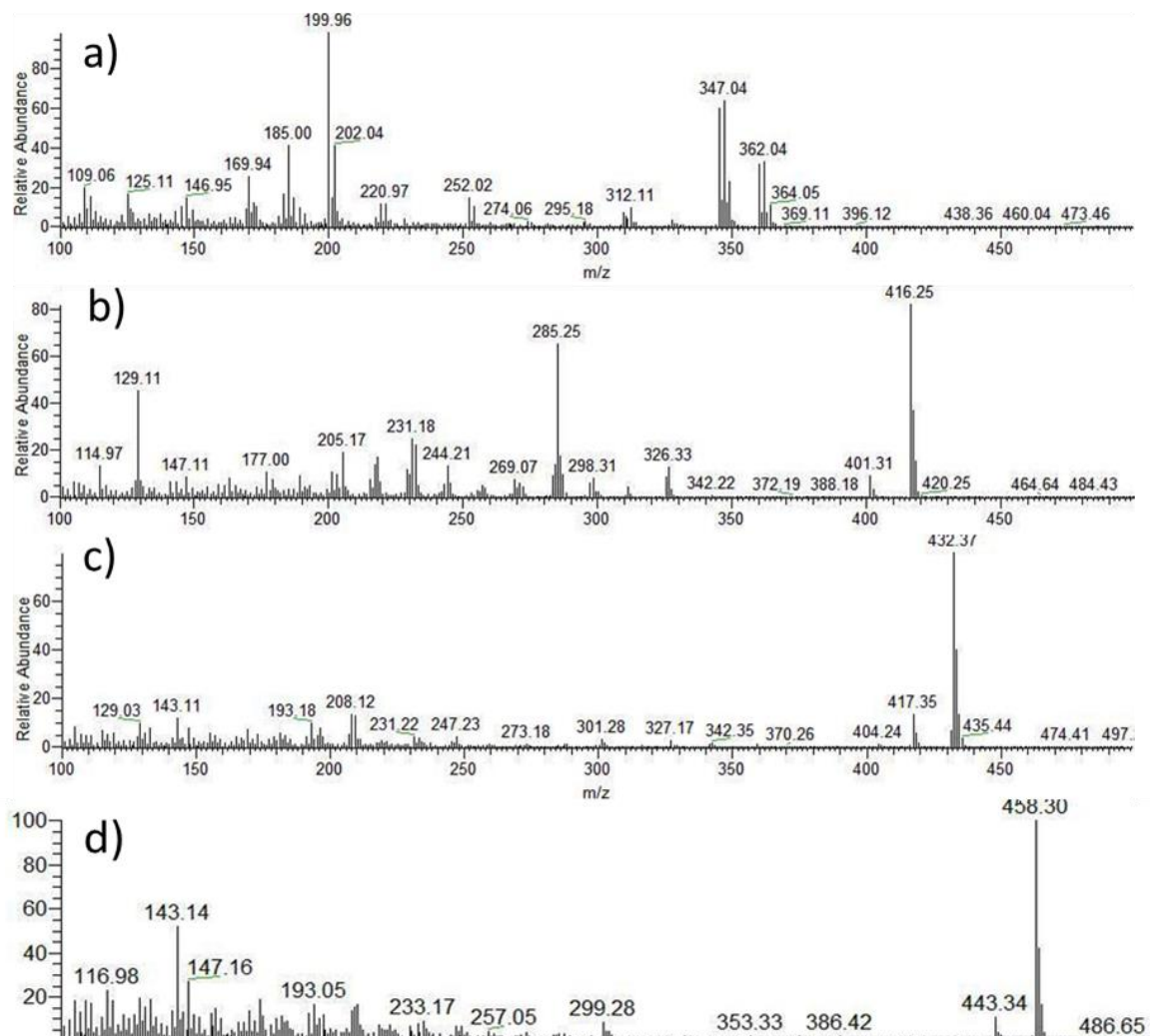


Figura 25. Espectros de masas por impacto electrónico de a) TCS b) E2 c) Test y d) Prog

Estudio tipo Screening

Se ha encontrado en la revisión bibliográfica que las reacciones de sililación de estrógenos se realizan a temperaturas por encima de los 70°C por al menos 30 min. Por ello se decidió evaluar la significancia de las condiciones experimentales involucradas, es decir, volumen de agente derivatizante (K1), temperatura (K2) y tiempo de reacción (K3), a través de un diseño experimental del tipo 2^K experimentos, donde K es el número de factores en estudio. En este caso, para $K=3$, un total de 8 experimentos más 2 centros fueron ejecutados. En la tabla 19 se resumen los valores codificados y reales de los experimentos.

Tabla 19. Matriz screening para el estudio de derivatización con MSTFA/DTE/TMIS

Experimento	Valores codificados			Valores reales		
	A	B	C	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Volumen de MSTFA (μL)*
1	-1	-1	-1	40	5	5
2	1	-1	-1	80	5	5
3	-1	1	-1	40	55	5
4	1	1	-1	80	55	5
5	-1	-1	1	40	5	100
6	1	-1	1	80	5	100
7	-1	1	1	40	55	100
8	1	1	1	80	55	100
9	0	0	0	60	30	52,5
10	0	0	0	60	30	52,5

*El volumen extra de agente derivatizante es completado con acetato de etilo, es decir, para los experimentos con 5μL de MSTFA/DTE/TMIS se completa hasta 100μL con el solvente mencionado.

La influencia de cada factor se determinó a partir de la estimación de la varianza experimental con una prueba t y se mostró en un gráfico de interacciones de factores en un intervalo de confianza del 95%. Los resultados representados en los diagramas de pareto de la figura 26 muestran que para el total de analitos la temperatura y el tiempo de reacción no son factores significativos en la sililación. El volumen del agente derivatizante fue significativo para todos los compuestos. En función a este resultado, se decidió hacer estudios univariados de variables relacionadas al volumen de derivatizante, esto es, el solvente con el cuál se completa el volumen mínimo necesario para la inyección (100μL) y la relación existente entre la mezcla de derivatización y éste solvente para obtener la mejor respuesta cromatográfica.

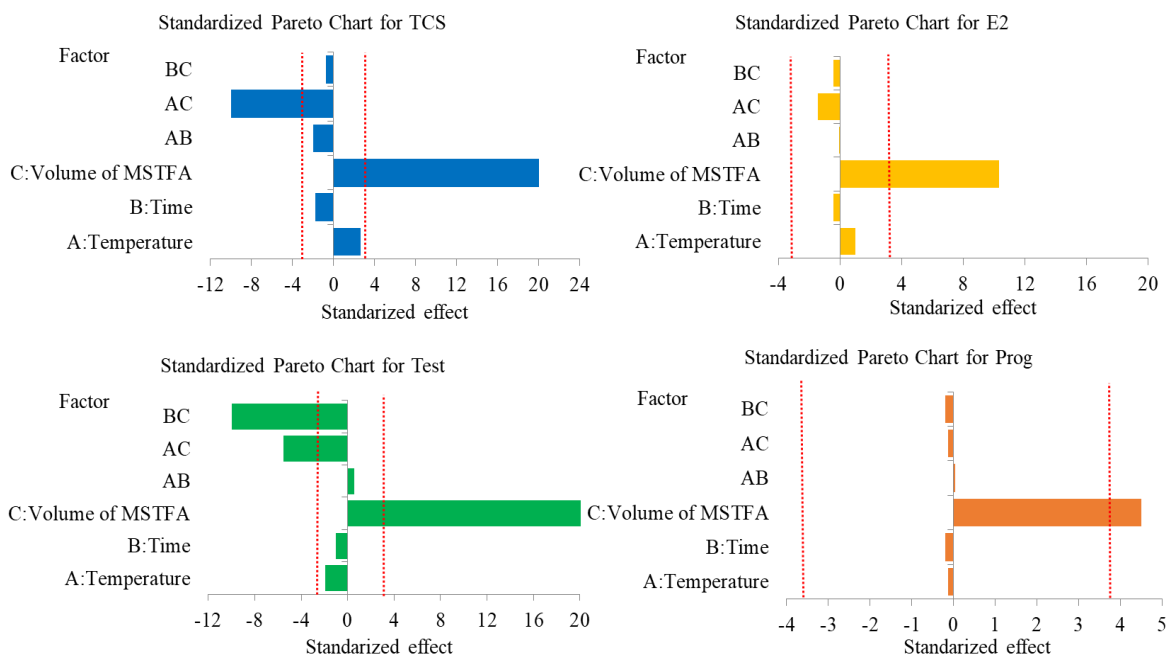


Figura 26. Gráfico de Pareto de los efectos principales e interacciones cruzadas. La línea punteada vertical indica el intervalo de confianza del 95% para TCS, T, P y E2.

Estudio Univariado de Volumen de Derivatizante MSTFA/DTE/TMIS

Teniendo en cuenta variables como costo y ecoeficiencia, el gasto excesivo de derivatizante es innecesario, por lo tanto, se decidió estudiar la disminución en el volumen de derivatización utilizando una mezcla con diferentes solventes orgánicos en diferentes proporciones. La figura 27 muestra los resultados. Inicialmente, se tomaron 50 μL de la mezcla derivatizante y 50 μL de diferentes solventes orgánicos como DCM, AcOEt, MeOH y ACN. En general, se encontró que no había una diferencia significativa entre agregar el 100% de la mezcla de derivación o el 50% de solventes como AcOEt, ACN y DCM. MeOH tiene resultados indeseables porque reaccionan con la mezcla derivatizante. Considerando la buena compatibilidad entre los sistemas de GC y el AcOEt, se seleccionó para completar el volumen final del extracto antes de la inyección cromatográfica (el ACN se usa más comúnmente como disolvente en LC y DCM mostró mucha dispersión en los resultados). Por otro lado, las pruebas se llevaron a cabo en diferentes proporciones de la mezcla de derivatización y AcOEt, comenzando con 10:90 a 100: 0 (Véase en la parte superior de la Figura 26). 50 μL de la mezcla derivatizante y 50 μL de AcOEt

representan la mejor relación entre las respuestas cromatográficas más altas y el volumen más bajo de la mezcla derivatizante.

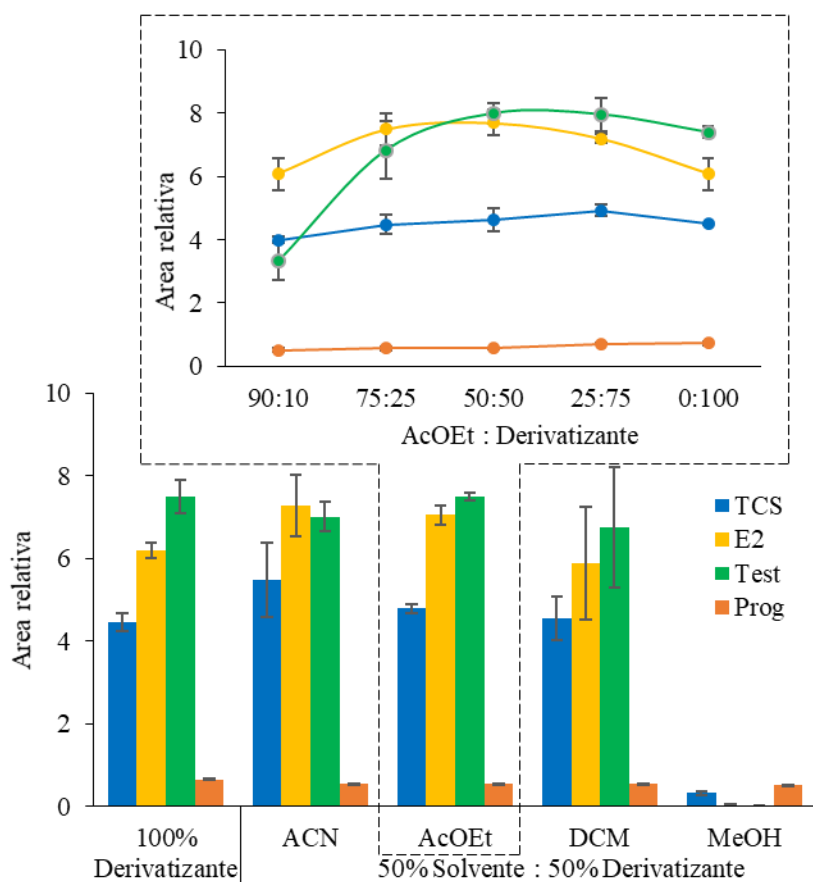


Figura 27. Efecto de la presencia y volumen de solvente orgánico en la derivatización de TCS, E2, Test y Prog con MSTFA/DTE/TMIS

En resumen, se seleccionaron 50 μL de MSTFA/DTE/TMIS y 50 μL de AcOEt a 25 $^{\circ}\text{C}$ durante 5 min en vórtex como condición de derivatización. La reacción de derivatización se evaluó en un rango entre 1-500 ng mL^{-1} obteniendo una relación lineal con $R^2 > 0.995$. El %RSD ($n = 6$) fue inferior al 5% para el total de analitos en estudio. Nuestro método propuesto representa una mejora significativa con otros trabajos en la literatura al reducir el consumo de la misma mezcla de derivatización utilizada en un 50% [60], [65], y en el tiempo y la temperatura donde otros autores usan 60 min y 60 $^{\circ}\text{C}$ [59].

5.2.2.3 Separación e identificación de TCS, E2, Test y Prog mediante GC-MS

El análisis cromatográfico muestra una separación en solo 15 minutos de los analitos en estudio. La Figura 28 muestra el cromatograma de elución de los compuestos que atribuyen los siguientes productos en orden de elución: TCS-mono-TMS, E2-di-TMS, Test-di-TMS y Prog-di-TMS. Las especies de O-TMS en la figura resaltada en rojo provienen de un grupo hidroxilo, mientras que las marcadas en azul originalmente del grupo cetona. Del mismo modo, debido a los posibles dobles enlaces que se forman después de la enolización del grupo cetona en la Prog, se forman posibles isómeros realizando derivatización con MSTFA como se ha observado previamente [65]. Dado que no es posible favorecer un isómero con respecto a otro, bajo el mismo protocolo de derivación se logra la misma relación de los compuestos derivatizados (entre 1-500 ng mL⁻¹), por lo tanto, para la cuantificación se consideró la suma de las áreas de todos los compuestos. Los estándares *surrogates* TCS-D₃ y Test-¹³C₃ eluyen los mismos tiempos de retención que sus pares, TCS y Test.

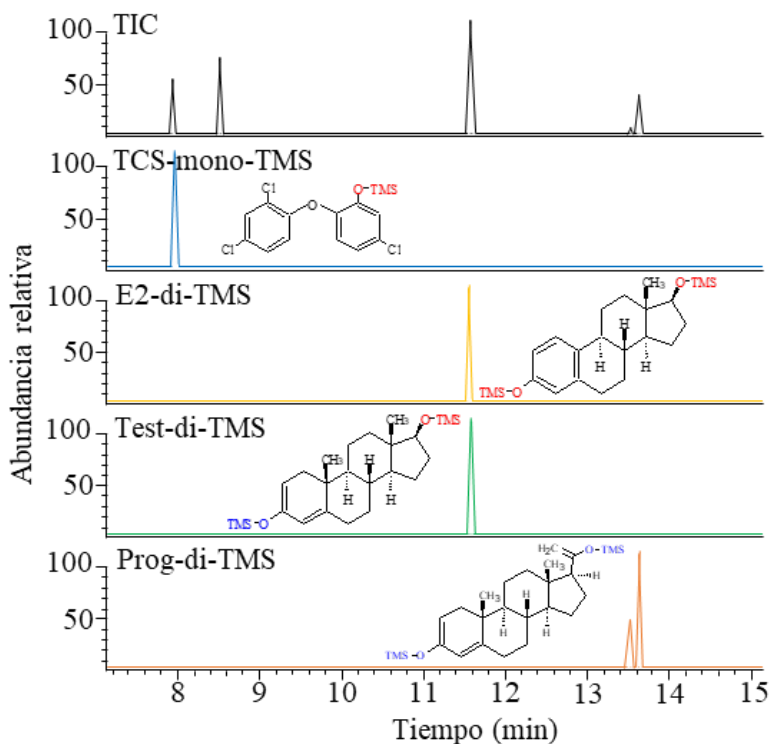


Figura 28. Cromatogramas de elución por GC-MS: a) TIC b) Triclosán (m/z: 345) c) Estradiol (m/z: 416) d) Testosterona (m/z: 432) y e) Progesterona (m/z: 458)

5.2.2.4 Estudio RDSE de hormonas sexuales y triclosán en muestras de orina

Existen muy pocos trabajos reportados en los cuales se haya usado la técnica RDSE para la extracción de compuestos en matrices biológicas [85],[94], [95], siendo esta investigación la primera vez que se utiliza para determinar hormonas sexuales y triclosán en orina. Entre las principales limitaciones que tiene el análisis de muestras biológicas se puede mencionar la complejidad de la matriz, la disponibilidad de altas cantidades para la optimización de la metodología y, por lo general, requieren pretratamiento, lo que implica aumento de costos y tiempos.

Una de las matrices de interés para esta investigación es la orina. La orina puede servir para determinar la presencia de algunas enfermedades y entre sus principales funciones se puede mencionar:

- ❖ Eliminación de sustancias tóxicas producidas por el metabolismo celular como la urea.
- ❖ Eliminación de sustancias tóxicas como la ingesta de drogas y alcohol.
- ❖ Control electrolítico, al regular la excreción sobre todo de Na y K.
- ❖ Control de la presión arterial, a través de la regulación hídrica.
- ❖ Control del equilibrio ácido-base del organismo.

La orina normal contiene un 95% de agua, un 2% de sales minerales y 3% de urea y ácido úrico, y aproximadamente 20 g de urea por litro. Cerca de la mitad de los sólidos son urea, el principal producto de degradación del metabolismo de las proteínas. El resto incluye nitrógeno, cloruros, cetoesteroides, fósforo, amonio, creatinina y ácido úrico.

La principal ventaja que ofrece el estudio de biomarcadores en orina es que la recolección de la muestra no representa un método invasivo y, además se puede obtener fácilmente en grandes cantidades, en contraposición a lo que ocurre con otros fluidos como plasma y saliva.

Estudio de Fase Sorbente y pH

La técnica RDSE se considera una técnica versátil si se considera la gran variedad de analitos que han sido estudiados (parabenos, ftalatos, surfactantes, antiinflamatorios no esteroideos, estrógenos, antibactericidas, antibióticos, pesticidas, colorantes, metales, entre muchos otros), esto debido a sus posibles configuraciones que permiten la colocación de fases sorbentes con diferentes polaridades. Recientemente, ha surgido la fase sorbente Oasis® HLB PRiME dentro de los cartuchos SPE, que según el fabricante tiene la ventaja de la ausencia de etapas de acondicionamiento, así como la mejora de las extracciones a través de la disminución del efecto de matriz. En base a esto, se compararon las fases sorbentes Oasis® HLB y HLB PRiME para la extracción de E2, Test, Prog y TCS en muestras de orina, considerando también la presencia y ausencia de etapas de acondicionamiento. Los resultados se muestran en la figura 29.

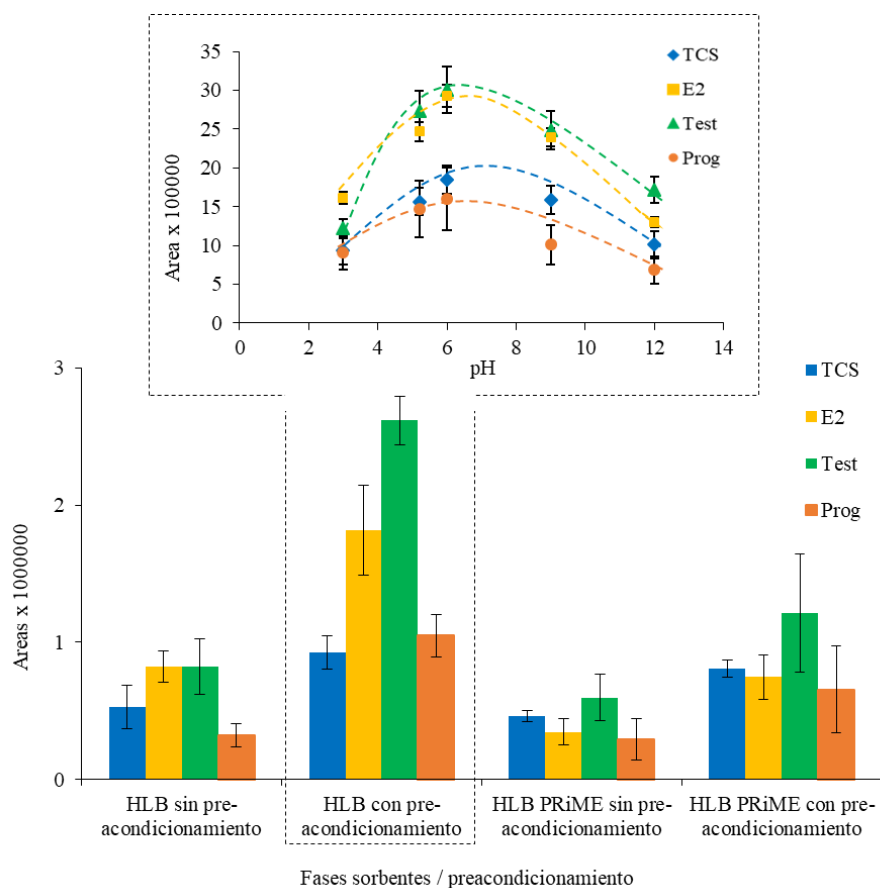


Figura 29. Estudio de fase sorbente y efecto pH de la extracción de E2, TCS, Test, Prog desde orina mediante RDSE

A pesar de lo esperado, la fase Oasis® HLB presentó mejores resultados para el conjunto de analitos e independientemente de la fase sorbente utilizada, es necesaria la etapa de acondicionamiento. Además, se hizo un estudio de pH (para esta fase) encontrando que en el rango de pH de 5 a 8, se encontraron las mejores respuestas de los analitos (parte superior Figura 29). De esta manera se seleccionó la fase sorbente Oasis® HLB y el pH ajustado a 6 con buffer fosfato para la extracción de hormonas sexuales y TCS en orina mediante RDSE.

Dilución de muestra de orina

Este método de extracción se ha utilizado principalmente en muestras de agua, sin embargo, las matrices más complejas, como la orina, requieren un estudio detallado de todas las condiciones experimentales. En base a eso, fue necesario un estudio completo de todos los pasos de preparación de muestras, extracción, limpieza y desorción. Primero, en términos de preparación de la muestra, varios autores han sugerido diluir la muestra de orina en al menos 20 veces para mejorar el rendimiento en diferentes técnicas de extracción [95],[114],[115]. Por ello, se estudiaron diferentes diluciones comenzando con una muestra sin diluir hasta 20 veces diluida. Los resultados se muestran en la Figura 30, se observa un efecto positivo en las respuestas de los compuestos con una dilución creciente de la muestra de orina. El efecto ya no es significativo cuando se aumenta de 10 a 20 veces la dilución. La dilución 10x se consideró para favorecer un factor de preconcentración más alto.

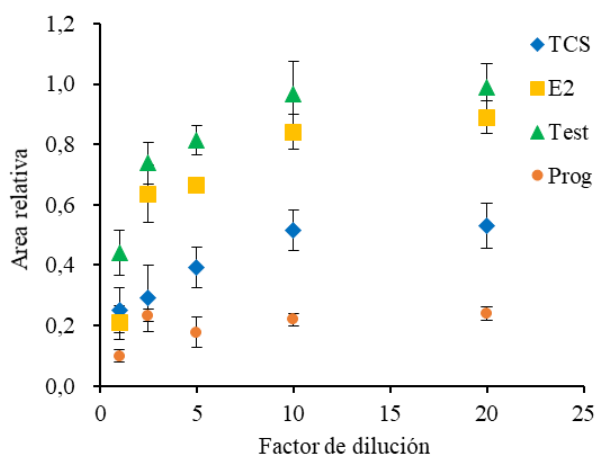


Figura 30. Efecto sobre la respuesta relativa de los analitos por dilución inicial de la muestra orina.

Etapa de limpieza o clean-up

A pesar de considerar la dilución de la muestra de orina, se seguían encontrando bajas recuperaciones y alto efecto matriz (aprox. 20% y 70%, respectivamente), principalmente debido a las interferencias de color amarillo intensa persistente en el extracto final. En consecuencia, se evaluó la aplicación de una etapa de limpieza *post*-extracción para eliminar la interferencia de los pigmentos presentes en la orina, como la urobilina, que la fase Oasis®HLB coextrae junto con los analitos en la RDSE. Urobilina muestra un comportamiento similar a los analitos en estudio; su masa molecular no excede los 600 g mol⁻¹, lo que le permite cruzar fácilmente la capa estancada de agua en RDSE, y su alta polaridad (log K_{o/w} 1,36) permite una fácil sorción sobre la parte hidrofílica de la fase sorbente.

Anteriormente, para analizar estrógenos en muestras de orina se utilizaron soluciones de MeOH entre el 20 y el 40% para limpiar los extractos luego de las extracciones [116],[117], por lo que en este estudio se decidió considerar una etapa que incluye un lavado del disco con MeOH entre 5 y 40%. Para esto, el disco rotatorio con los analitos e interferencias sorbidas se colocó en un vial y se añadieron 10 mL de las soluciones de lavado, el disco se agita durante 5 minutos a 2000 rpm. En la Figura 31 se puede ver que el uso de MeOH al 5 y 10% mejora la respuesta asociada con cada analito con respecto a la extracción sin limpieza. Además, considerando esta etapa el extracto final se vuelve casi incoloro. Con concentraciones de MeOH más altas que 20%, las señales comienzan a decaer debido a un proceso de desorción concomitante de los analitos. Se seleccionó el lavado con MeOH al 10% durante 5 minutos a 2000 rpm como etapa de limpieza *post*-extracción.

Etapa de desorción o elución de los analitos desde la fase sorbente

Después de la limpieza con MeOH al 10%, parte de los pigmentos permanecieron sorbidos en el disco junto con los analitos; en consecuencia, para obtener extractos limpios, el sorbente de desorción seleccionado debía eliminar solo los analitos sin eluir los pigmentos restantes en el disco. La desorción de los analitos se estudió utilizando diferentes solventes: DCM, MeOH, ACN y AcOEt. Usando

AcOEt como disolvente de desorción, se obtuvo una respuesta más alta de todos los analitos (Figura 32). Además, se observó que después de esto, un intenso color amarillo permaneció en el filtro sobre el disco, y el extracto final se volvió incoloro. AcOEt tiene la polaridad más baja de los solventes probados (constante dieléctrica (ϵ) 6,2), por lo cual fue capaz de desorber más selectivamente los analitos intermediamente polares y apolares sin interactuar con las interferencias polares restantes en la fase.

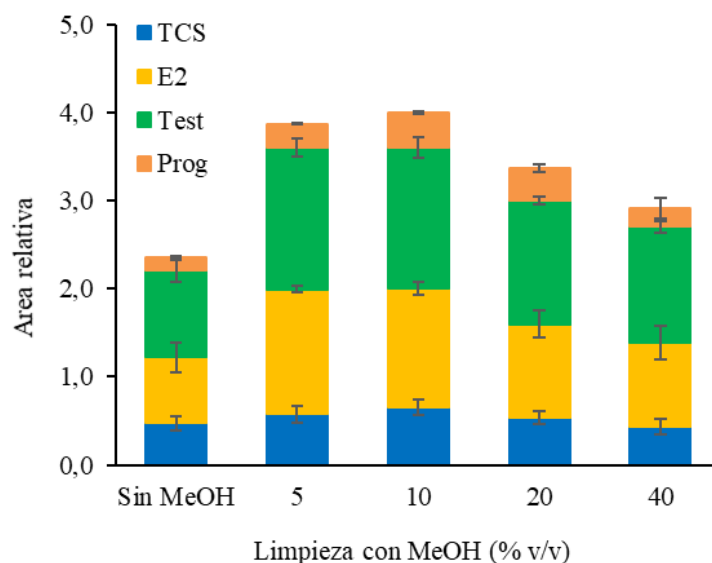


Figura 31. Efecto de la concentración de MeOH utilizada en la etapa de limpieza (después de la extracción por RDSE y antes de la elución) sobre la respuesta relativa de los analitos.

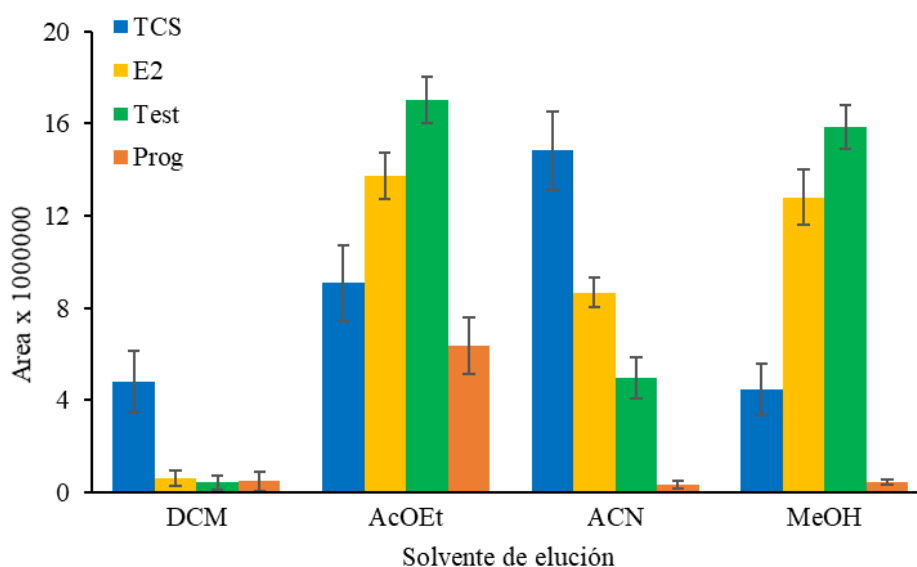


Figura 32. Efecto de los solventes de desorción en la elución de analitos desde la fase sorbente.

Para evaluar el efecto de las etapas incluidas y optimizadas en la metodología en la Figura 33-A (izquierda) se muestran los resultados comparativos para la recuperación absoluta y los efectos de matriz con respecto a los tres pasos optimizados: dilución de muestra, lavado con metanol diluido y disolvente de elución. La primera sección (C0) refleja los resultados obtenidos al aplicar la técnica RDSE sin considerar la limpieza de la muestra o la dilución de la muestra y el uso de MeOH como disolvente de desorción, como es típico en otras aplicaciones RDSE [90],[92],[118]. En estas condiciones, solo es posible extraer un máximo del 8% de los analitos, además hay un efecto de matriz altamente negativo de aproximadamente el 90%. Al incluir las diferentes etapas estudiadas (C1, C2 y C3, detalladas en la leyenda de la Figura 33), se puede observar que, al mismo tiempo que las recuperaciones aumentan, los efectos de matriz de cada analito disminuyen. En el último paso (C3), las recuperaciones absolutas se encuentran entre 46-57% y los efectos de matriz negativos están entre 15-22%. En la parte superior de la Figura 33-A, se puede observar cómo la intensidad del color en el extracto final disminuye a medida que se aplican las diferentes etapas de limpieza, comenzando con un naranja intenso a un amarillo claro, casi incoloro. Se ha reportado previamente que los extractos sucios de matrices complejas pueden suprimir la ionización de los analitos [119] o afectar el proceso de inyección de la muestra [120] en GC-MS.

Los pasos C2 y C3 solo varían en el solvente utilizado para la elución. Una comparación entre el uso de MeOH (C2) y AcOEt (C3) fue seguida por la obtención del espectro infrarrojo (IR) de la superficie del disco (Figura 33-B o lado derecho). En la superficie del disco eluido con AcOEt (espectro IR en rojo), se observan señales dobles a aproximadamente 1634 y 1584 cm^{-1} , atribuidas al estiramiento C=O y C=N, además de una señal ancha a aproximadamente 3273 cm^{-1} que es particular del estiramiento O-H. Estas señales coinciden con las esperadas para la urobilina. La ausencia de estas señales en la superficie del disco eluido con MeOH (espectro IR azul) se debe a que la urobilina se eluyó junto con los analitos, transfiriendo el color amarillo al extracto final.

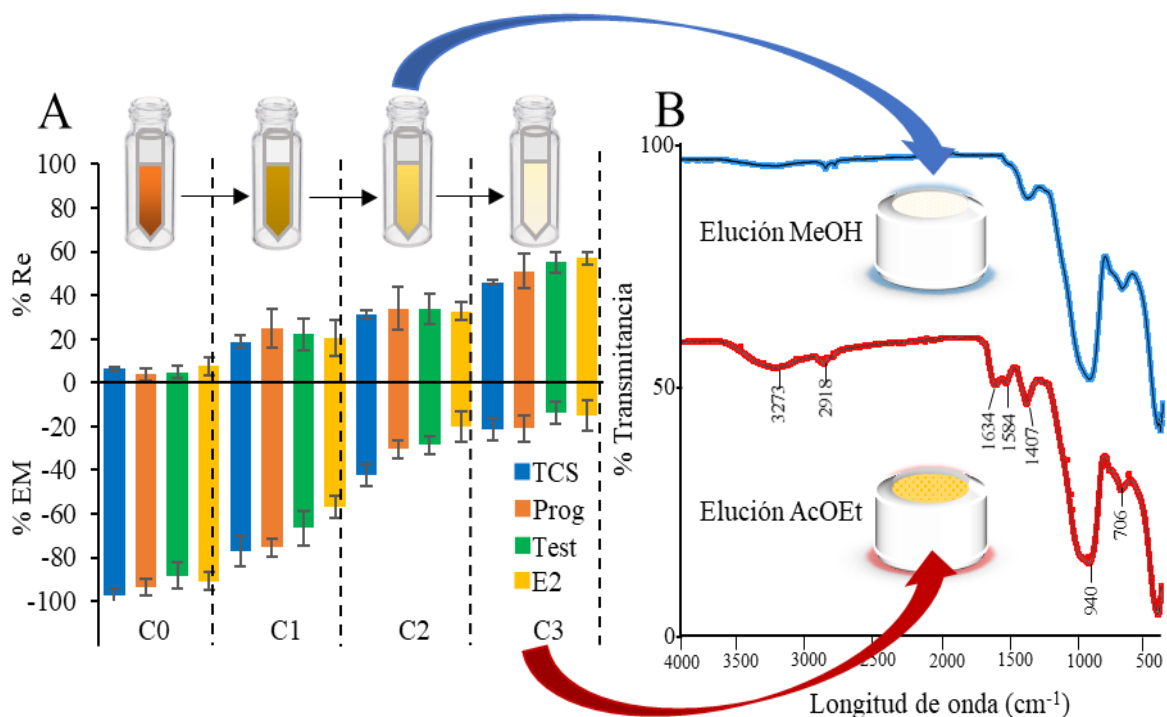


Figura 33. A. Efecto de las etapas de limpieza en las recuperaciones y efecto matriz. [C0: sin dilución y sin limpieza; C1: con dilución de orina (10x) y sin limpieza; C2: con dilución de orina (10x) + MeOH (10%) para limpieza; y C3: con dilución de orina (10x) + MeOH (10%) para limpieza + elución con AcOEt. Nota: C0, C1 y C2 se eluyeron con MeOH] B. Espectros infrarrojos de la superficie del disco giratorio después de la etapa de desorción con MeOH (azul) y AcOEt (rojo).

Variables hidrodinámicas en RDSE

Después de optimizar todos los pasos de *clean-up*, fue necesario un estudio de las variables hidrodinámicas asociadas con RDSE para encontrar las condiciones óptimas de extracción. Mediante un diseño experimental basado en una matriz Doehlert [106], se construyó el diseño con valores codificados y reales (Tabla 20) para evaluar los efectos de tres factores simultáneamente: volumen de muestra diluida, velocidad de rotación del disco y tiempo de extracción.

La Figura 34 muestra el diagrama de superficie de respuesta, que indica las siguientes condiciones óptimas: 2000 rpm, 60 min y 20 ml de muestra diluida (2 ml de orina y 18 ml de agua) para la velocidad de rotación, el tiempo de extracción y el volumen de muestra, respectivamente. La función de deseabilidad general para el número total de analitos fue de 0,8965.

Tabla 20. Matriz experimental Doehlert para evaluar variables hidrodinámicas de RDSE en orina.

Experimento	Valores codificados			Valores reales		
	X1	X2	X3	Tiempo (min)	Velocidad (rpm)	Volumen (mL)
1	0	0	0	60	1100	40
2	1	0	0	120	1100	40
3	0,5	0,866	0	90	2000	40
4	-0,5	0,866	0	30	2000	40
5	-1	0	0	0	1100	40
6	-0,5	-0,866	0	30	100	40
7	0,5	-0,866	0	90	100	40
8	-0,5	-0,289	-0,816	30	700	20
9	0	0,577	-0,816	60	1700	20
10	0,5	-0,289	-0,816	90	700	20
11	-0,5	0,289	0,816	30	1400	60
12	0	-0,577	0,816	60	400	60
13	0,5	0,289	0,816	90	1400	60
14	0	0	0	60	1100	40
15	0	0	0	60	1100	40

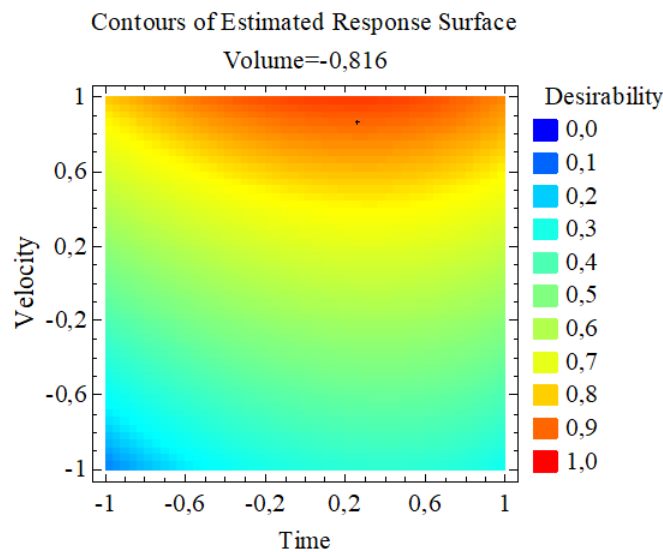


Figura 34. Superficie de respuesta estimada de las variables hidrodinámicas para RDSE en orina.

5.2.2.5 Cifras de mérito de la metodología desarrollada

La Tabla 3 muestra las cifras de mérito del método. La precisión se expresa en función de la recuperación relativa (basada en TCS-D₃ y Test-¹³C₃) y la precisión de acuerdo con la desviación estándar relativa (%RSD). RDSE se basa en un equilibrio de partición; por lo tanto, se usaron estándares *surrogates* para mostrar la eficiencia del método, obteniendo recuperaciones relativas entre 89-111%. La ecuación lineal para cada analito se construyó en la matriz de orina, y la linealidad (R²) fue mayor que 0.959, lo que se considera satisfactorio de acuerdo con la matriz en estudio. Excepto para Prog, los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) mostraron resultados consistentes, considerando que estos analitos generalmente están presentes en concentraciones superiores a estos valores límite. El efecto negativo de la matriz entre -14 y -22% indica que hay poca supresión de la respuesta de cada analito, y se podría asegurar que este remanente encontrado se deba más posiblemente a la inhibición de la capacidad de ionización de los analitos en la fase gaseosa y no debido a un posible bloqueo ocurrido en el puerto de inyección por la muestra.

Tabla 21. Cifras de mérito asociadas a la metodología RDSE en muestras de orina

Analito	Sensibilidad (mL ng ⁻¹)	Linealidad (R ²)	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)	%Re (relative)	% RSD (n=6)	% EM
TCS	0,0152	0.993	0,04	0,14	111	9	-21
E2	0,0383	0,969	0,01	0,04	96	7	-15
Test	0,0456	0,979	0,004	0,01	99	11	-14
Prog	0,0044	0,959	0,54	1,77	89	14	-22

En comparación con métodos previamente reportados por SBSE aplicados a las hormonas sexuales en muestras de orina, se encontró que el método propuesto es más rápido con un tiempo de extracción de 60 min en comparación con las 2-4 horas para alcanzar el equilibrio en SBSE [57], el cual se obtuvo principalmente a que la agitación de la barra no superaba las 750 rpm. Con respecto a los límites de detección, los límites más bajos reportados fueron 0,03 [121], 0,18

y $0,12 \text{ ng mL}^{-1}$ [58] para E2, Test y Prog, respectivamente, los cuales son más altos que los reportados en este trabajo (excepto para Prog). Las recuperaciones encontradas previamente por SBSE fueron 11,1 [57], 21,2 y 49,5% [58] para E2, Test y Prog, respectivamente, éstas fueron considerablemente más bajas que las reportadas en este método. Las menores recuperaciones reportadas en estos estudios se deben a que solo se consideró la dilución de la muestra para disminuir la complejidad de la matriz.

En el caso de la extracción de TCS desde la orina por SBSE, el tiempo de extracción informado fue de 90 minutos [122] superior al reportado en este estudio. El límite de detección más bajo reportado previamente fue $0,05 \text{ ng mL}^{-1}$, que es ligeramente más alto que el reportado en este estudio. En este mismo trabajo, así como en el presente estudio, se encontró una alta proporción de conjugación para metabolitos de TCS en muestras de orina, de 86,8 a 96,4% [123].

5.2.2.6 Análisis de muestras reales

Para evaluar la aplicación de la metodología, se analizaron muestras de orina de personas saludables de diferentes edades y sexos, incluida una mujer embarazada. Además, la hidrólisis enzimática se aplicó para cuantificar las concentraciones libres y totales de los analitos. Sin hidrólisis enzimática, solo fue posible cuantificar TCS en el hombre >50 años, E2 en las muestras de mujeres, Test en las muestras de hombres y en mujer <35 años, y la Prog en la mujer embarazada. El uso de hidrólisis enzimática aumentó considerablemente la concentración de los analitos en la orina, lo que es consistente con el hecho de que estos compuestos generalmente se excretan en la orina en forma de sus metabolitos más polares. Este resultado esperado para las hormonas sexuales también se encontró para TCS (metabolito O-glucurónido), que fue similar al encontrado previamente para metilparabeno usando la misma ruta de desconjugación enzimática [113]. Para el hombre >50 años, la proporción del conjugado de TCS en muestras de orina humana fue del 90%. Se encontró que E2 y Test estaban aproximadamente entre 5 y 40 veces más concentrados en su forma total, respectivamente. Normalmente, los niveles de Prog aumentan hasta 100

veces en mujeres durante el embarazo, por ello pudo ser cuantificada sin problema en esta muestra, lo cual no se pudo hacer en las demás muestras debido a la menor sensibilidad encontrada para esta hormona en la metodología propuesta (Tabla 22).

Tabla 22. Concentraciones (\pm SD) en ng mL⁻¹ de analitos en las diferentes muestras de orina estudiadas en presencia o ausencia de hidrólisis enzimática.

Analito	Hombre <35	Mujer <35	Hombre >50	Mujer >50	Mujer embarazada
Sin hidrólisis enzimática					
TCS	< LOD	< LOD	0,23 \pm 0,09	< LOD	< LOD
E2	< LOD	0,74 \pm 0,18	< LOD	0,11 \pm 0,01	0,43 \pm 0,11
Test	0,57 \pm 0,14	0,20 \pm 0,07	0,45 \pm 0,28	< LOD	< LOD
Prog	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	4,82 \pm 1,48
Con hidrólisis enzimática					
TCS	< LOQ	0,44 \pm 0,15	2,32 \pm 0,20	0,63 \pm 0,03	< LOD
E2	2,77 \pm 0,64	8,89 \pm 1,02	1,34 \pm 0,72	2,10 \pm 0,07	10,45 \pm 2,07
Test	21,23 \pm 3,54	2,62 \pm 1,32	17,67 \pm 1,83	0,44 \pm 0,16	2,70 \pm 0,43
Prog	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	11,92 \pm 2,03

SD (desviación estándar): se calculó considerando un triplicado de cada muestra

5.2.3 Conclusión

La metodología propuesta permite la determinación de hormonas sexuales y TCS en muestras de orina usando RDSE, con etapas de *clean-up* integradas, derivatización y cuantificación por GC-MS. Con respecto a la derivatización, las condiciones experimentales fueron mejoradas al reducir el consumo de la mezcla de derivatización en un 50%, además de evitar los sistemas de calentamiento controlados por temporizador, logrando un método más ecoeficiente y acorde a las premisas de la química verde. La estrategia de limpieza integrada con RDSE incluyó la dilución de la muestra (10 veces), el lavado del disco con solución metanólica al 10% después de la extracción y la desorción de los analitos con acetato de etilo. Este método mejorado reduce considerablemente los efectos de la matriz ejercidos por la presencia de pigmentos como la urobilina en la orina.

El TCS total se cuantificó con éxito en casi todas las muestras de orina en el rango de 0,23-2,32 ng mL⁻¹, lo que continúa siendo una señal de advertencia para la comunidad científica chilena considerando que este compuesto tiene características comprobadas como un compuesto disruptor endocrino. Además, se ha demostrado la capacidad de este compuesto para secretarse en la orina como metabolito, por lo tanto, muchas de las concentraciones de contaminantes en fluidos biológicos ya reportadas podrían ser mucho más altas. E2 y Test se cuantificaron con alta sensibilidad utilizando la técnica propuesta con concentraciones entre 0,11-10,45 y 0,23-21,23 ng mL⁻¹, respectivamente. Sin embargo, la determinación de la progesterona por esta ruta no fue satisfactoria debido a la baja sensibilidad obtenida por GC-MS. Prog solo se pudo cuantificar en la mujer embarazada (4,82 y 11,92 ng mL⁻¹ en forma libre y total, respectivamente).

Se recomienda aplicar este método para estudiar los efectos de la exposición a triclosán en los niveles de concentración relativa de hormonas sexuales.

La publicación resultante de este objetivo se muestra al final del escrito.

5.3. Objetivo 3: Determinación de kisspeptina-10, hormonas sexuales y triclosán en muestras de suero de ratas empleando VA-MSPD/UHPLC-ToF/MS.

5.3.1 Parte Experimental

5.3.1.1 Condiciones UHPLC-MS (ESI/TOF)

En la tabla 23, se resumen las condiciones de cromatografía líquida y espectrometría de masas de alta resolución optimizadas. En la tabla 24, se muestran los tiempos de retención a los que eluye cada analito, el ión utilizado para la cuantificación y la atribución correspondiente a cada compuesto.

Tabla 23. Condiciones UHPLC y ESI-TOF/MS para el método Kiss10, Test, Prog, E2 y TCS.

Cromatógrafo de Líquidos (UHPLC)	Espectrómetro de Masas
Volumen y modo de inyección: 10 μ L / Splitless	Tipo de Fuente: Ultra-Electrospray (ESI)
Columna: Brownlee SPP C18 2,7 μ m	Analizador: Tiempo de vuelo (ToF)
Temperatura columna: 20°C	Voltaje capilar: 6000V
Solventes: (A) Agua/HCOOH (0,1%) (B) ACN	Salida del capilar: -125 V
Gradiente de elución:	Flujo de gas N ₂ : 10 L min ⁻¹
G ₀ = 0-1 min, 0-60% B, G ₁ = 1-2 min, 60-80% B; G ₂ = 2-3 min, 80% B; G ₃ = 3-4 min, 80-90% B; G ₄ = 4-5 min, 90-100% B.	Temperatura del gas: 300°C
Flujo de fase móvil: 0,3 ml min ⁻¹	Presión de nebulización: 80 psi
Tiempo de análisis: 5 min	Rango de masas: 100-1500 m/z
	Modo trampa (<i>trap</i>): 25-45 μ s

Tabla 24. Tiempos de retención y los iones para el total de analitos

Analito	Tiempo de retención (min)	Iones (m/z)	Atribución
Kiss10	0,629	651,8180	[M+2H] ²⁺
Test	1,364	289,2167	[M+H] ⁺
E2*	1,978	431,9770	[M-DMIS+H] ⁺
Prog	2,940	315,2154	[M+H] ⁺
TCS*	3,496	446,9770	[M-DMIS+H] ⁺

*Derivatizados con DMIS

5.3.1.2 Protocolo de Derivatización

Se estudió el protocolo de derivatización de un estándar múltiple de 250 µg L⁻¹. Se añaden 100 µL del multiestándar o extracto de muestra a un vial de 2 mL y se evapora a sequedad bajo corriente de N₂. Se añaden 100 µL del agente de derivatización DMIS (1mg mL⁻¹ en MeOH) y 100 µL de NaHCO₃ 60mM, se agita en vórtex por 5 min a temperatura ambiente. El extracto derivatizado (solo se derivatiza E2 y TCS), se analiza por UHPLC-TOF/MS en modo EIC.

5.3.1.3 Protocolo de Extracción

El protocolo de extracción seleccionado se trata de dispersión de matriz en fase sólida (MSPD). Para ello, en un tubo de microcentrífuga de 1,5 mL (conocido normalmente como eppendorf) se pesan 20 mg de la fase dispersiva C18 y se añaden 150 µL de suero de ratas y se agita a la potencia máxima del vórtex por 5 min (aprox. 3000 rpm). En este paso, la matriz líquida se integra completamente en la fase dispersiva sólida, resultando un sólido de similar textura al C18, pero con una coloración amarillenta propia del suero. En el mismo eppendorf se añaden 1000 µL de la mezcla ACN y se agita nuevamente en vórtex por 10 min, luego se coloca en una microcentrífuga a 7000 rpm por 10 min. Una vez lograda la separación de las fases en este último paso, se toma la solución orgánica (que contiene los analitos) y se pasa por un filtro de PTFE 0,22µm, finalmente se añade el extracto filtrado a un vial de 2 mL donde será posteriormente derivatizado y analizado por UHPLC-ToF/MS.

5.3.1.4 Validación del método

Igual al empleado en el punto 5.1.1.4

5.3.1.5 Muestras reales

Para el desarrollo del método se utilizó suero de ratas que habían sido previamente sacrificadas para otros estudios.

5.3.2 Resultados y Discusión

5.3.2.1 Consideraciones generales

Uno de los objetivos principales de esta investigación, es el estudio de la familia de kisspeptinas en distintos sistemas biológicos, particularmente de la Kisspeptina-10. Tal como se ha mencionado, su importancia radica en el rol clave que ejerce como sustancia reguladora del sistema endocrino, siendo muchas veces propuesta como biomarcador de distintas enfermedades.

Debido a su alto peso molecular y su alta polaridad y solubilidad en agua, es imposible analizar este péptido a través de técnicas como GC-MS. Como complemento al trabajo anterior, se añade al conjunto de analitos ya estudiados (progesterona, testosterona, estradiol y triclosán) la kisspeptina-10, utilizando como técnica de análisis LC-MS.

El equipo disponible para realizar los análisis es un UHPLC-ESI-ToF/MS, éste es un sistema con muchas ventajas, entre las que se pueden mencionar:

- (i) El sistema ultra cromatográfico de alta resolución (UHPLC), permite análisis muchos más rápidos que los sistemas convencionales HPLC, teniendo así separaciones cromatográficas en tan sólo 5 min. La principal diferencia entre ambos sistemas radica en el tamaño de columnas, y a su vez en el tamaño de las partículas que las componen.
- (ii) La fuente de ionización es electrospray (ESI), en este caso se utiliza un nanospray que se produce al pasar la muestra desde el sistema cromatográfico al masas. A través de un gas de alta pureza (N_2), las pequeñas gotas se ionizan y pasan directamente al *endplate*, capilar y posteriormente al analizador.
- (iii) El sistema ToF (tiempo de vuelo) es el analizador del masas, se conoce como un tipo de analizador de alta resolución, con una gran precisión en la detección de las masas (hasta cuatro cifras decimales), esto permite una identificación inequívoca de los analitos, además de otras ventajas como la determinación de fórmulas moleculares de manera exacta.

5.3.2.2 Estudios de infusión directa de la muestra en el espectrómetro de masas (ESI-TOF/MS)

Para este caso, antes de trabajar con el sistema cromatográfico, es de suma importancia optimizar las condiciones del espectrómetro de masas en las cuales se pueden detectar los analitos, para ello es necesario tanto estudiar los parámetros que controlan la ionización de las moléculas en la fuente (ESI), como los que permiten la separación de los analitos en el tiempo de vuelo (ToF).

El equipo disponible permite realizar mediciones directas en el sistema ESI-TOF/MS a través de un sistema de inyección automático, en el cual la muestra soportada en una jeringa es impulsada por una bomba hacia la fuente de ionización. A diferencia del método previo optimizado por GC-MS, en este caso es posible realizar determinaciones tanto en modo positivo como en modo negativo, es decir, el equipo está en la capacidad de medir las moléculas cargadas tanto positivamente, como negativamente (pero no de manera simultánea). Debido a que la ionización que ocurre en el ESI es “suave”, es imperativo el uso de ciertos aditivos para cualquiera de los modos previamente mencionados.

Modo negativo

Por lo general, este modo es usado para compuestos con grupos -OH presentes en la molécula, y que además ese hidrógeno presente cierta labilidad, es decir, este modo se favorece en aquellas moléculas que puedan ser cargadas fácilmente de forma negativa. A pesar de que muchos compuestos poseen estos grupos -OH ácidos, por ejemplo, ácidos carboxílicos o fenólicos, es necesario el uso de aditivos que permitan o favorezcan la ionización en la fuente ESI. Después de hacer una revisión en la literatura, se seleccionaron algunos compuestos como posibles aditivos: NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{C}_2\text{O}_4$, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, citrato de amonio y tartrato de amonio. Se hicieron experimentos en presencia (al 0,1%) y ausencia de estos aditivos en la solución (ACN:H₂O) donde fueron disueltos los analitos (10 mg L⁻¹) e inyectados directamente en el ESI-ToF.

La hormona E2 fue la única observada en el modo negativo, pero con una sensibilidad muy baja. Esto es congruente con lo encontrado en la literatura, ya que es bien conocida la ineficiente ionización de estrógenos en sistemas ESI [124]. Kiss-10, Test, Prog y TCS no fueron detectados bajo este modo de ionización.

Modo positivo

Este modo de ionización es típico de compuestos que presentan grupos protonables como carbonilos (C=O) y aminos (N-H), estos son detectados a través de la carga positiva que se genera. Al igual que el caso anterior, es necesario el uso de aditivos para favorecer la ionización de la molécula. Idealmente se usa ácido fórmico (HCOOH) debido a su alta volatilidad y bajo peso molecular. Para ello cada analito fue disuelto en la mezcla ACN:H₂O (a 10 mg L⁻¹) con ausencia y presencia de HCOOH al 0,1% y fueron inyectadas en el modo de infusión directa del ESI-ToF/MS. De los resultados encontrados se pudo concluir:

- (i) Prog y Test fueron detectados exitosamente con una alta sensibilidad bajo la forma $[M+H]^+$, lo cual concuerda con el hecho que los progestágenos y andrógenos son analizados por este modo debido a la fácil protonación del oxígeno de los grupos carbonilos (C=O) presentes (Figura 35).

- (ii) Kiss-10 fue detectada exitosamente de tres formas posibles que se atribuyen a las estructuras $[M+H]^+$, $[M+2H]^{2+}$ y $[M+3H]^{3+}$, esto es corroborado por la diferencia encontrada en la distribución isotópica de 1; 0,5 y 0,33 una para cada uno, respectivamente. Esto es concordante con el comportamiento típico de péptidos y proteínas, las cuales poseen una gran variedad de grupos funcionales donde puede ocurrir la protonación, lo que permite la presencia de estas especies multicargas. En la Figura 36 se muestra el espectro de masa donde se observa la kisspeptina dos y tres veces cargada, la masa intacta protonada es prácticamente imperceptible.

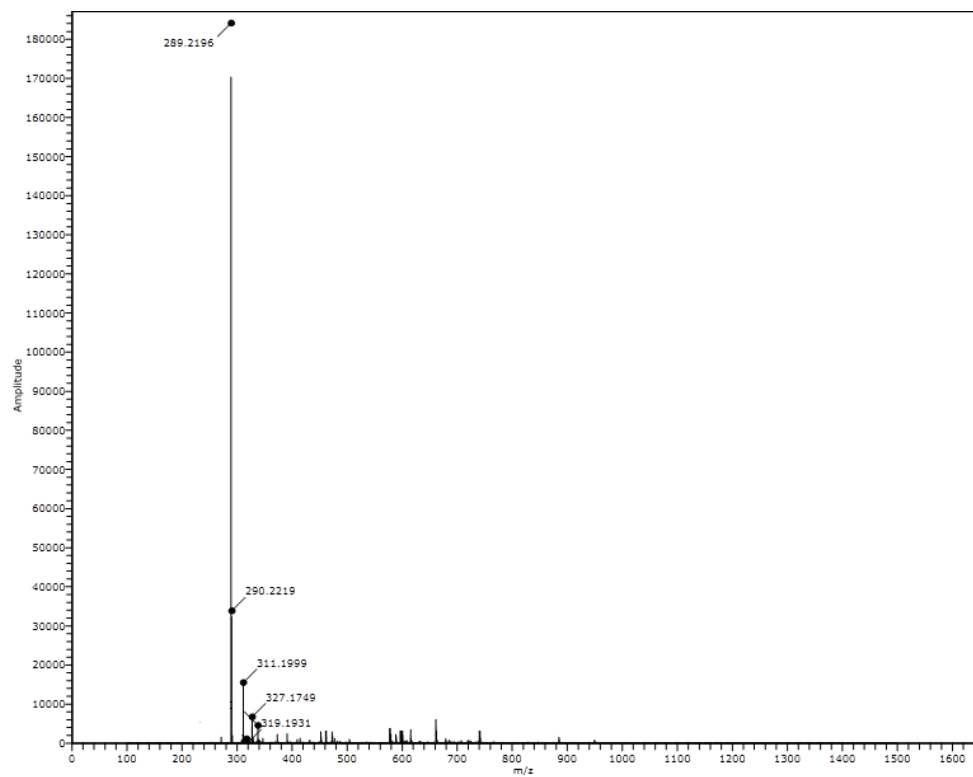
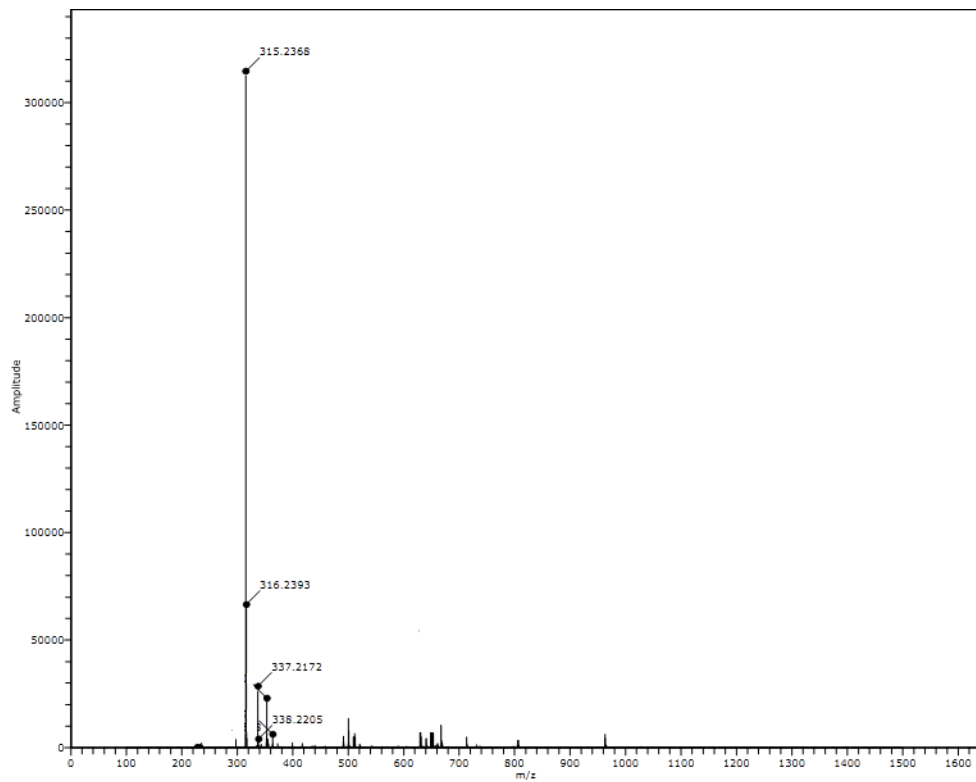


Figura 35. Espectros de masas Prog (superior) y Test (inferior) en modo positivo

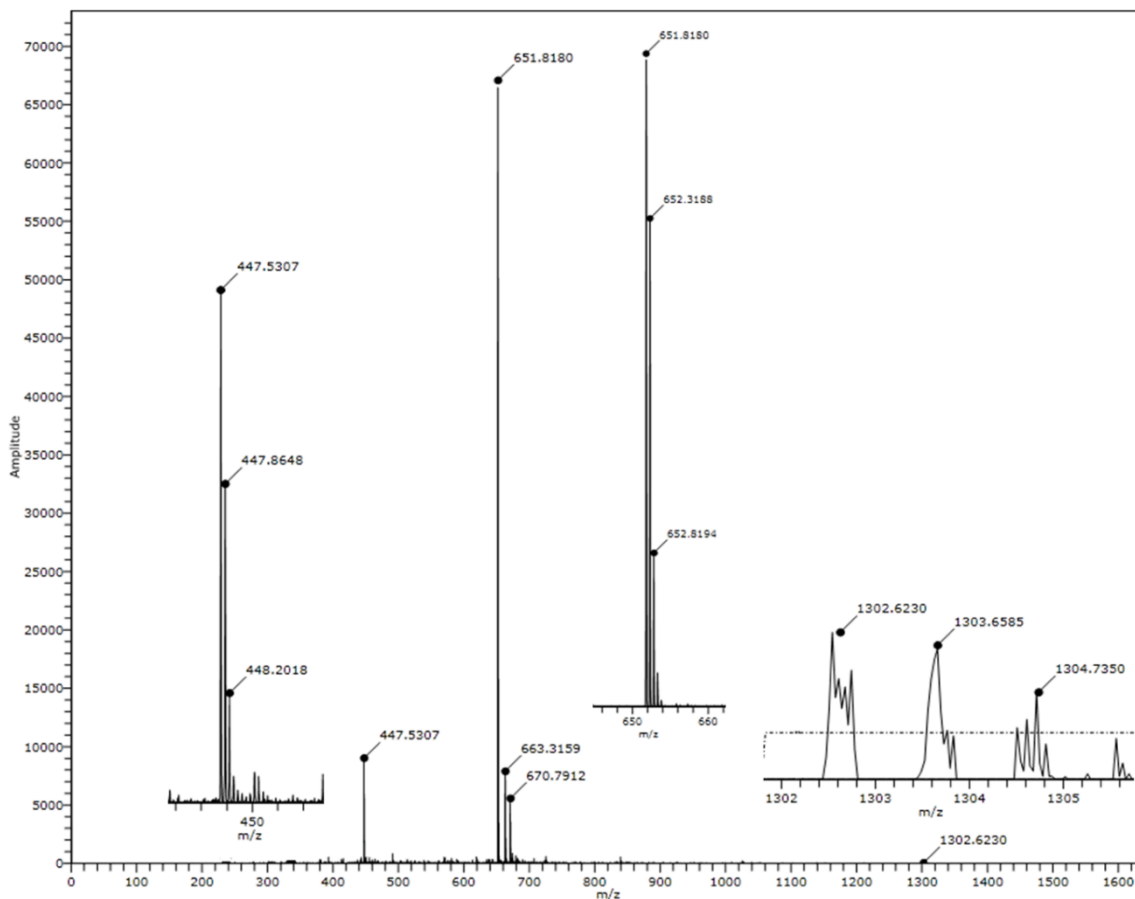


Figura 36. Espectro de masas Kisspeptina-10 en modo positivo

(iii) E2 fue detectada con muy baja sensibilidad, debido a la ausencia de posibles grupos funcionales protonables. La hormona fue encontrada perdiendo una molécula de agua, esto es $[M-H_2O+H]^+$. El TCS tampoco fue detectado bajo este modo de ionización.

En la tabla 25 se resumen los resultados encontrados para el experimento de infusión directa en modo positivo, donde es de destacar la mayor sensibilidad encontrada para la Prog y Test, seguido por la Kiss-10 (en su especie dos veces protonada) y finalmente una baja sensibilidad para E2 y nula para TCS.

Tabla 25. Resultados encontrados por infusión directa de los analitos en el ESI-ToF (modo positivo)

Compuesto	m/z	Atribución	Amplitud
	1302,6452	[M+H] ⁺	801
Kiss-10	651,8309	[M+2H] ²⁺	67450
	447,8835	[M+3H] ³⁺	7333
Test	289,2167	[M+H] ⁺	170635
Prog	315,2315	[M+H] ⁺	323870
E2	255,1945	[M-H ₂ O+H] ⁺	14805
TCS	n.d.	N/A	N/A

5.3.2.3 Estudio de reactivo para el medio ácido

Como se ha mencionado previamente, la presencia de medio ácido es imprescindible para la detección de los analitos en modo positivo. El ácido fórmico ha sido utilizado por excelencia en muchos trabajos reportados, sin embargo, se propuso probar con dos ácidos adicionales, para evaluar alguna mejora en la respuesta de la detección final.

Se hizo un estudio comparativo de tres ácidos a una concentración de 0,1%: ácido fórmico (HCOOH), ácido acético (HAc) y ácido heptafluorobutírico (HFBA). También se evaluó la ausencia de medio ácido. Los valores de pH para estas tres soluciones son 2,9; 3,1 y 3,3; respectivamente. En la figura 37 se muestran los resultados del estudio. Se observa que el medio ácido es imprescindible para la ionización de los compuestos. Además, en el medio de ácido fórmico hay mayor sensibilidad en la detección, y considerando los valores de pH, este resultado indica que a valores más bajos (más ácidos) se favorece la ionización de los compuestos en la fuente ESI.

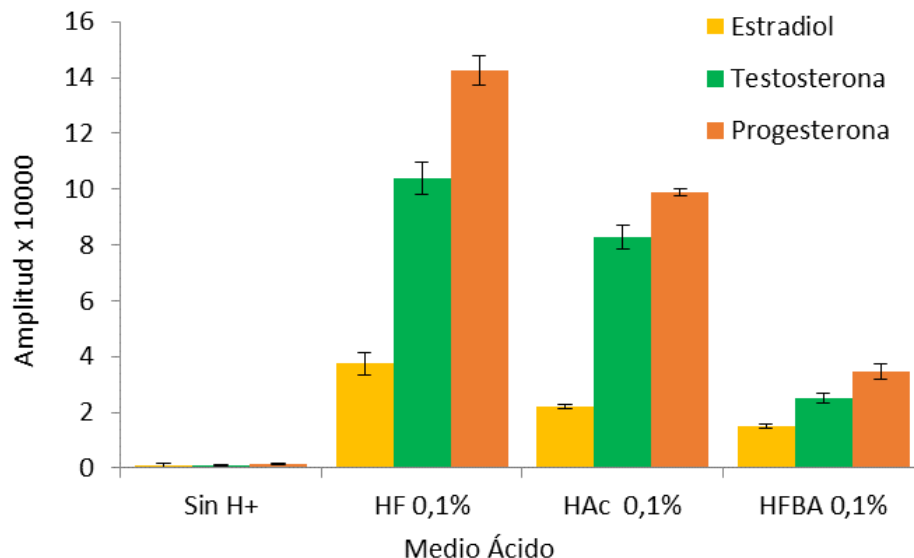


Figura 37. Estudio de medio ácido en la ionización de compuestos en ESI-ToF/MS

5.3.2.4 Modo *trap* vs. *pulse*

Considerando los resultados anteriores, se siguió trabajando en modo positivo para los ensayos, tratando de buscar la forma de mejorar la detección de los analitos. En los ensayos previos todos los analitos fueron inyectados por separado y en modo pulso (*pulse*), detectando todas las masas posibles. Se observó que la Test y Prog tenían una alta sensibilidad, a diferencia de los demás analitos. Para mejorar esto, se recurre a una herramienta del equipo que se conoce como modo trampa (*trap*). En este modo el equipo usa “trampas” para mejorar la detección de ciertas masas moleculares con respecto a otras (como una especie de filtro), esta se representa en unidades de μs y entre más separado estén los valores, es posible determinar masas más altas.

Se hicieron múltiples ensayos variando la amplitud de la trampa, encontrando que se necesitan de al menos 20 unidades de separación para mejorar la sensibilidad de masas altas (como la de Kiss-10). En la tabla 26 se resumen los resultados encontrados en modo pulso y de las dos mejores trampas encontradas.

Se muestran dos resultados importantes según la aplicación requerida. En los dos modos *trap* se mejora la sensibilidad de Kiss-10, siendo más significativa

para la relación 25/45. Es de notar que en esta relación también mejoran las hormonas sexuales, sin embargo, con la relación 28/34 la sensibilidad de éstas es mayor. Para empezar con los ensayos, se seleccionó la trampa 25/45, pero de acuerdo con la sensibilidad requerida en muestras reales, a futuro se puede cambiar fácilmente en el equipo a la otra configuración óptima para las hormonas sexuales. Lamentablemente el equipo no puede medir ni distintos modos al mismo tiempo, ni tampoco distintas trampas, por ende, en caso de ser requerido, tendría que inyectarse la muestra dos veces si es necesaria mejorar la sensibilidad de detección de algún analito con respecto a otro.

Tabla 26. Diferencias de amplitudes para ensayos modo pulso y trampa por ESI-ToF/MS

Analito	m/z	Amplitudes		
		Pulso	trap 25/45	trap 28/34
	1302,6452	801	5020	1201
Kiss-10	651,8309	67450	298999	107654
	447,8835	7333	175644	23876
Test	289,2167	170635	697654	1010657
Prog	315,2315	323870	945666	1450876
E2	255,1945	14805	39654	44065
TCS	n.d.	N/A	N/A	N/A

5.3.2.5 Estudio cromatográfico UHPLC

Luego de evaluar y optimizar las condiciones por infusión directa en el espectrómetro de masas, se hicieron ensayos usando el sistema UHPLC para mejorar la sensibilidad en la detección y para evidentemente lograr la separación de los analitos usando una columna cromatográfica. Se ensayó inicialmente con un multiestándar que contenía 1 mg L⁻¹ de Kiss-10, Test, Prog, E2 y TCS. El equipo disponible se compone de una bomba binaria para hacer combinaciones de las fases orgánica y acuosa que permiten las diferentes movilidades de los analitos por la columna. El tipo de columna con tamaños de partículas de 2,7 µm permite flujos máximos de 0,3 mL min⁻¹, el cual fue utilizado para realizar todos los ensayos.

Se realizaron tres experimentos con distintos gradientes de elución. Siguiendo los resultados obtenidos por inyección directa, la fase orgánica fue definida como ACN (B) y la acuosa como H₂O/HCOOH al 0,1% (A). Las condiciones iniciales ensayadas incluían una fase móvil inicial del 100% B, y se aumentaba gradualmente la fase acuosa. Se observó que cuando la fase móvil inicial tenía una alta concentración en fase orgánica, los analitos eluían muy rápido por la columna, por ende, se decidió ir disminuyendo la concentración inicial en solvente orgánico. Al usar 60% de B inicial en la fase orgánica, se encontró una separación cromatográfica con buena resolución para los compuestos, considerando la necesidad de mejorar a futuro la sensibilidad de la hormona E2 y la detección de TCS. En la Tabla 27, se muestra el gradiente de elución seleccionado.

Tabla 27. Gradiente de elución seleccionado para la separación cromatográfica UHPLC.

Tiempo (min)	% A	% B
0-1	40	60
1-2	20	80
2-3	20	80
3-4	10	90
4-5	0	100

El péptido Kiss-10 eluye exitosamente con este gradiente a 0,629 min sin interferir con los demás analitos, que eluyen a tiempos superiores por su mayor afinidad con la columna cromatográfica. En la figura 38 se muestra el cromatograma para la elución del multiestándar que contienen kisspeptina-10, testosterona, progesterona, estradiol y triclosan a 5 mg L⁻¹. Hasta este momento aún no había sido posible detectar el disruptor endocrino TCS y la hormona E2 seguía teniendo muy baja sensibilidad.

De los resultados hasta el momento se puede concluir lo siguiente:

- (i) Se ha conseguido optimizar un método UHPLC-ESI-ToF/MS para la identificación, separación y cuantificación de Kiss-10, Test, Prog y E2.

- (ii) Se debe trabajar en mejorar la sensibilidad de la determinación de la hormona E2 el cual es 15 a 20 veces menor que las demás hormonas sexuales.
- (iii) Aún no se ha conseguido identificar el TCS por este método. Se probaron distintas concentraciones y distintos modos de análisis sin buenos resultados. Se propone a futuro buscar un método de derivatización que permita el estudio de este compuesto y a la vez mejorar la sensibilidad de la hormona E2.

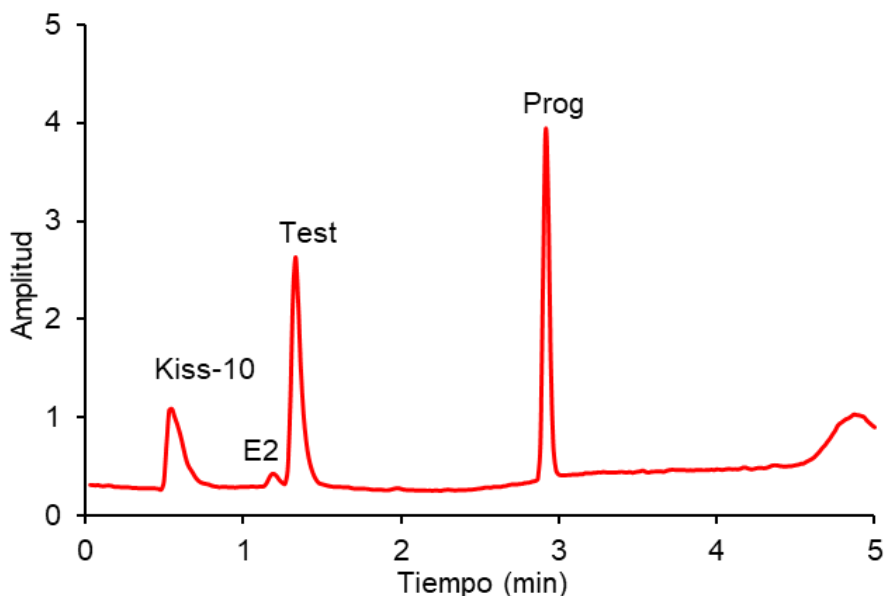


Figura 38. Cromatograma inicial de los analitos usando UHPLC-ESI-ToF/MS

5.3.2.6 Estudio de derivatización de la hormona E2 y TCS

Como propósito final de esta investigación, se pretenden realizar estudios del comportamiento del sistema kisspeptidérgico (hormonas sexuales/kisspeptina) en presencia del compuesto disruptor endocrino, triclosán. Para ello es necesario tener un método que no solo permita identificarlos, sino también cuantificarlos a niveles de detección muy bajos. Al evaluar los resultados anteriores, donde E2 se observa con baja sensibilidad y el TCS no ha podido siquiera ser detectado, se recurrió al estudio de algún método de derivatización para estos compuestos, que no involucre modificaciones de los demás analitos.

Un método comúnmente utilizado para la determinación de estrógenos por LC-MS es la derivatización previa a la inyección con cloruro de dansilo en medio

básico [124]. Este método ha sido ampliamente estudiado para los estrógenos con buenos resultados de aumento sensibilidad. Sin embargo, se ha encontrado que en sistemas MS/MS, existe un inconveniente relacionado con la fragmentación por colisión del ion dansilo-E2, donde la carga se localiza casi completamente en el grupo dansilo. Aunque esto contribuye a una alta intensidad de señal, también evita el monitoreo de transiciones de masas adicionales confirmatorias, lo que aumenta la susceptibilidad del método a las interferencias de otros compuestos en la muestra que reaccionan con el cloruro de dansilo. Es por ello que, para el caso de esta investigación, se decidió probar con otro medio derivatizante conocido como 1,2-dimetilimidazol-5-sulfonil cloruro (DMIS), el cual derivatiza selectivamente la hormona E2 en presencia de andrógenos y progestágenos sin modificarlos, aumenta notablemente la sensibilidad de los analitos y además evita las posibles complicaciones en los sistemas MS/MS mencionados previamente con el cloruro de dansilo [125]. En la figura 39 se observa la estructura de este reactivo de derivatización, que en presencia de una base como NaHCO_3 , permite la derivatización selectiva de la hormona E2, en el hidroxilo más ácido, es decir, el unido al anillo de benceno.

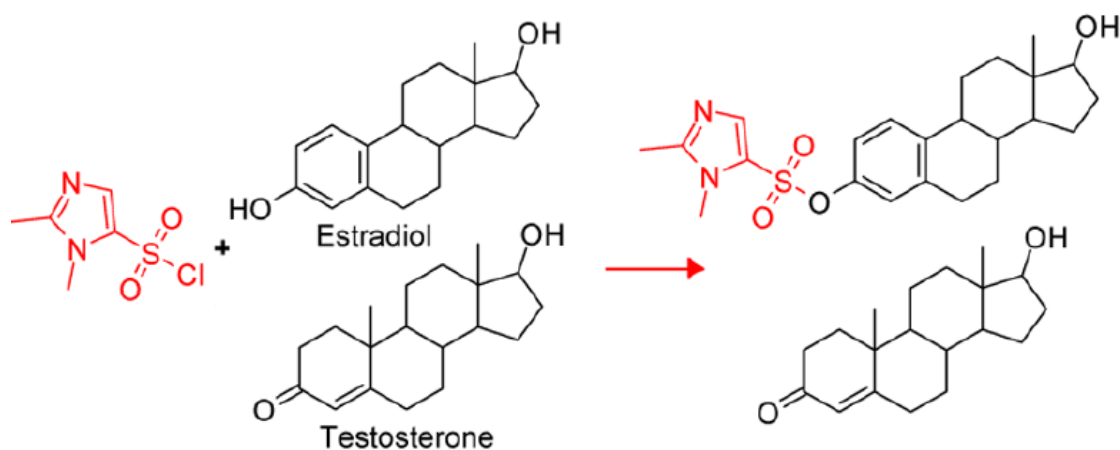


Figura 39. Reacción de derivatización de E2 y Test mediante el uso de DMIS/ NaHCO_3 [125].

Para ensayar esto, se siguieron las condiciones de la referencia: 1 mg del reactivo DMIS fue disuelto en 1 mL de MeOH. El NaHCO_3 utilizado se empleó a una concentración de 50mM. Inicialmente cada analito a 10 mg L^{-1} fue disuelto en una proporción 1:1 de la mezcla DMIS/ NaHCO_3 e inyectado por infusión directa en el

ESI-ToF/MS con los parámetros previamente optimizados. Pevio a la inyección, la solución fue colocada en un plato de temperatura a 60°C por 15 min. Se encontraron los siguientes resultados:

- (i) Los estándares de Test y Prog no sufrieron modificación alguna en presencia del medio derivatizante, esto se evidencia ya que sus tiempos de retención, amplitudes y espectros de masas no cambiaron (Figura 40).

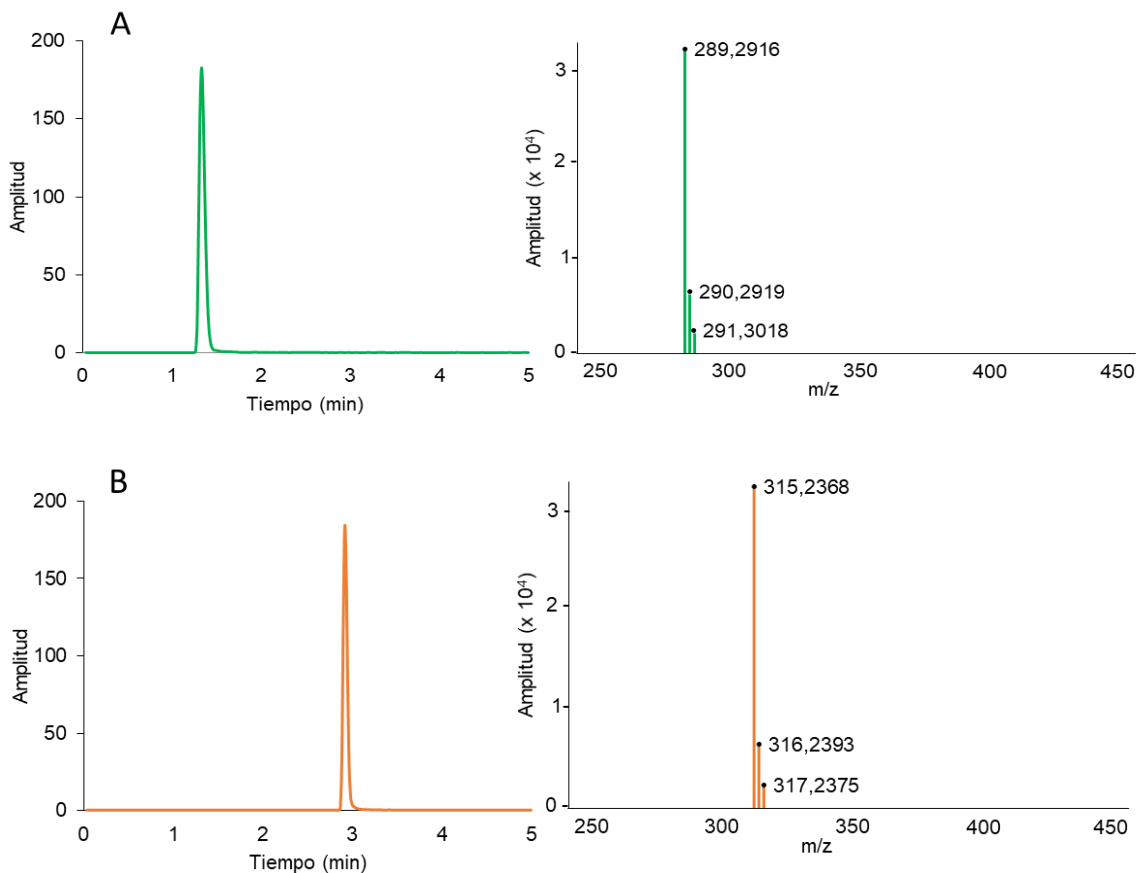


Figura 40. Cromatograma y Espectro de masas para Test (A) y Prog (B) en presencia de DMIS/NaHCO₃

- (ii) Kiss-10 se ve afectada por la presencia del medio derivatizante, esto se corrobora en el cromatograma de la figura 41. Su amplitud disminuye considerablemente, prácticamente a la altura de dos señales que son parte del ruido. Al observar el espectro de masas se observa que la señal de Kiss-10 es solo un poco mayor de posibles interferentes con amplitudes muy bajas. Esto puede ser explicado por algún efecto de modificación estructural que pueda

estar sufriendo el péptido en presencia de ese medio de reacción o también por inhibición de la capacidad de ionización de la Kiss-10 en la fuente ESI por presencia de reactivos y sales, lo cual está ampliamente estudiado y referenciado previamente [126].

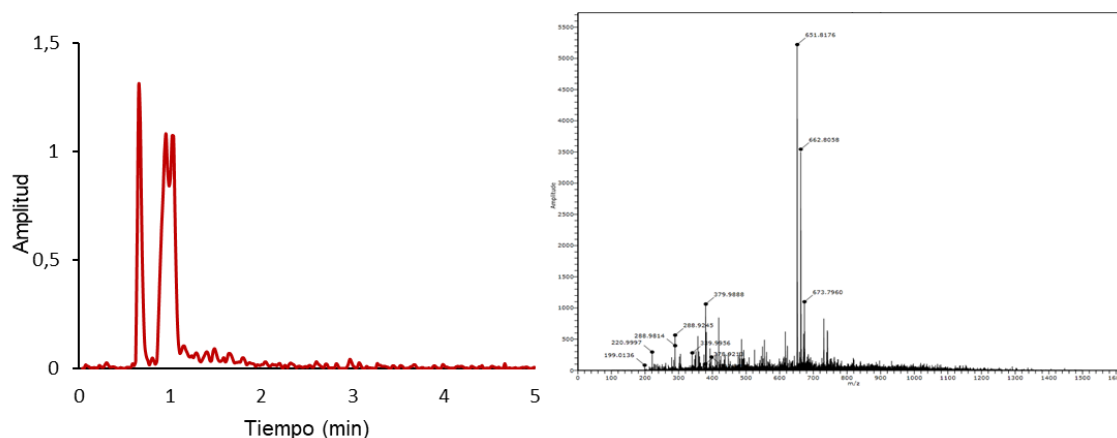


Figura 41. Cromatograma y espectro de masas de Kiss-10 en presencia de DMIS/NaHCO₃

- (iii) E2 se derivatiza en presencia de la mezcla derivatizante, encontrando un solo producto mayoritario con m/z de 431,2027. Este compuesto derivatizado eluye a 1,978 min, tiempo mayor que el encontrado para E2 sin derivatizar, esto se debe a que el nuevo compuesto derivatizado se vuelve más apolar y se retiene más por la columna. En la Figura 42 se observa el cromatograma y espectro de masas de la especie E2-DMIS.

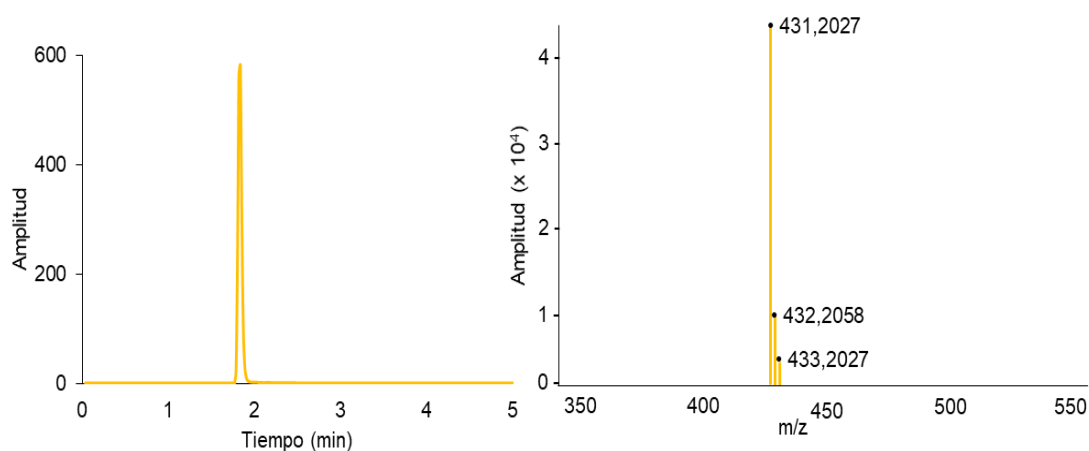


Figura 42. Cromatograma y espectro de masas de E2-DMIS en presencia de DMIS/NaHCO₃

(iv) Además, al estudiar el TCS bajo esta misma condición, se encontró de igual manera un producto mayoritario con m/z de 446,9770. En la figura 43 se observa el cromatograma de elución del nuevo compuesto a 3,496 min.

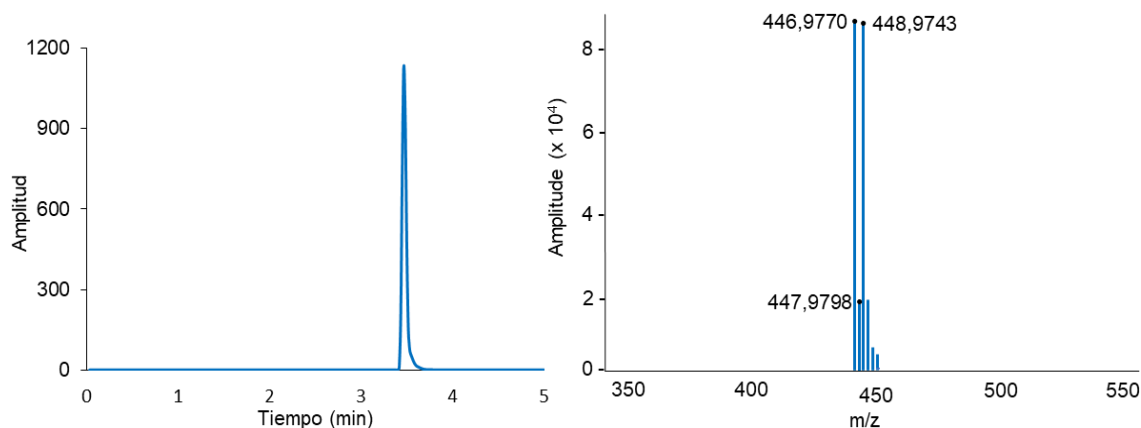


Figura 43. Cromatograma y espectro de masas de TCS-DMIS en presencia de DMIS/NaHCO₃

Además, se muestra el espectro de masas donde se observa la concordancia en la intensidad de las señales A+1, A+2 y A+3 propias de tener 3 grupos -Cl sustituyendo la molécula (isotopía), esto es, A+1 y A+3 de igual intensidad, A+2 con 1/3 de la intensidad de las dos señales anteriores. Vale destacar que este compuesto no había podido ser detectado previamente.

En la Figura 44, se muestra el cromatograma de elución del total de analitos en presencia de DMIS/NaHCO₃. Este medio favorece positivamente la detección de la hormona E2, además de permitir la detección del TCS, ambos con sensibilidad comparable a la encontrada previamente para Test y Prog. Negativamente se puede decir que afecta la Kiss-10, ya que se disminuye su sensibilidad notablemente en presencia de esta mezcla de reacción.

Finalmente, en la figura 45, se pueden observar las diferencias en ambos cromatogramas con la presencia y ausencia de la derivatización con DMIS/NaHCO₃ donde se observan los dos compuestos adicionales (E2-DMIS y TCS-DMIS) en el caso de la muestra derivatizada. En base a las diferencias encontradas, principalmente en cómo afecta negativamente la presencia del derivatizante a la Kiss-10, a futuro se pretende analizar dos extractos de muestra por separado, uno con y otro sin derivatización.

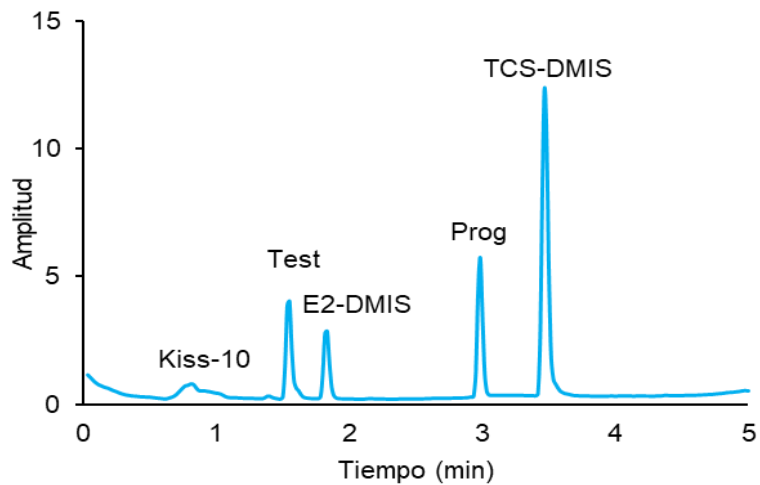


Figura 44. Cromatograma de elución del conjunto de analitos en presencia DMIS/NaHCO₃

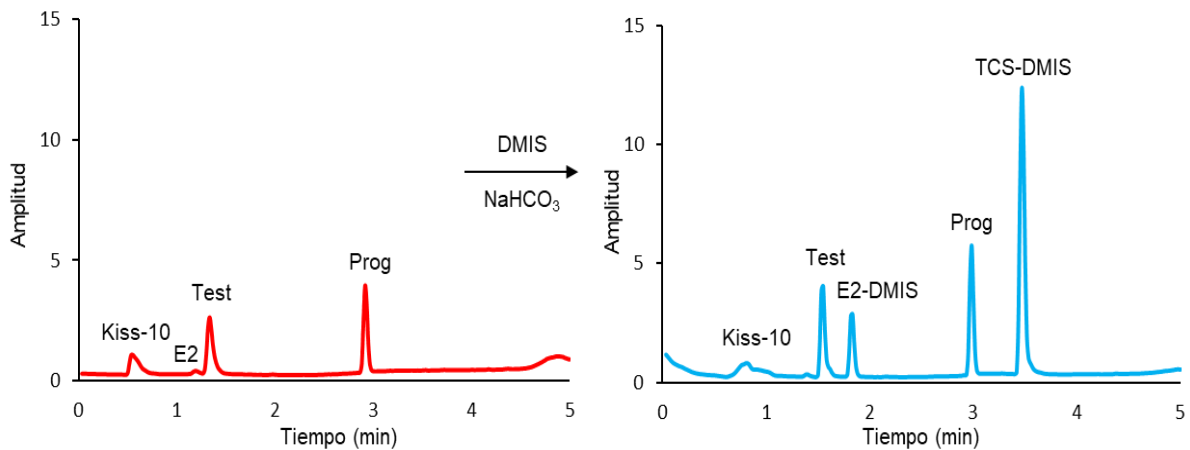


Figura 45. Cromatograma de elución de Kiss-10, T, P, E2 y TCS, sin y con derivatización vía DMIS/NaHCO₃.

Optimización de la derivatización usando el reactivo DMIS/NaHCO₃

Considerando que en el trabajo de donde fue extraído este método de derivatización realizan la reacción a 60°C por 15 min sin estudios relacionados, se decidió evaluar el efecto que tienen tres variables en la derivatización, estas son: temperatura, tiempo y concentración de la base. Para ello se utilizó una matriz experimental del tipo Doehlert para evaluar el efecto de las variables considerando las posibles interacciones entre ellas en los distintos experimentos. En la tabla 28 se muestran los experimentos propuestos con valores codificados y reales.

Se determinó que el reactivo de derivatización (DMIS), debe ser preparado y utilizado inmediatamente. Cuando se intentó hacer unas pruebas con un reactivo preparado días antes, no ocurrió la derivatización exitosa de los analitos (muy bajas señales cromatográficas). A través de un estudio de deseabilidad grupal (incluyendo también los que no se derivatizan) se obtiene una condición óptima para la derivatización. En cuanto al poder de predicción del modelo en todos los casos se obtuvieron p-value para regresión/error residual <0,05 demostrando la viabilidad del modelo. Además, valores >0,05 en la carencia de ajuste/error en todos los casos indican la idoneidad de los modelos cuadráticos debido a la variación del error analítico. Finalmente, el R² ajustado con valores entre 79 y 97% indican un adecuado ajuste del modelo con respecto a la ecuación polinomial.

Tabla 28. Matriz Doehlert para el estudio de variables en la derivatización con DMIS/NaHCO₃

Exp	Valores codificados			Valor Real		
	X1	X2	X3	X1= Tiempo (min)	X2= Conc. NaHCO ₃ (mM)	X3= Temp. (°C)
1	0	0	0	30	100	50
2	1	0	0	55	100	50
3	0,5	0,866	0	42,5	190	50
4	-0,5	0,866	0	17,5	190	50
5	-1	0	0	5	100	50
6	-0,5	-0,866	0	17,5	10	50
7	0,5	-0,866	0	42,5	10	50
8	-0,5	-0,289	-0,816	17,5	70	25
9	0	0,577	-0,816	30	160	25
10	0,5	-0,289	-0,816	42,5	70	25
11	-0,5	0,289	0,816	17,5	130	75
12	0	-0,577	0,816	30	40	75
13	0,5	0,289	0,816	42,5	130	75
14	0	0	0	30	100	50
15	0	0	0	30	100	50

En la figura 46 se observa la superficie de respuesta obtenida para el estudio. La deseabilidad total fue de 0,878 y las condiciones óptimas encontradas fueron: 5 min, 25°C y 60mM para tiempo, temperatura y concentración de NaHCO₃, respectivamente. Es de resaltar que nuevamente se mejoran las condiciones de derivatización con respecto a la literatura (tanto con DMIS como con cloruro de dansilo), evitando el uso de placas calefactoras y tiempos más largos para completar la derivatización. El uso de concentración de la base es de manejar con cuidado, exceso de sales en la fuente ESI disminuye considerablemente la capacidad de ionización, esto pudo ser corroborado con el estudio. Los resultados fueron evaluados en un amplio rango de concentraciones de los analitos (10-500 ng mL⁻¹) obteniendo linealidades mayores a 0,991. Además, se evaluó la repetibilidad (como %RSD) intra e interdiaria, encontrando resultados por debajo de 4 y 7 %, respectivamente.

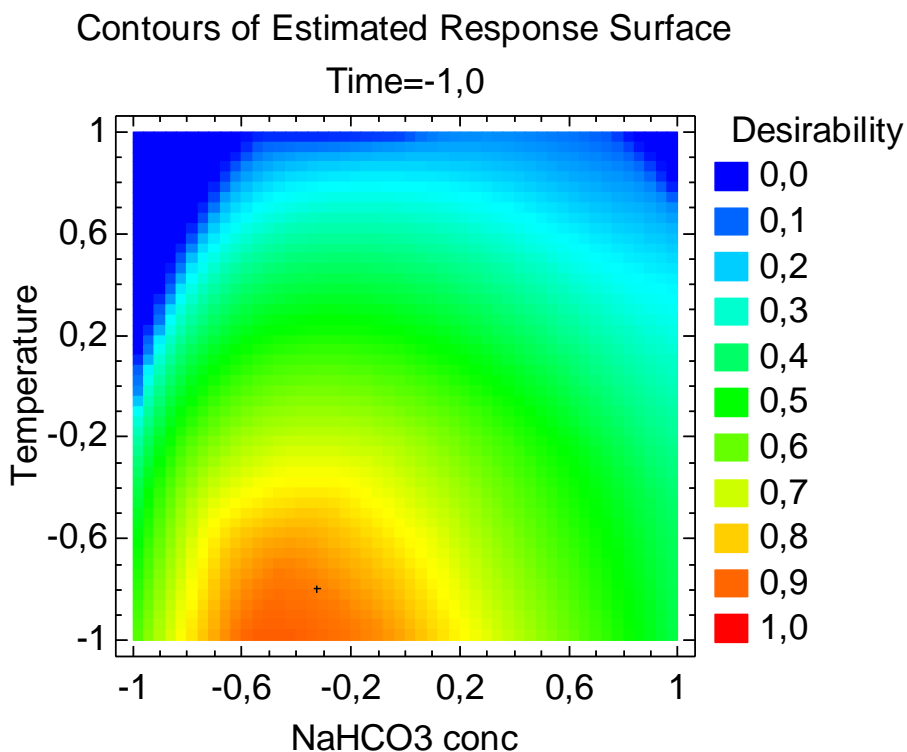


Figura 46. Superficie de respuesta estimada de la derivatización de hormonas sexuales y TCS usando DMIS/NaHCO₃

5.3.2.7 Estudios de extracción de analitos desde muestras de suero usando dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) asistida por vórtex (VA)

Considerando el acceso restringido a grandes volúmenes de muestra (de una rata adulta se pueden extraer aproximadamente 1-1,5 mL de sangre en total) se consideraron posibles técnicas de extracción. De todas las alternativas, primero se ensayó con la extracción líquido-sólido, pero luego se decidió mejorar la estrategia analítica a través de la técnica de dispersión de matriz en fase sólida (MSPD). Otras técnicas usadas previamente, como RDSE, está condicionada a un volumen de muestra mínimo de 15 mL para que el disco rotatorio gire adecuadamente, de todas maneras, se hicieron algunos ensayos diluyendo la muestra en agua, pero los resultados no fueron satisfactorios (datos no mostrados).

A diferencia de RSDE, la técnica MSPD es una técnica de extracción exhaustiva, en la cual la extracción de los analitos está condicionada por la interrupción de la matriz en la fase dispersante y en la posterior afinidad de los analitos en el solvente usado para su desorción. En cuanto al procedimiento propiamente, se podrían mencionar algunas desventajas del método que tradicionalmente se encuentra reportado:

- i) El primer paso se trata de la dispersión de la matriz en una fase sólida, para ello se usan morteros con los cuáles se hace la interrupción mecánica de la matriz manualmente, es decir, a través de la presión o fuerza que se ejerce en el mezclado. El principal problema asociado es la posible pérdida de muestra durante este paso, trasvasar el 100% de la muestra al cartucho no se puede garantizar. Si además consideramos que en algunas muestras sólo se tienen disponibles pequeños volúmenes (entre 100 y 300 μL), aumentaría más aún la incertidumbre del proceso.

- ii) El siguiente paso es añadir la muestra dispersada en un cartucho de SPE y eluir los analitos usando solventes de distinta naturaleza. Este paso es muy semejante a SPE, por ello es necesario que el empaquetado en la columna se realice correctamente, de no ser así la elución uniforme de los analitos no se

puede asegurar, lo que conlleva una inadecuada separación de analitos e interferentes. Si además se considera que las muestras biológicas como sangre o tejidos contienen alto contenido de proteínas, una precipitación de ellas puede ocurrir durante la elución con solventes orgánicos lo que podría interferir en la separación y taponar la columna.

Es importante considerar que esta técnica se ha empleado principalmente en muestras sólidas como alimentos y tejidos biológicos, y en otros casos para líquidos viscosos como aceites, en nuestro caso se consideraron dos alternativas de trabajo, uno de ellos considerando la liofilización de las muestras de suero y en otro usando directamente el suero en su forma líquida. En estudios preliminares se encontró que el paso de liofilización no es recomendable ya que los analitos se perdían durante este proceso, por ende se decidió hacer todos los estudios directamente con la muestra líquida en su forma original. Para el correcto desarrollo de la metodología se estudiaron las siguientes etapas: selección y cantidad de fase dispersiva, selección y volumen de solvente de desorción de los analitos y finalmente el volumen de suero de acuerdo con la disponibilidad de muestra.

En MSPD es común utilizar solventes orgánicos afines con la cromatografía líquida como el acetonitrilo y metanol para la elución de analitos. Con el uso de estos solventes orgánicos ocurre la precipitación de proteínas y péptidos (por disminución de su solubilidad) en las muestras de suero. Esto fue beneficioso para el análisis de hormonas sexuales y TCS, pero no fue adecuado para el péptido Kiss-10. Los péptidos/proteínas se suelen trabajar usando soluciones acuosas (ácidas o básicas según el caso) que permitan su extracción/elución a través de intercambio iónico.

Consideraciones preliminares

Se usó como referencia para el desarrollo del método las hormonas Test y Prog. Es por ello que, en los siguientes resultados de optimización, sólo se muestran resultados asociados a ellas. Además, Kiss-10 tampoco se incluye en el estudio porque no fue detectado en el UHPLC-ToF/MS con este método de extracción. Esto era de esperarse tomando en cuenta que la fase C18 no es afín a compuestos tan

polares como los péptidos y proteínas, además que con el uso de solventes orgánicos lo más probable que este analito haya precipitado. Para este analito se considerarán otras estrategias analíticas que serán discutidas posteriormente. Más adelante se probará la metodología basada en MSPD considerando E2 y TCS (con derivatización), con los pasos ya optimizados y se calcularán las figuras de mérito asociadas para los 4 analitos. Es de considerar que, por la similitud entre los analitos y la afinidad tanto con la fase dispersiva como con el solvente de desorción, se infiere que se comportarán similarmente a Test y Prog.

Para todos los estudios de optimización las muestras de suero se doparon con un multiestándar de los analitos a una concentración de 10 ng mL⁻¹. Los tiempos de agitación en vórtex de 5 min para la dispersión y 10 min para la elución fueron tomados de la literatura para métodos similares.

Estudio de selección de Fase Dispersiva

Se evaluó el efecto de las siguientes fases: sílica gel, C18 (sílica modificada con grupos octadecil) y PSA (amina secundaria y primaria). Se realizaron los experimentos con 10 mg de cada fase dispersiva y 200 µL de suero dopado en tubos eppendorf. Además, se comparó el efecto en ausencia de las fases dispersivas. En la Tabla 29 se muestran los resultados del estudio. La fase C18 mostró las mejores recuperaciones de los analitos y la fase sílica gel por su parte fue la más desfavorable para el estudio, disminuyendo la eficiencia de extracción.

Tabla 29. % Recuperación encontrados con el uso de distintas fases dispersivas para MSPD.

Analito	Sin Fase dispersiva	C18	PSA	Sílica
Test	83 ± 10	88 ± 6	77 ± 4	63 ± 5
Prog	66 ± 7	97 ± 8	90 ± 1	79 ± 1
Test- ³ C ₁₃	82 ± 9	98 ± 7	83 ± 1	65 ± 3

Estudio de cantidad de Fase Dispersiva

Un parámetro adicional por considerar es la cantidad de fase dispersiva, ya que poca cantidad no será suficiente para la completa dispersión de la matriz y, por otro lado, un exceso podría ocasionar interferencias al impedir el acercamiento del solvente orgánico a los analitos de interés durante la elución. Para ello se realizó el estudio añadiendo distintas cantidades de fase dispersiva: 0, 10, 20, 50 y 100 mg. Se añadieron 150 μ L de suero dopado y la elución se hizo en 1 mL ACN. En la figura 47 se muestran los resultados, donde se observa que efectivamente la presencia de la fase C18 tiene un efecto positivo en la respuesta de los analitos, principalmente para la Prog. Además, también es de destacar que un exceso de la fase no es conveniente para la dispersión de la matriz (mayor a 50 mg las señales empiezan a decaer). De acuerdo con este resultado, 20 mg de C18 es la cantidad óptima para la metodología MSPD aplicada a suero de ratas.

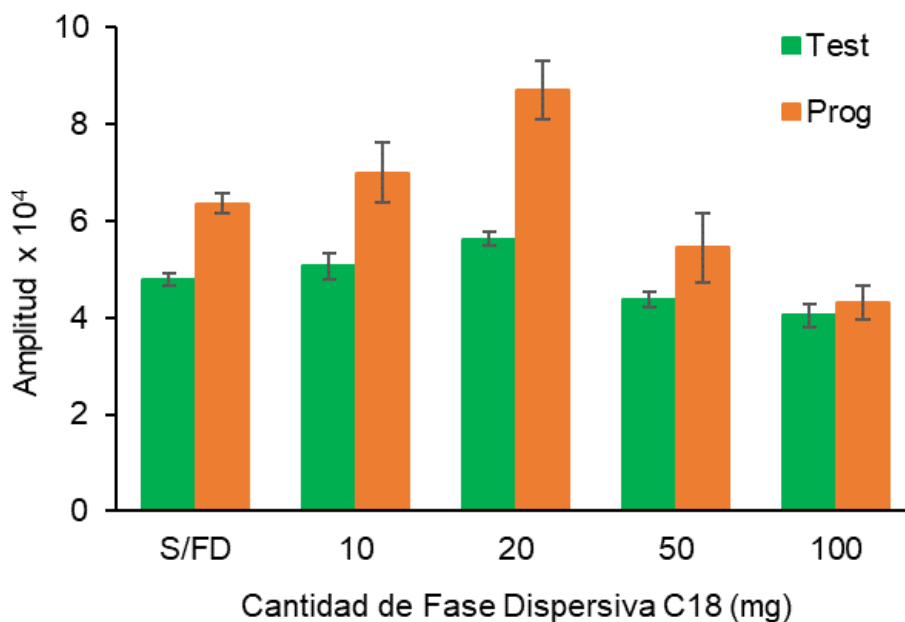


Figura 47. Estudio de cantidad de fase dispersiva C18 utilizada en MSPD para determinar Test y Prog en muestras de suero

Es de destacar que a pesar de observar en la Figura 47 que el efecto por la presencia de la fase no es muy significativo, al momento de evaluar una muestra real (no dopada), sólo con la presencia de la fase dispersiva en el método se pudo

diferenciar entre la señal de la Prog y la señal/ruido del cromatograma. En ausencia de la fase, es decir, con una tradicional extracción líquido-sólido la Prog no era detectada.

Estudio de solvente para la elución de los analitos

Se realizaron experimentos para evaluar la elución de los analitos desde el suero de ratas previamente dispersados en la fase C18. Se evaluaron los solventes orgánicos: ACN, MeOH y AcOEt, incluyendo la mezcla ACN:AcOEt (1:1). En la Figura 48 se muestran los resultados del estudio, donde la mayor respuesta cromatográfica asociada a los analitos se encuentra con ACN. Esto es concordante con el hecho que este solvente orgánico es comúnmente utilizado para la precipitación de proteínas en muchos trabajos de la literatura.

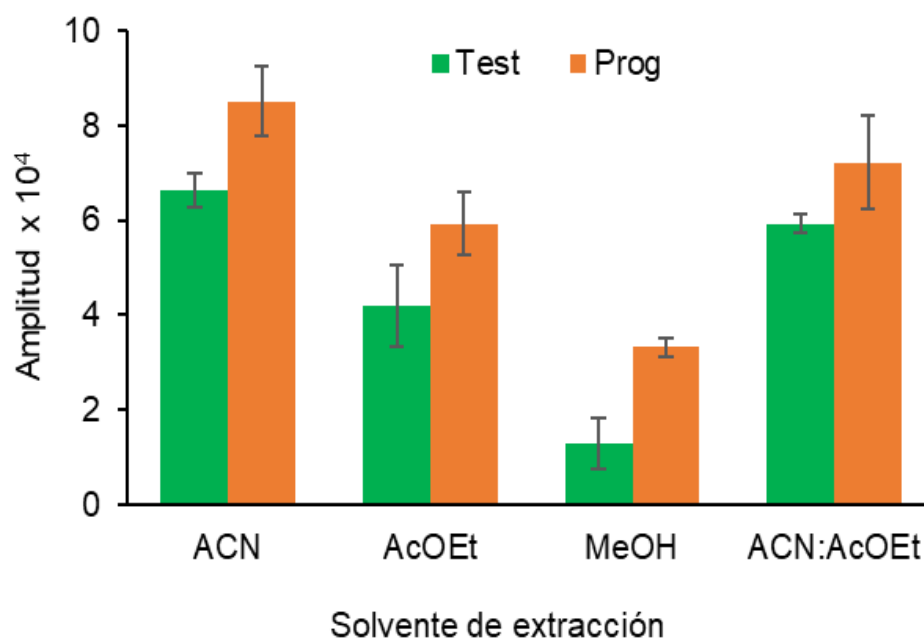


Figura 48. Estudio del solvente de elución para la separación de Test y Prog desde muestras de suero con fase C18

Esto fue sustentado al ver los precipitados formados en presencia de los distintos solventes orgánicos. Se pudo observar que la apariencia y textura no era igual al variar el solvente orgánico (Figura 49).

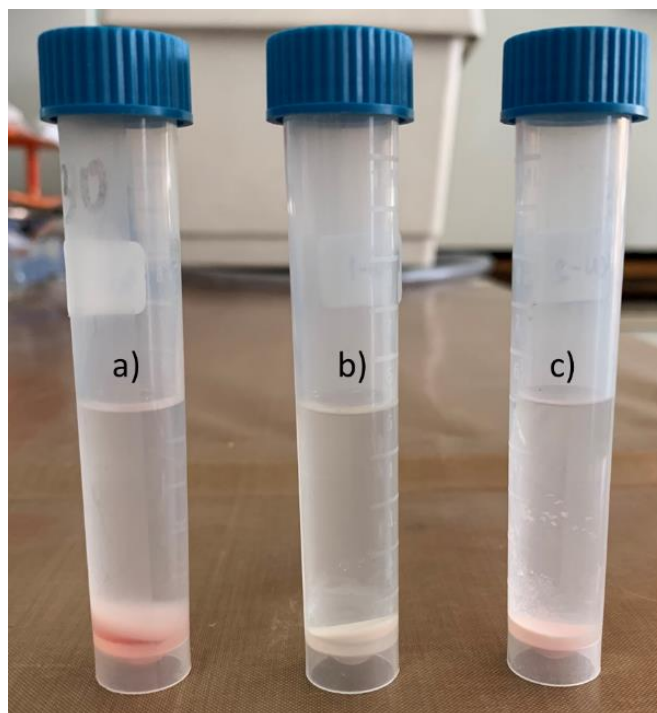


Figura 49. Precipitación de proteínas en distintos solventes orgánicos a) AcOEt, b) MeOH y c) ACN

Este resultado podría indicar que distintas especies estarían precipitando de acuerdo con el solvente utilizado. Por ejemplo, se observa que con MeOH (b) el precipitado es blanco mientras que para los demás es rosa tenue. Además, el precipitado con ACN (c) es completamente sólido, mientras que con AcOEt (a) el precipitado tiene aspecto más coloidal y no se asienta completamente.

Estudio de volumen de solvente para elución de los analitos

Una vez encontrado el solvente óptimo de trabajo, se hizo necesario el estudio de distintos volúmenes de solvente para garantizar la mayor elución de analitos y la completa precipitación de proteínas simultáneamente. Por ello, a 200 μL de suero se le añadieron distintos volúmenes de ACN: 200, 500, 1000, 3000 y 5000 μL . Se encontró que a partir de 1000 μL la señal de los analitos se hace constante, lo que indica que bajo esta condición se ha extraído la mayor cantidad de analitos. Esto además se comprueba cuando se observa un precipitado coloidal con 200 y 500 μL de ACN, evidenciando que las proteínas no han precipitado por completo, lo que al parecer influye en el proceso de extracción. En la Figura 50 se muestran los resultados asociados a este ensayo.

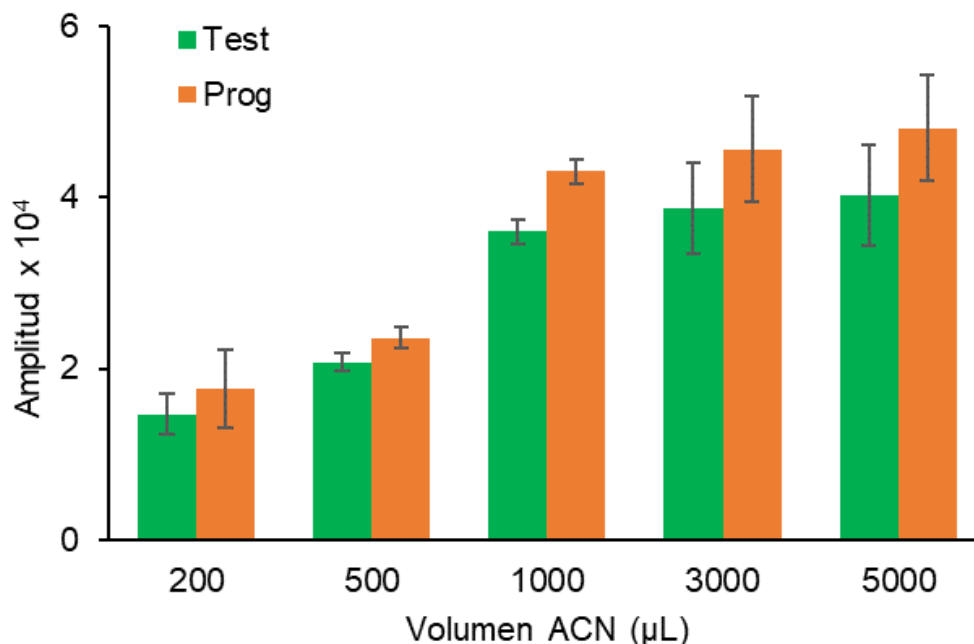


Figura 50. Estudio de volumen de ACN para la extracción de Test y Prog desde muestras de suero

Estudio de volumen de muestra de suero

Considerando el acceso limitado a grandes volúmenes de muestra, se evaluaron distintos volúmenes de suero, partiendo de las demás variables optimizadas, es decir, 20 mg de C18 para la dispersión de la muestra, 1000 µL de ACN para extraer analitos y precipitar proteínas, separación a través de ultracentrifugación a 7000 rpm, y finalmente medición por UHPLC-ToF/MS. Se consideraron volúmenes de suero de 150, 300, 450 y 600 µL sin dopar. La Prog fue considerada de modelo para este experimento por encontrarse en mayor concentración y por ende ser fácilmente detectada con menor cantidad de muestra. En la figura 51 se muestran los resultados, donde lo más importante a destacar es la pérdida de la extracción lineal de analitos al aumentar de 450 a 600 µL de suero. Esto se explica al considerar que la cantidad de ACN empleada es insuficiente para garantizar la completa precipitación de proteínas, las cuales interfieren en la respuesta de los analitos. Otros autores han sugerido que para garantizar la completa precipitación de proteínas, se deben usar alrededor de 3 veces la cantidad de solvente orgánico por cada volumen de plasma o suero [127]. Se seleccionó 150 µL debido al poco volumen de muestras reales a las cuáles se tuvo acceso y porque

los experimentos idealmente debían realizarse en tubos eppendorf con capacidad máxima de 1,2 mL (buscando la miniaturización del proceso).

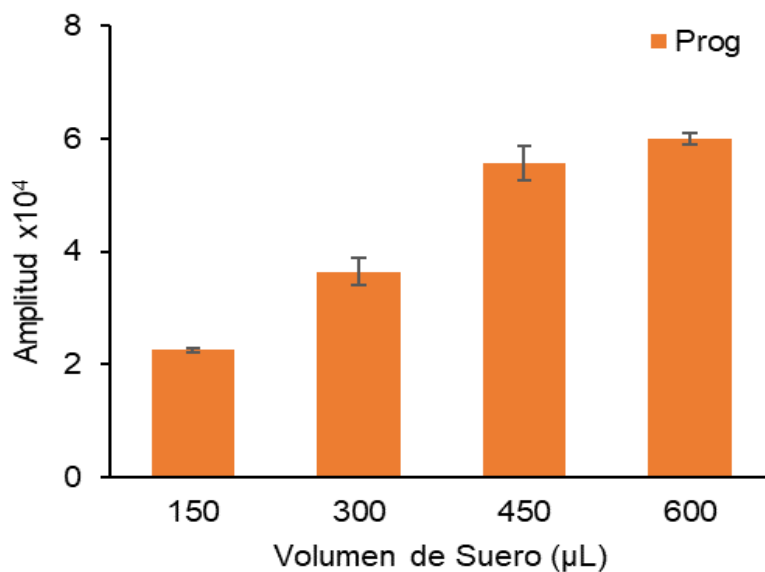


Figura 51. Estudio de volumen de suero para MSPD aplicado a muestras reales

Multi-análisis de muestras de suero

Entre las mejoras asociadas a la metodología se puede mencionar la rapidez del análisis de muestras. Si se considera que para los procesos de dispersión, extracción y centrifugación se utilizan dispositivos que permiten el tratamiento de 8 muestras al mismo tiempo, y si además consideramos que el análisis cromatográfico por UHPLC es de tan sólo 5 min, en promedio el procesamiento de ellas se hace un total de 81 min, es decir, 10 minutos aprox. por muestra. Esto es una mejora sustancial con respecto a metodologías reportadas del mismo tipo, si consideramos que solo para la dispersión de muestra en morteros y carga/elución en cartuchos se podría tardar 20 min o más por cada muestra, esto sin incluir los demás pasos adicionales.

Finalmente, a manera de resumen, en la Figura 52 se muestra un esquema ilustrado de la metodología propuesta para muestras de suero de ratas basado en la dispersión en matriz en fase sólida asistida por vórtex (VA-MSPD), cromatografía líquida de ultra eficiencia (UHPLC) y espectrometría de masas de alta resolución a través de un analizador de tiempo de vuelo (ToF/MS).



Figura 52. Diagrama gráfico de la estrategia analítica propuesta MSPD-UHPLC-ESI-ToF/MS para muestras de suero de ratas

5.3.2.8 Cifras de mérito de la metodología propuesta para muestras de suero

Una vez establecida la metodología propuesta es necesario determinar las cifras de mérito asociadas. En primer lugar, para determinar el efecto matriz se realizó una comparación entre las curvas de calibrado en suero y solvente orgánico. Además se comparó con una curva obviando el paso de dispersión de la matriz en C18 y siguiendo los demás pasos. En la figura 53 se muestra la comparación de las curvas obtenidas para la Prog, es relevante mencionar el aumento de la pendiente al usar la fase dispersiva en la metodología (línea azul) con respecto a la curva en ausencia de ésta (roja), esto indica la disminución del efecto matriz por la dispersión de la muestra. La ganancia en sensibilidad usando la fase dispersiva justifica el gasto de la fase C18. De todas maneras la pendiente de la curva en solvente (amarilla) sigue siendo mucho mayor, lo cual es de esperarse si se considera la ausencia absoluta de la matriz. Una vez evaluado el efecto que tiene el uso de la fase dispersiva en el método, se calcularon las figuras de mérito asociadas.

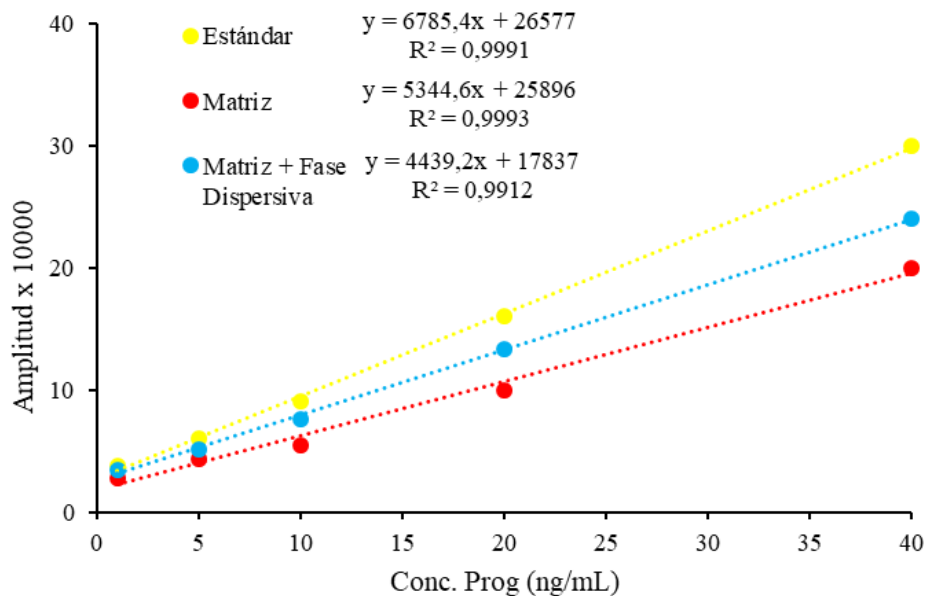


Figura 53. Curvas de calibración obtenidas para la Prog (1 - 40 ng mL⁻¹) en presencia y ausencia de la matriz suero y de la fase dispersiva.

Tabla 30. Cifras de mérito asociadas al método propuesto para las muestras de suero

Analito	Sensibilidad (mL ng ⁻¹)	Linealidad (R ²)	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)	%Re	% RSD (n=6)	%EM
Prog	5345	0,9993	1,1	3,6	97	8	-42
Test	3811	0,9986	1,8	5,9	88	6	-53

5.3.3 Conclusión

Se desarrolló un método basado en UHPLC-ToF/MS para la separación, identificación y cuantificación de Test, Pros, E2 y TCS en muestras de suero. Un método de extracción basado en la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) asistido por vórtex fue utilizado exitosamente para separar hormonas sexuales y TCS desde muestras de suero. La fase sorbente C18 fue usada como fase dispersiva, por presentar las mejores recuperaciones de los analitos. La Kiss-10 no pudo ser cuantificada por este método por dos posibles razones: la precipitación del péptido en presencia del solvente de elución (ACN) o por la baja sensibilidad del equipo LC-MS al momento de los estudios de optimización. El método será puesto en práctica en muestras de suero reales provenientes de ratas que han sido expuestas a una solución de TCS por 28 días (siguiente objetivo).

5.4. Objetivo 4: Evaluación de posible correlación existente entre la exposición a EDCs y el sistema kisspeptina/hormonas sexuales. Efecto de la administración oral de TCS en la función reproductiva en ratas hembras.

Se realizó un estudio *in vivo*, utilizando ratas *Sprague-Dawley*. Este estudio fue asistido y realizado en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Se cuenta con personal calificado de alto nivel (veterinarios y bioquímicos) que garantizan la correcta ejecución del trabajo experimental. Además, cuenta con el protocolo de uso y cuidados de animales aprobado por la Comité Institucional de Uso y Cuidados de animales (CICUA), N° 18143-CYQ-UCH de la Universidad de Chile.

5.4.1 Metodología paso a paso

1. Se adquirieron un total de 14 ratas hembras mantenidas en jaulas de grupo de 3 o 4 animales (Figura 54). Se registró su crecimiento a través del control de peso y la ciclicidad estral por 14 días antes del estudio (2-3 ciclos estrales) para determinar la funcionalidad ovárica ya que el ciclo estral se relaciona directamente con el nivel de secreción de hormonas esteroidales.



Figura 54. Fotos de ratas sometidas al estudio en grupos de 3 o 4 animales por caja con ciclo de luz oscuridad controlada (12 h luz, 12 h oscuridad) y con agua y alimento libre de soya ad libitum (Animal Care ACWS, USA).

Después de los 14 días, una de las ratas no tenía un ciclo estral regular y por ende no fue considerada para el estudio, quedando el grupo de ratas tratadas con TCS en n=7 y las controles tratadas con el vehículo con n=6.

2. Se planificó el estudio de exposición a triclosán por un total de 28 días (5 ciclos estrales aprox.). Para ello, se administró una solución de TCS de 50mg/kg/día ratas diariamente y de la solución vehículo (a las 6 ratas control restantes). Las soluciones fueron preparadas de la siguiente manera:

Vehículo: Aceite de sésamo con 0,5% de DMSO (El DMSO favorece el proceso de penetración en la membrana celular y permite la disolución de moléculas hidrófobas debido a su naturaleza anfipática).

TCS (50mg/kg/día):

- Si una rata en promedio pesa inicialmente: 0,25 kg
- Por ende, se le debe suministrar por día: 12,5 mg
- Volumen por suministrar de solución a cada rata: 200 μ L
- La [TCS] en la solución a preparar es de: 62,5 mg/mL
- La [DMSO] que debe estar presente: 0,5 %
- Preparar la solución en aceite de sésamo (se debe agitar unos 10 min en vórtex para garantizar la completa solubilización del TCS).

3. Diariamente se les proporcionaba a cada rata 200 μ L (o un poco más a medida que fueron creciendo) de la solución de TCS y a las ratas control la misma cantidad del vehículo. Esto se realizaba aproximadamente entre las 8:00 a 8:30 horas de la mañana, garantizando así tenerlas en la misma etapa de su ciclo estral.

4. Para suministrar la solución fue utilizada una sonda orogástrica para evitar que el animal devuelva la solución y de esta forma asegurar que toda la dosis llega al estómago. Vale acotar que este paso inicialmente fue muy complicado, ya que se debe inmovilizar la rata, abrir la boca, con cuidado introducir la sonda por su garganta y cuando se esté al alcance de su estómago depositar la solución. Una vez pasados unos días, las ratas se acostumbran al proceso de administración y no generan resistencia. Para este procedimiento al menos se necesitan de 2

personas especializadas para suministrar la dosis. En la figura 55 se muestran fotografías donde se aprecia la sonda y el procedimiento.



Figura 55. Fotos del suministro de dosis de TCS y vehículo a las ratas de laboratorio. La posición vertical y de la cabeza levemente inclinada hacia atrás es importante para permitir el paso de la sonda orgástrica hacia el estómago.

5. Diariamente se registró el ciclo estral (proestro, estro, metaestro/diestro) en el que se encontraba cada rata, a través de una muestra del frotis vaginal observada al microscopio óptico. La composición celular del epitelio vaginal cambia según el nivel de hormonas esteroidales secretada por el ovario. En la Figura 56 se muestra las células representativas de cada ciclo estral, indicando que las células nucleadas y redondas (epiteliales) son marcadoras de proestro y las células cornificadas o escamosas (se desprenden del epitelio) son del estro. El paso de proestro a estro se relaciona con el proceso de ovulación. Además, el peso de las ratas fue registrado diariamente para el control del crecimiento.

6. Una vez transcurrido el tiempo de administración de TCS, las ratas fueron sacrificadas a través de decapitación y en el mismo proceso se colectó la sangre (entre 1-1,5 mL) para la obtención de suero. Para la obtención del suero, la sangre

fue centrifugada a 3000 rpm por 5 min. El suero extraído se alícuotó en diferentes tubos eppendorf y fueron almacenados a -80°C hasta realizar los análisis respectivos. Las muestras de suero fueron analizadas dentro de los 30 días siguientes de este proceso.

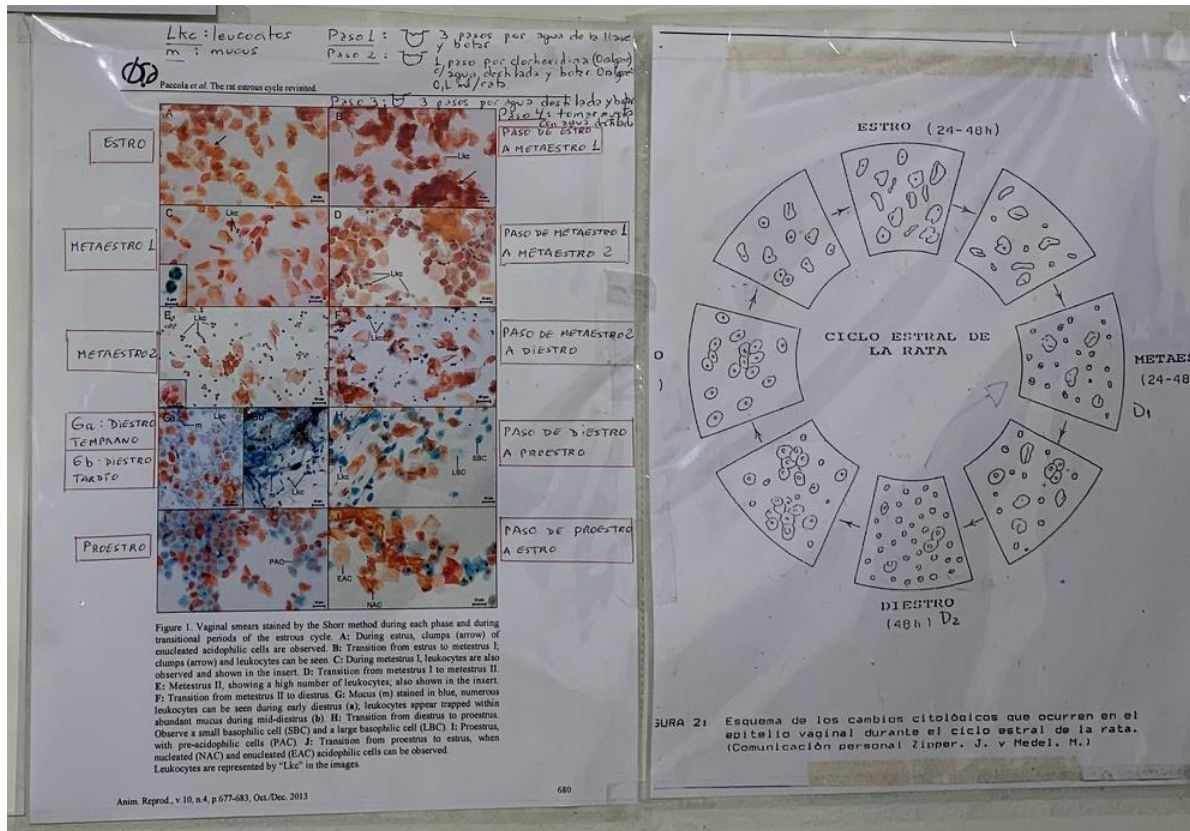


Figura 56. Células características de las 4 etapas del ciclo estral. La microfotografía de la izquierda representa las células tenidas con hematoxilina-eosina. La fotografía de la derecha representa un esquema de la forma de tipos celulares encontradas en el frotis. Un ciclo estral en las ratas dura 4 días y los diferentes tipos celulares correlacionan con los cambios en la variación de los niveles hormonales secretados por el ovario, indicando de alguna forma la funcionalidad de la gónada.

7. Las hormonas sexuales fueron determinadas usando el método previamente optimizado mediante MSPD-UHPLC-ToF/MS y mediante kit comerciales de EIA-ELISA para progesterona, testosterona y estradiol (ALPCO, SA). La kisspeptina-10 será determinada mediante el inmunoensayo comercial marca Phoenix Pharmaceutical. Para el análisis estadístico de los datos, se utilizaron los softwares profesionales GraphPad Prism 8.4.2 y Statgraphics Centurion XV.

5.4.2 Resultados y Discusión

5.4.2.1 Pesos de las ratas

Durante todo el estudio se registró el peso de las ratas diariamente para determinar posibles alteraciones por la exposición a la solución de TCS con respecto a las ratas control. En la figura 57-A se muestran los resultados del registro de pesos de cada rata bajo estudio que fue expuesta a la solución vehículo. Por su parte, en la figura 57-B, se observa las variaciones de pesos de las ratas a las que fue administrada la solución de TCS de 50 mg/kg/día. En los gráficos, se puede observar que en las ratas control (expuestas al vehículo) y las tratadas con TCS tienen un aumento regular y ascendente de su peso. Sin embargo, es de notar la diferencia de pendientes en ambos grupos de ratas, las mayores pendientes en las curvas de crecimiento de las ratas control indicarían que tienen mayor ganancia diaria de peso que las expuestas a TCS.

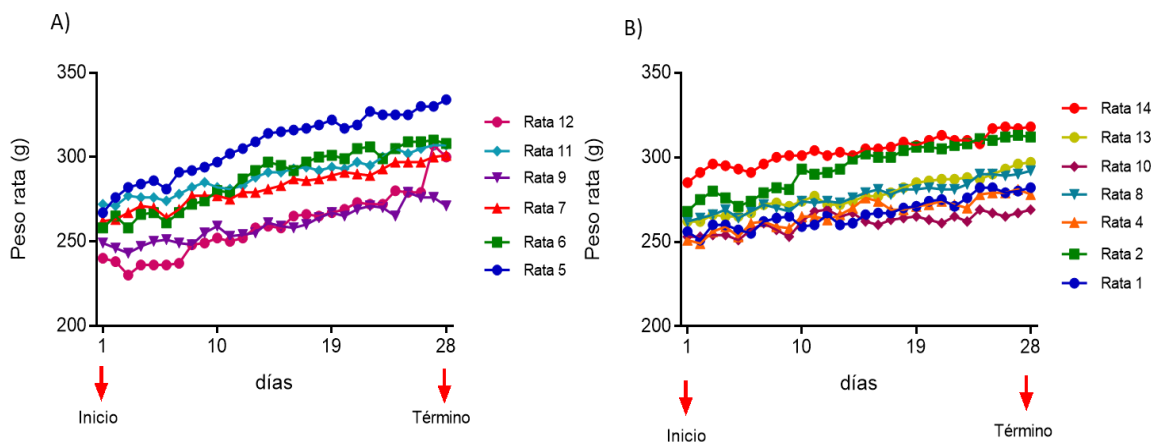


Figura 57. Registro diario del peso de cada rata expuesta a: A) solución vehículo y B) solución de TCS (50 mg/kg/día) durante los 28 días de tratamiento.

Para analizar mejor los resultados previos, en la Figura 58 se muestra el consolidado de registro de pesos de ambos grupos de ratas. Para ello se promediaron los pesos de todas las ratas por día y fueron graficadas considerando su respectivo error (\pm SEM), el cual considera las diferencias de pesos naturales entre ellas. Se puede observar que a partir de la mitad del estudio (día 14 aprox.) empieza a notarse un aumento de la media de los pesos de las ratas control (en verde) y las ratas expuestas a TCS (en azul), la cual sigue aumentando hasta

terminar el estudio. Se hizo una prueba estadística *test-t* no pareada al 95% de confianza para comparar los pesos de las ratas TCS vs. control en los últimos 5 días del estudio, sin embargo, no se encontró diferencia significativa entre los resultados de ninguno de los días testeados ($p\text{-value}>0,05$ en todos los casos). Es de resaltar que, si el estudio se hubiese extendido el doble del tiempo y considerando la tendencia actual de los datos, dado por el cambio de pendiente, se presume que se hubiese encontrado diferencia significativa.

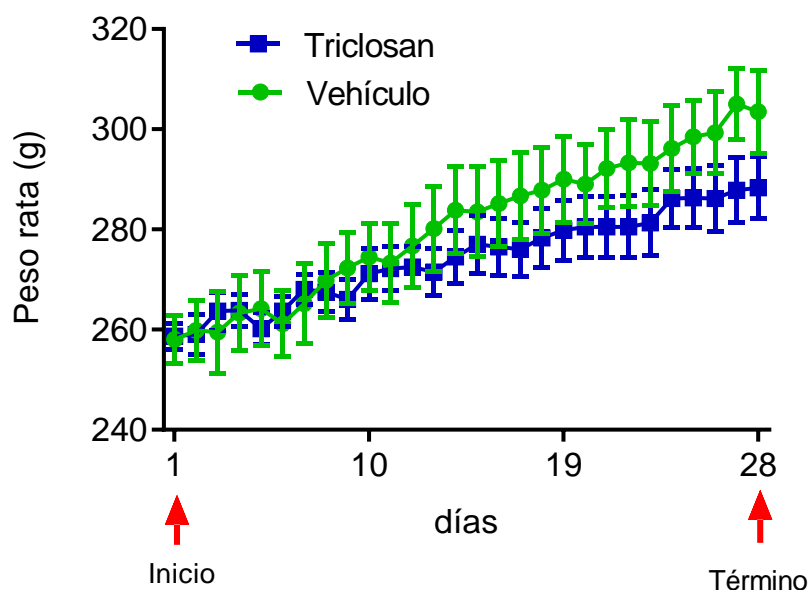


Figura 58. Registro promedio del peso (gramos) \pm SEM de las ratas control y expuestas a TCS.

Finalmente, en la Figura 59 se muestra una comparación entre la ganancia de peso promedio del total de ambos grupos de ratas al finalizar el estudio. Las ratas control en promedio aumentaron 44,5 g, mientras que las ratas expuestas a TCS ganaron 27,8 g, es decir, las ratas control ganaron aprox. 18 g más de peso que las ratas expuestas a TCS. Se utilizó el estadístico *test-t* no pareada al 95% entre ambos grupos de ratas, encontrando diferencia significativa entre las medias de los pesos totales ($p\text{-value}<0,05$). Esto indica que efectivamente hubo un efecto negativo en el crecimiento de las ratas bajo estudio por la exposición a TCS, pero que sólo pudo ser comprobado estadísticamente al comparar las ganancias de pesos totales promedios de todas las ratas por cada grupo. Se recomienda hacer el estudio de exposición a EDCs en al menos el doble de tiempo del evaluado en este estudio, de

esta manera se podría verificar con mayor veracidad las alteraciones fisiológicas presentes.

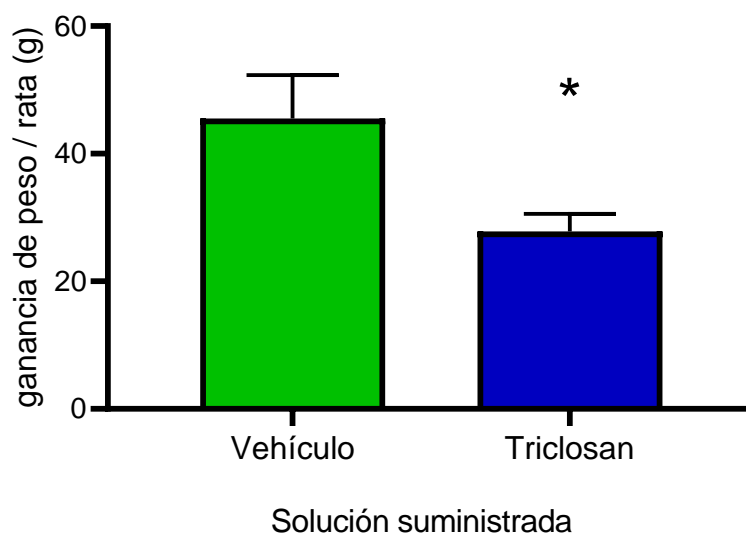


Figura 59. Ganancia de peso (g) de las ratas sometidas a dosis de TCS y solución vehículo. La barra representa el peso promedio total ganado \pm SEM por cada grupo de ratas al término del tratamiento. $n=6$ en cada condición experimental. (*) indica diferencia significativa, $p\text{-value}<0,05$.

5.4.2.2 Ciclo estral

Considerando los antecedentes del TCS como disruptor endocrino, se determinó el ciclo estral de las ratas durante los 28 días que duró el estudio. En las Figuras 60 y 61 se muestran los cambios producidos en las ratas control y las expuestas a TCS desde los días previos al estudio (14 días) y durante el tratamiento. En color rojo y con línea discontinúa se indica el día de inicio y término del tratamiento. Para cada rata las distintas etapas del ciclo estral se denotan como P: Proestro; E: Estro; M/D: Metaestro/Diestro, un ciclo completo, contempla la secuencia o el paso de P a E, seguido de M/D. Los resultados indican que no hay una diferencia significativa en la ciclicidad estral de las ratas producto de la exposición a TCS comparada con las ratas vehículos, sin embargo, se observa que las ratas 1, 2 y 13 del estudio con TCS no alcanzan en dos oportunidades la fase proestro durante el tiempo que dura el tratamiento. Esto solo ocurre en una de las ratas control (número 7). Sin embargo, no existe una diferencia clara en el ciclo estral por la exposición a TCS.

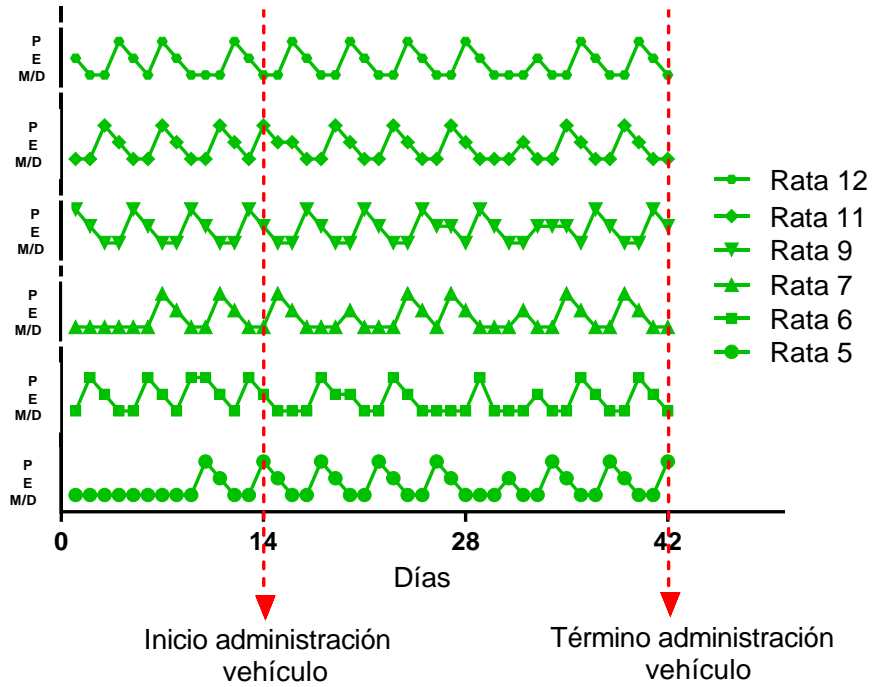


Figura 60. Registro del ciclo estral de las ratas del grupo control

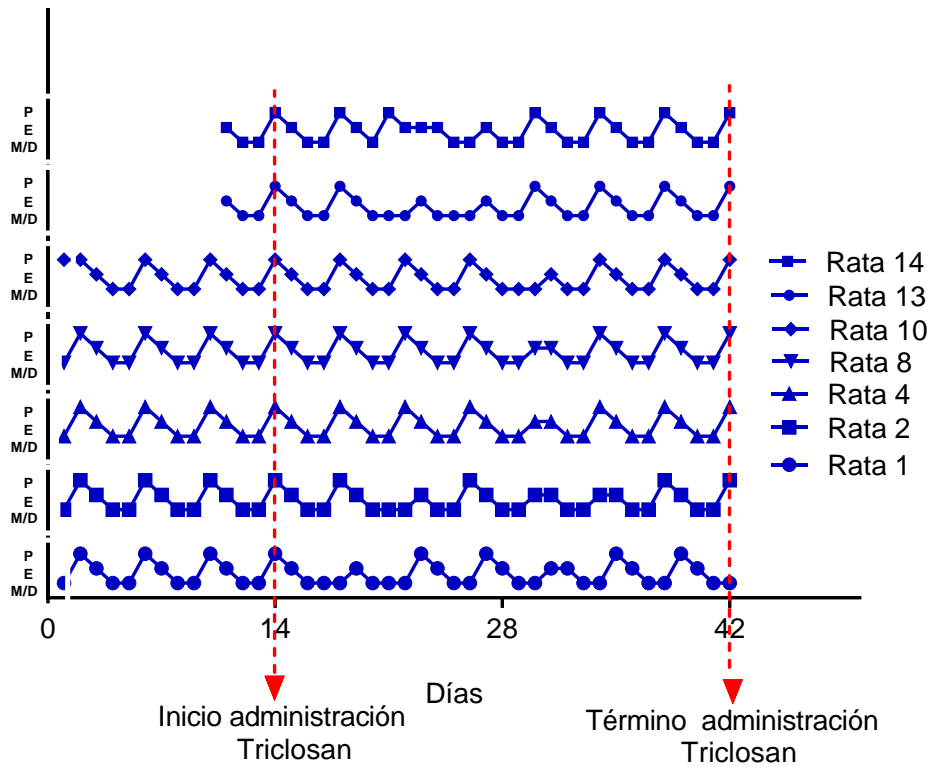


Figura 61. Registro del ciclo estral de las ratas del grupo tratado con triclosán.

Este último resultado es opuesto a lo encontrado en un estudio previo con exposición a TCS a 10 y 100 mg/kg/día en ratones hembras donde hubo alteraciones del ciclo estral encontrando permanencia seguida en la fase diestro entre 5, 7 y hasta de 12 días [5]. Es importante destacar que este estudio (publicado en 2019), fue por 50 días, encontrando las principales alteraciones del ciclo a partir del día 25. Esto es congruente con la recomendación del punto anterior, donde se sugiere extender la duración de este tipo de estudios en al menos el doble de tiempo para poder evidenciar mejor los posibles resultados significativos del estudio.

Para encontrar un posible efecto por la exposición a TCS, en la figura 62 se representan las duraciones de los ciclos en ambos grupos de ratas. No hubo diferencia observada en las duraciones de los ciclos. La mayoría de los ciclos duraron 4 días, en las ratas tratadas con TCS y vehículos, con poca presencia de duración de 3 y 5 días. Por ende, se concluye que no hay alteraciones significativas del ciclo estral de las ratas por la exposición a TCS a la dosis de 50 mg/kg/día en los 28 días del estudio.

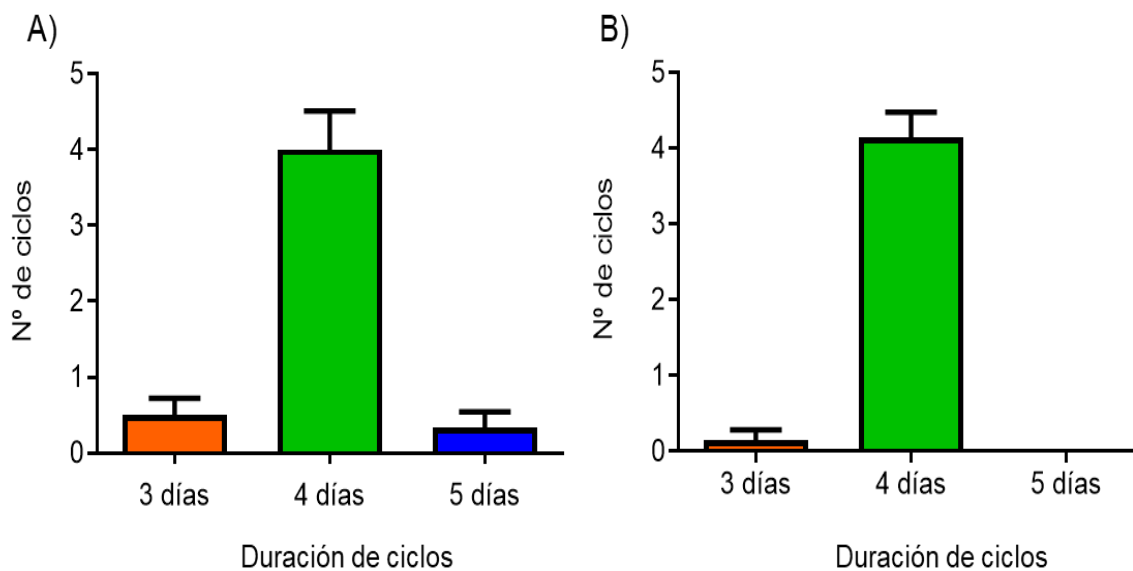


Figura 62. Número de ciclos de las ratas control (A) y ratas expuestas a TCS durante todo el estudio (B).

5.4.2.3 Niveles de hormonas sexuales y kisspeptina-10 en suero de ratas

Los sueros de ratas del estudio fueron analizados con la metodología diseñada previamente, basada en MSPD-UHPLC-ToF/MS. Para ello, se analizaron 150 μL de cada suero por duplicado. Además, se tomaron 150 μL de cada suero, se unieron en un mismo recipiente, se homogenizaron y desde esta nueva solución fueron tomados 150 μL para hacer cada punto de la curva de calibrado en matriz (*Matrix-matched Calibration*) por cada grupo de muestras (control y triclosán). La curva fue realizada entre 0,5 - 40 ng mL^{-1} . Es importante acotar que este método analítico fue el más idóneo tomando en cuenta la poca cantidad disponible de suero para el estudio (sólo 500 μL por cada rata), obviamente sin considerar los tradicionales inmunoensayos. Luego de la inyección en LC, la remanente de muestra fue analizada por el método GC-MS previamente optimizado. Este paso fue realizado debido a que el momento en que se hizo el estudio no se tenía disponibilidad del derivatizante DMIS para hacer la medición total de analitos por la misma instrumentación analítica.

Mediante el método por LC-MS, sólo fue posible cuantificar exitosamente Prog en el suero de ratas. En la Figura 63 se muestran los resultados por cada rata. Es de notar que existe una tendencia clara de concentraciones menores de Prog en las ratas expuestas a TCS (barras azules). Se hizo un procedimiento estadístico de comparación múltiple para discriminar qué promedios son significativamente diferentes de los demás al 95% de confianza conocida como diferencia menos significativa (*LSD*) de Fisher. Se identificaron 3 grupos homogéneos identificados como a, b y c, colocados en la parte superior de cada barra de la Figura. Esto indica que no hay una diferencia significativa entre las concentraciones intra-grupo (para las ratas control, marcadas con b y c, se encuentra una diferencia que puede ser explicada por condición natural de la ratas), pero sí existe una diferencia significativa inter-grupos control (b,c) y TCS(a). Esto evidencia el efecto adverso que tuvo la exposición al contaminante en los niveles de Prog.

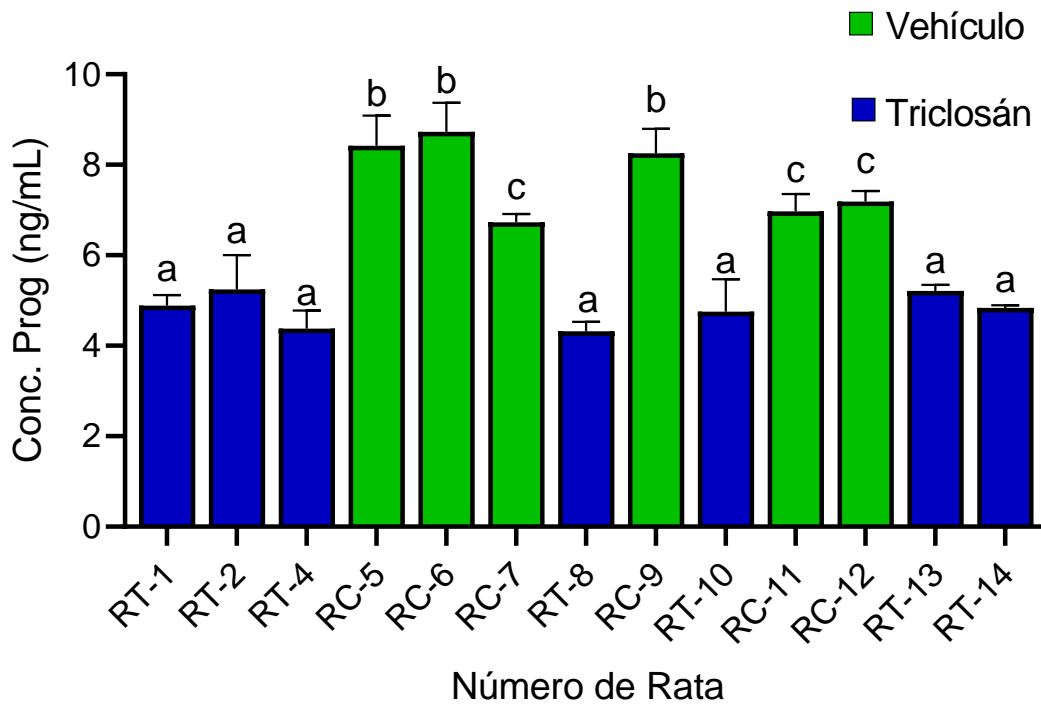


Figura 63. Representación de concentraciones promedio (en ng mL^{-1}) \pm SD de Prog en suero de ratas control y en ratas expuestas a TCS a 50 mg/kg/día mediante MSPD-UHPLC-ToF/MS (a, b y c se refieren a grupos homogéneos)

Las concentraciones de Prog promedio \pm SEM encontradas fueron: $7,7 \pm 0,3$ y $4,8 \pm 0,2 \text{ ng mL}^{-1}$ en ratas control y expuestas a TCS, respectivamente. Esto indica una disminución aproximada del 38% en la concentración de Prog tras la exposición a TCS. Este resultado preliminar permite predecir el efecto anti-progesténico de este compuesto al nivel de concentración ensayado (50 mg/kg/día). Debido al poco volumen de muestra disponible y la baja sensibilidad del equipo en el momento del estudio, las concentraciones de Test no pudieron ser cuantificadas por el método anterior.

Por el método por GC-MS pudo ser cuantificada la Test a los niveles de concentración a los cuáles se encuentra. Se encontraron concentraciones de Test promedio \pm SEM de $0,32 \pm 0,03$ y $0,23 \pm 0,02 \text{ ng mL}^{-1}$ para suero de ratas control y expuestas a TCS, respectivamente (disminución del 28%). Al hacer el estudio estadístico *test-t* al 95% de confianza se encontró diferencia significativa en ambas concentraciones de Test en el suero de ratas. Por lo tanto, un efecto anti-

androgénico fue encontrado por la exposición a TCS. En cuanto a la E2, esta no pudo ser cuantificada por estar en niveles de concentración muchos más bajos a los que permite la detección del método.

5.4.2.4 Comparación de los niveles de hormonas determinados mediante inmunoensayos (EIA)

Para contrastar los resultados de niveles de Prog y Test se usaron inmunoensayos enzimáticos (EIA) para la cuantificación. La Prog pudo ser cuantificada con éxito, en un rango de concentración similar al encontrado previamente por el método por LC-MS. Las concentraciones de Prog promedio \pm SEM por EIA fueron $8,8 \pm 1,4$ y $5,3 \pm 1,0$ ng mL⁻¹ para ratas control y expuestas a TCS, respectivamente. Estos resultados son comparados con los encontrados por el método analítico previo en la Figura 64.

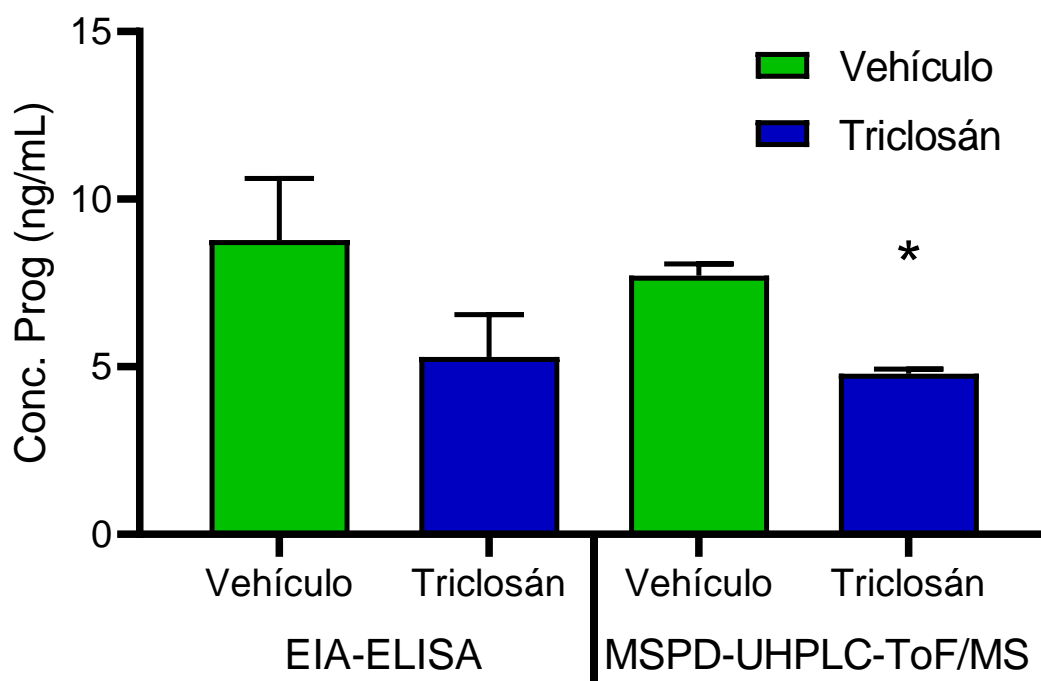


Figura 64. Comparación de Prog sérica en ratas control y TCS medidas por el método EIA y el método MSPD-UHPLC-ToF/MS. La barra representa el promedio \pm SEM. n=7 para la determinación por el método MSPD-UHPLC-ToF/MS y un n=7 para el método de EIA. (*) indica diferencia significativa, p-value<0,05

Del análisis de la Figura 64 se extrae lo siguiente:

- (i) Al hacer el estudio estadístico *test-t* no pareada al 95% de confianza entre los resultados encontrados por EIA para ambos grupos (control y TCS), a diferencia de MS, no se encontró diferencia significativa entre los promedios de Prog en suero ($p\text{-value}>0,05$), a pesar de tener valores promedios bien diferenciados. Esto es debido a la gran dispersión en las mediciones.
- (ii) Al hacer la misma prueba estadística anterior para comparar los métodos usados, es decir comparando las barras del mismo color de la Figura 64, se encontró que en los dos casos no hay diferencia significativa ($p\text{-value}>0,05$) entre las mediciones promedio de Prog para el mismo grupo de ratas por métodos diferentes.
- (iii) A diferencia del EIA, el método optimizado por MSPD-UHPLC-ToF/MS, fue capaz de diferenciar el efecto de exposición a TCS, encontrando diferencia significativa (a través del *test-t*) entre los promedios de ratas expuestas al vehículo y a la solución de TCS ($p\text{-value}<0,05$). Esto se debe principalmente a la identificación inequívoca propia del espectrómetro de masas de alta resolución. Es bien sabido que los inmunoensayos están condicionados a la posible reactividad cruzada o interferencia de antígenos similares, lo cual genera mayor incertidumbre en las mediciones. Lo que requiere necesariamente aumentar en número de muestras para alcanzar la significancia, por lo tanto, más animales para los estudios *in vivo*.

En otro trabajo previo de exposición a TCS en ratas hembras no encontraron diferencias significativas en los niveles de progesterona con respecto al de ratas control [128]. Las mediciones fueron realizadas a través de RIA. Así como fue observado en nuestro caso, la gran dispersión de las medidas reportadas hace que la estadística no encuentre diferencia significativa en los resultados, lo cual también revalida la problemática asociada al uso de inmunoensayos. Además, en ese trabajo la concentración máxima ensayada de TCS fue 8 mg/kg/día (inferior a la de nuestro estudio), lo cual también podría ser causa de la diferencia no significativa en los niveles de Prog luego de las dosis de TCS.

Por otro lado, las concentraciones de Test también fueron determinadas por EIA. Se encontraron concentraciones promedio \pm SEM de: $0,13 \pm 0,03$ ng mL⁻¹ y $0,10 \pm 0,03$ ng mL⁻¹ para ratas control y TCS, respectivamente. En la Figura 65, se comparan los resultados con los encontrados por el método de espectrometría de masas.

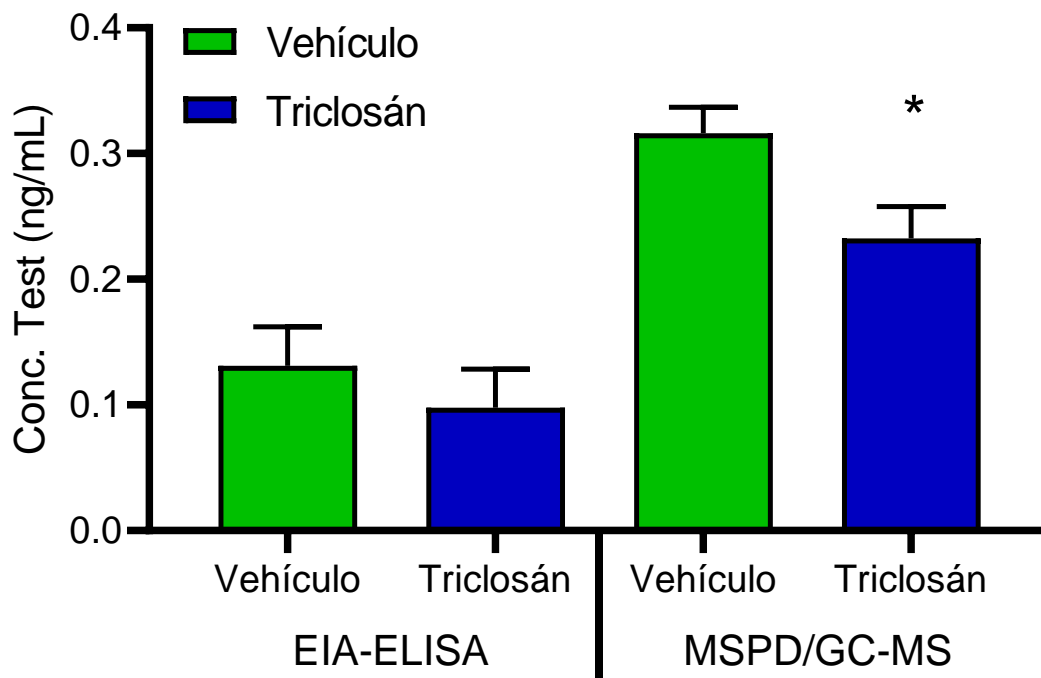


Figura 65. Comparación de Test sérica en ratas control y TCS medidas por el método EIA y el método MSPD-UHPLC-ToF/MS. La barra representa el promedio \pm SEM. n=7 para la determinación por el método MSPD-UHPLC-ToF/MS y un n=7 para el método de EIA. (*) indica diferencia significativa, p-value<0,05

A diferencia del caso de la Prog, en los niveles de Test sérica se encontraron concentraciones menores por el método EIA que las encontradas por la técnica GC-MS (alrededor de 70% menos), lo cual puede ser explicado por la falta de especificidad del EIA a bajas concentraciones o la baja resolución del cuadrupolo del espectrómetro de masas (ISQ). Nuevamente, por el EIA no se encontró variación significativa (p -value>0,05) por la exposición a TCS en los niveles de Test, lo cual es contrario a lo encontrado por el método basado en espectrometría de masas. Finalmente, la hormona E2 tampoco fue cuantificada por EIA, en este caso debido a no contar con stock en el laboratorio del kit comercial.

5.4.2.5 Niveles de kisspeptina-10 en muestras de suero de ratas

Para evaluar el efecto de la exposición a TCS en las ratas, los niveles de kisspeptina-10 séricos fueron determinados mediante el inmunoensayo enzimático comercial. Como ya se ha descrito, la kisspeptina en fluidos sanguíneos ha sido asociada a distintas patologías como hipogonadismo, alteraciones de ciclo menstrual, preclamsia, cáncer de mamas y ovarios, entre muchas otras. Lo cual indica que puede sufrir alteraciones al momento de una disrupción endocrina por algún agente exógeno.

5.4.3 Resumen del estudio de exposición de ratas a TCS

El estudio del peso de las ratas mostró una tendencia a la baja en el crecimiento de las ratas expuestas a TCS en comparación a las expuestas a la solución vehículo. Al hacer un estudio de las ganancias total de pesos de las ratas por grupos (TCS y vehículo) se encontró diferencia significativa (p -value <0,05) entre ambos grupos, encontrando que las ratas expuestas al disruptor endocrino aumentaron aproximadamente 18 gramos menos que las ratas control. Esto corrobora el efecto adverso del TCS en la función del crecimiento de las ratas evaluadas.

El estudio de ciclicidad estral no llega a ningún resultado concluyente en cuanto a alteraciones por la exposición a TCS. Se presume que estudios más largos de exposición podrían evidenciar un posible efecto negativo.

Se encontró una disminución del 38% en las concentraciones de progesterona sérica y del 28% en los niveles de testosterona sérica en las ratas expuestas a TCS al usar el método optimizado por MSPD-UHPLC-ToF/MS (p -value <0,05). A pesar de encontrar igualmente una disminución en las concentraciones de Prog y Test en el suero de ratas mediante EIA-ELISA desde el punto de vista de las medias aritméticas, no se encontró diferencia significativa al hacer el estudio estadístico en ambos grupos de muestras por el inmunoensayo (p -value > 0,05).

Se esperan resultados más concluyentes en la esteroidogénesis de las ratas al alargar los estudios de exposición a TCS, ya que aún no se encontraron

resultados claros en cuanto a alteraciones en la ciclicidad estral. De alguna manera el organismo de las ratas contrarresta el efecto por la exposición al disruptor endocrino, lo cuál puede ser similar a lo que realiza el cuerpo humano al estar expuesto a tantos contaminantes diariamente.

Se debe mencionar que la concentración de TCS a la cual fueron expuesta las ratas de 50 mg/kg/día o 50 ppm/día o 0,005%/día, es muy inferior a la concentración a la cual se encuentran normalmente este compuesto en productos antibacteriales o de cuidado personal (0,3-0,5%). Esto refuerza la decisión de muchos países al erradicar y prohibir el uso de triclosán en productos comerciales. Lamentablemente, aún en Chile se comercializan productos como talcos, cremas dentales y jabones antibacteriales con triclosán.

5.4.4 Conclusión

La metodología basada en espectrometría de masas de alta resolución para determinar esteroides es más exacta, sensible y reproducible que los inmunoensayos, lo que permitiría reducir el número de muestras por estudio.

El TCS afecta el metabolismo de las ratas y la esteroidogénesis, probablemente debido a su acción como disruptor endocrino.

6. REFERENCIAS

- [1] D. J. Handelsman, "Mass spectrometry, immunoassay and valid steroid measurements in reproductive medicine and science," *Hum. Reprod.*, vol. 32, no. 6, pp. 1147–1150, 2017.
- [2] C. Ohlsson *et al.*, "Comparisons of immunoassay and mass spectrometry measurements of serum estradiol levels and their influence on clinical association studies in men," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 98, no. 6, pp. 1097–1102, 2013.
- [3] F. Mitchell, "Reproductive endocrinology: Mass spectrometry 'gold standard' for measuring steroid sex hormones?," *Nat. Rev. Endocrinol.*, vol. 8, no. 6, p. 320, 2012.
- [4] T. Grzes and A. Zgoła-grzes, "Current approaches in sample preparation for trace analysis of selected endocrine-disrupting compounds: Focus on polychlorinated biphenyls , alkylphenols , and parabens," *Trends Anal. Chem.*, vol. 75, pp. 209–226, 2016.
- [5] X. Cao, X. Hua, J. Xiong, W. Zhu, J. Zhang, and L. Chen, "Impact of Triclosan on Female Reproduction through Reducing Thyroid Hormones to Suppress Hypothalamic Kisspeptin Neurons in Mice," *Front. Mol. Neurosci.*, vol. 11, no. January, pp. 1–12, 2018.
- [6] J. T. S. Kauff, Alexander S, *Kisspeptin Signaling in Reproductive Biology*. 2013.
- [7] M. Gurgel Teles, L. F. Gontijo Silveira, S. Bianco, and A. Claudia Latronico, "Human Diseases Associated with GPR54 Mutations," *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, vol. 88, no. C, pp. 33–56, 2009.
- [8] K. Strimbu and J. A. Tavel, "What are biomarkers?," *Current Opinion in HIV and AIDS*. 2010.
- [9] WHO, "Training for the Health Sector," *Biomarkers Hum. Biomonitoring*, pp. 1–35, 2011.

- [10] E. Fernández, "Toxicología en salud ocupacional," *Toxicol. En Salud Ocup. Toxicol.*, vol. 10, pp. 64–149, 2013.
- [11] K. Hoffman *et al.*, "Temporal Trends in Exposure to Organophosphate Flame Retardants in the United States," *Environ. Sci. Technol. Lett.*, vol. 4, no. 3, pp. 112–118, 2017.
- [12] C. S. Weickert, T. W. Weickert, A. Pillai, and P. F. Buckley, "Biomarkers in schizophrenia: A brief conceptual consideration," *Dis. Markers*, vol. 35, no. 1, pp. 3–9, 2013.
- [13] J. Davis, M. Maes, A. Andreazza, J. J. McGrath, S. J. Tye, and M. Berk, "Towards a classification of biomarkers of neuropsychiatric disease: From encompass to compass," *Mol. Psychiatry*, vol. 20, no. 2, pp. 152–153, 2015.
- [14] M. Emdin, S. Vittorini, C. Passino, and A. Clerico, "Old and new biomarkers of heart failure.," *Eur. J. Heart Fail.*, vol. 11, no. 4, pp. 331–5, 2009.
- [15] M. Berk, "The Classification of Biomarkers," *Psychiatry*, vol. 72, pp. 1056–1057, 2005.
- [16] A. M. Vicent Yusa, Xiaoyun Ye, Calafat, "Methods for the determination of biomarkers of exposure to emerging pollutants in human specimens," *Trends Anal. Chem*, vol. 38, pp. 129–142, 2012.
- [17] L. Denoroy, L. Zimmer, B. Renaud, and S. Parrot, "Ultra high performance liquid chromatography as a tool for the discovery and the analysis of biomarkers of diseases: A review," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 927, pp. 37–53, 2013.
- [18] F. Dieterle and E. Marrer, "New technologies around biomarkers and their interplay with drug development," *Anal Bioanal Chem*, vol. 390, no. 1, pp. 141–154, 2008.
- [19] G. Poste, "Bring on the biomarkers," *Nature*, vol. 469, no. 7329, pp. 156–157, 2011.

- [20] D. J. Calé, C. Zalazar, and G. Faraj, "Kisspeptinas: las protagonistas del eje gonadal," *Rev. SAEGRE*, vol. 18, no. 3, pp. 5–12, 2011.
- [21] J. K. Prague and W. S. Dhillon, "Potential clinical use of kisspeptin," *Neuroendocrinology*, vol. 102, no. 3, pp. 238–245, 2015.
- [22] F. Katagiri, M. Kotani, T. Hirai, and J. Kagawa, "The relationship between circulating kisspeptin and sexual hormones levels in healthy females," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 458, no. 3, pp. 663–666, 2015.
- [23] J. J. Logie *et al.*, "Evaluation of kisspeptin levels in obese pregnancy as a biomarker for pre-eclampsia," *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. 76, no. 6, pp. 887–893, 2012.
- [24] K. P. A. Czyzyk and T. S. B. Meczekalski, "New markers of insulin resistance in polycystic ovary syndrome," *J. Endocrinol. Invest.*, vol. 40, no. 1, pp. 1–8, 2017.
- [25] J. Dotterweich *et al.*, "The KISS1 Receptor as an In Vivo Microenvironment Imaging Biomarker of Multiple Myeloma Bone Disease," *PLoS One*, pp. 1–11, 2017.
- [26] A. N. Comninou *et al.*, "Kisspeptin modulates sexual and emotional brain processing in humans," *J. Clin. Invest.*, vol. 127, no. 2, pp. 709–719, 2017.
- [27] F. Cao *et al.*, "Expression of preoperative KISS1 gene in tumor tissue with epithelial ovarian cancer and its prognostic value," *Medicine (Baltimore)*, vol. 95, no. 46, pp. 1–4, 2016.
- [28] H. B. Patisaul, "Kisspeptin Signaling in Reproductive Biology," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 784, pp. 455–479, 2013.
- [29] V. M. Navarro *et al.*, "Persistent impairment of hypothalamic kiSS-1 system after exposures to estrogenic compounds at critical periods of brain sex differentiation," *Endocrinology*, vol. 150, no. 5, pp. 2359–2367, 2009.
- [30] M. Tena-Sempere, "Kisspeptin/GPR54 system as potential target for endocrine disruption of reproductive development and function," *Int. J. Androl.*, vol. 33, no. 2, pp. 360–367, 2010.

- [31] P. Cui, C. Yang, K. Zhang, X. Gao, and L. Luo, "Effect of estrogen on the expression of GnRH and kisspeptin in the hypothalamus of rats during puberty," *Theriogenology*, vol. 84, no. 9, pp. 1556–1564, 2015.
- [32] S. M. Losa, K. L. Todd, A. W. Sullivan, J. Cao, J. A. Mickens, and H. B. Patisaul, "Neonatal exposure to genistein adversely impacts the ontogeny of hypothalamic kisspeptin signaling pathways and ovarian development in the peripubertal female rat," *Reprod. Toxicol.*, vol. 31, no. 3, pp. 280–289, 2011.
- [33] S. M. Losa-ward, K. L. Todd, K. A. Mccaffrey, K. Tsutsui, and H. B. Patisaul, "Disrupted Organization of RFamide Pathways in the Hypothalamus Is Associated with Advanced Puberty in Female Rats Neonatally Exposed to Bisphenol A 1," *Biol. Reprod.*, vol. 87, no. May, pp. 1–9, 2012.
- [34] K. USUDA *et al.*, "Neonatal Exposure to 17 α -Ethinyl Estradiol Affects Kisspeptin Expression and LH-Surge Level in Female Rats," *J. Vet. Med. Sci.*, vol. 76, no. 8, pp. 1105–1110, 2014.
- [35] A. Overgaard *et al.*, "The effect of perinatal exposure to ethinyl oestradiol or a mixture of endocrine disrupting pesticides on kisspeptin neurons in the rat hypothalamus," *Neurotoxicology*, vol. 37, pp. 154–162, 2013.
- [36] R. Yang, Y. M. Wang, L. Zhang, Z. M. Zhao, J. Zhao, and S. Q. Peng, "Prepubertal exposure to an oestrogenic mycotoxin zearalenone induces central precocious puberty in immature female rats through the mechanism of premature activation of hypothalamic kisspeptin-GPR54 signaling," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 437, pp. 62–74, 2016.
- [37] M. Bellingham *et al.*, "Exposure to a complex cocktail of environmental endocrine-disrupting compounds disturbs the kisspeptin/GPR54 system in ovine hypothalamus and pituitary gland," *Environ. Health Perspect.*, vol. 117, no. 10, pp. 1556–1562, 2009.
- [38] C. Y. Chen, Y. Y. Chou, Y. M. Wu, C. C. Lin, S. J. Lin, and C. C. Lee, "Phthalates may promote female puberty by increasing kisspeptin activity," *Hum. Reprod.*, vol. 28, no. 10, pp. 2765–2773, 2013.

- [39] R. Hampl, J. Kubátová, and L. Stárka, "Steroids and endocrine disruptors - History, recent state of art and open questions," *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 155, pp. 217–223, 2016.
- [40] S. Livadas and G. P. Chrousos, "Control of the onset of puberty," *Curr. Opin. Pediatr.*, vol. 28, no. 4, pp. 551–558, 2016.
- [41] O. T. Olaniyan, M. Ab, K. B. Auta, J. B. Dare, and Y. D. Anjorin, "KISSPEPTIN SYSTEM : A Multi-Homeostatic System," *J. Pharm. Biol. Sci.*, vol. 5, no. 4, pp. 87–101, 2013.
- [42] M. Mondal, K. Kumar, and B. Samudram, "Determination of plasma kisspeptin concentrations during reproductive cycle and different phases of pregnancy in crossbred cows using bovine specific enzyme immunoassay," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 224, pp. 168–175, 2015.
- [43] J. Y. Kim, "Isolation and characterization of an alkaline protease produced by *Bacillus subtilis* JK-1," *Korean J. Microbiol.*, vol. 43, no. 4, pp. 331–336, 2007.
- [44] C. N. Jayasena *et al.*, "The identification of elevated urinary kisspeptin-immunoreactivity during pregnancy," *Ann. Clin. Biochem.*, vol. 52, no. 3, pp. 395–398, 2015.
- [45] J. S. Kinsey-Jones *et al.*, "Quantification of rat kisspeptin using a novel radioimmunoassay," *PLoS One*, vol. 9, no. 5, pp. 5–9, 2014.
- [46] C. N. Jayasena *et al.*, "The effects of kisspeptin-10 on reproductive hormone release show sexual dimorphism in humans," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 96, no. 12, pp. 1963–1972, 2011.
- [47] M. P. K. G. M. W. S. D. S. P. Radha Ramachandran, A. Kazarian, and M. A. G. S. R. Bloom, "Preanalytical Factors Affecting RIA Measurement of Plasma Kisspeptin," *Clin. Chem.*, vol. 54, pp. 615–623, 2008.
- [48] C. N. Jayasena, A. T. R. A. Gabra, Alexander N. Comninou Adam Januszewski Hani Harvey, and M. A. G. S. R. B. W. S. Dhillon, "Plasma Kisspeptin: A Potential Biomarker of Tumor Metastasis in Patients with Ovarian Carcinoma," *Clin.*

Chem., vol. 58, pp. 1061–1066, 2012.

[49] Y. M. Chan *et al.*, “Kisspeptin resets the hypothalamic GnRH clock in men,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 96, no. 6, pp. 908–915, 2011.

[50] Z. Liu *et al.*, “LC-MS/MS quantification of a neuropeptide fragment kisspeptin-10 (NSC 741805) and characterization of its decomposition product and pharmacokinetics in rats,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 926, pp. 1–8, 2013.

[51] C. M. Trevisan, E. Montagnab, R. de Oliveiraa, K. A. C. P. B. Christofolinia, Denise M.Crandall, and B. Bianco, “Kisspeptin/GPR54 System : What Do We Know About Its Role in Human Reproduction ?,” *Cell Physiol Biochem*, vol. 870, pp. 1259–1276, 2018.

[52] A. N. Hoofnagle and M. H. Wener, “The fundamental flaws of immunoassays and potential solutions using tandem mass spectrometry,” *J. Immunol. Methods*, vol. 347, no. 1–2, pp. 3–11, 2009.

[53] M. A. Carey, J. W. Card, J. W. Voltz, D. R. Germolec, K. S. Korach, and D. C. Zeldin, “The impact of sex and sex hormones on lung physiology and disease: lessons from animal studies,” *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 293, no. 2, pp. L272–L278, 2007.

[54] D. Ackermann *et al.*, “Reference intervals for the urinary steroid metabolome: The impact of sex, age, day and night time on human adult steroidogenesis,” *PLoS One*, vol. 14, no. 3, pp. 1–19, 2019.

[55] E. A. Townsend, V. M. Miller, and Y. S. Prakash, *Sex differences and sex steroids in lung health and disease*, vol. 33, no. 1. 2012.

[56] J. Robles *et al.*, “Quantifying endogenous androgens, estrogens, pregnenolone and progesterone metabolites in human urine by gas chromatography tandem mass spectrometry,” *Talanta*, vol. 169, no. November 2016, pp. 20–29, 2017.

[57] C. Almeida and J. M. F. Nogueira, “Determination of steroid sex hormones in

water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 41, no. 4, pp. 1303–1311, 2006.

[58] X. Huang, D. Yuan, and B. Huang, “Determination of steroid sex hormones in urine matrix by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and liquid chromatography with diode array detection,” *Talanta*, vol. 75, no. 1, pp. 172–177, 2008.

[59] M. Hansen, N. W. Jacobsen, F. K. Nielsen, E. Björklund, B. Styrishave, and B. Halling-Sørensen, “Determination of steroid hormones in blood by GC-MS/MS,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 400, no. 10, pp. 3409–3417, 2011.

[60] R. A. Pérez, B. Albero, J. L. Tadeo, E. Molero, and C. Sánchez-Brunete, “Analysis of steroid hormones in water using palmitate-coated magnetite nanoparticles solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry,” *Chromatographia*, vol. 77, no. 11–12, pp. 837–843, 2014.

[61] K. D. Pennell, M. A. Woodin, and P. B. Pennell, “Quantification of neurosteroids during pregnancy using selective ion monitoring mass spectrometry,” *Steroids*, vol. 95, pp. 24–31, 2015.

[62] P. Caron, V. Turcotte, and C. Guillemette, “A chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous profiling of ten endogenous steroids, including progesterone, adrenal precursors, androgens and estrogens, using low serum volume,” *Steroids*, vol. 104, pp. 16–24, 2015.

[63] R. Su *et al.*, “Application of multiwall carbon nanotubes-based matrix solid phase dispersion extraction for determination of hormones in butter by gas chromatography mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 31, pp. 5047–5054, 2011.

[64] N. Andrási, A. Helenkár, G. Záray, A. Vasanits, and I. Molnár-Perl, “Derivatization and fragmentation pattern analysis of natural and synthetic steroids, as their trimethylsilyl (oxime) ether derivatives by gas chromatography mass spectrometry: Analysis of dissolved steroids in wastewater samples,” *J. Chromatogr.*

A, vol. 1218, no. 14, pp. 1878–1890, 2011.

[65] K. Fang, X. Pan, B. Huang, J. Liu, Y. Wang, and J. Gao, “Simultaneous Derivatization of Hydroxyl and Ketone Groups for the Analysis of Steroid Hormones by GC–MS,” *Chromatographia*, vol. 72, no. 9–10, pp. 949–956, 2010.

[66] A. S. P. Boggs, J. A. Bowden, T. M. Galligan, L. J. Guillette, and J. R. Kucklick, “Development of a multi-class steroid hormone screening method using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS),” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 408, no. 15, pp. 4179–4190, 2016.

[67] U. Bussy, M. Huertas, Y. W. Chung-Davidson, K. Li, and W. Li, “Chemical derivatization of neurosteroids for their trace determination in sea lamprey by UPLC-MS/MS,” *Talanta*, vol. 149, pp. 326–334, 2016.

[68] M. Genangeli *et al.*, “Development and application of a UHPLC-MS / MS method for the simultaneous determination of 17 steroidal hormones in equine serum,” *J. Mass Spectrom.*, no. September 2016, pp. 22–29, 2017.

[69] T. F. T. Omar, A. Z. Aris, F. M. Yusoff, and S. Mustafa, “An improved SPE-LC-MS/MS method for multiclass endocrine disrupting compound determination in tropical estuarine sediments,” *Talanta*, vol. 173, no. May, pp. 51–59, 2017.

[70] D. T. Harwood and D. J. Handelsman, “Development and validation of a sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay to simultaneously measure androgens and estrogens in serum without derivatization,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 409, no. 1–2, pp. 78–84, 2009.

[71] T. Koal, D. Schmiederer, H. Pham-Tuan, C. Röhring, and M. Rauh, “Standardized LC-MS/MS based steroid hormone profile-analysis,” *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, vol. 129, no. 3–5, pp. 129–138, 2012.

[72] L. Koren, E. S. M. Ng, K. K. Soma, and K. E. Wynne-Edwards, “Sample preparation and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for multiple steroids in mammalian and avian circulation,” *PLoS One*, vol. 7, no. 2, 2012.

[73] U. Ceglarek, L. Kortz, A. Leichtle, G. M. Fiedler, J. Kratzsch, and J. Thiery,

“Rapid quantification of steroid patterns in human serum by on-line solid phase extraction combined with liquid chromatography-triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 401, no. 1–2, pp. 114–118, 2009.

[74] J. Dimitrakov, H. V. Joffe, S. J. Soldin, R. Bolus, C. A. T. Buffington, and J. C. Nickel, “Adrenocortical Hormone Abnormalities in Men with Chronic Prostatitis/Chronic Pelvic Pain Syndrome,” *Urology*, vol. 71, no. 2, pp. 261–266, 2008.

[75] A. Glaser, “The Ubiquitous Triclosan A common antibacterial agent exposed,” *Beyond Pestic. Coalit. Against Misuse Pestic.*, vol. 24, no. 3, 2004.

[76] J. Heidler and R. U. Halden, “Mass balance assessment of triclosan removal during conventional sewage treatment,” *Chemosphere*, vol. 66, no. 2, pp. 362–369, 2007.

[77] S. Siddique, C. Kubwabo, and S. A. Harris, “A review of the role of emerging environmental contaminants in the development of breast cancer in women,” *Emerg. Contam.*, vol. 2, no. 4, pp. 204–219, 2016.

[78] M. Gutiérrez, M. Droguet, and U. Odeur, “LA CROMATOGRAFÍA DE GASES Y LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS: Résumé,” *BOLETÍN INTEXTER (U.P.C.)*, pp. 35–41, 2002.

[79] J. J. Pitt, “Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry,” *Clin. Biochem. Rev.*, vol. 30, no. 1, pp. 19–34, 2009.

[80] J. Taieb, C. Benattar, A. S. Birr, and A. Lindenbaum, “Limitations of steroid determination by direct immunoassay,” *Clin. Chem.*, vol. 48, no. 3, pp. 583–585, 2002.

[81] A. Thomas, W. Schänzer, and M. Thevis, “Immunoaffinity techniques coupled to mass spectrometry for the analysis of human peptide hormones: advances and applications,” *Expert Rev. Proteomics*, vol. 14, no. 9, pp. 799–807, 2017.

[82] P. Richter, C. Leiva, C. Choque, A. Giordano, and B. Sepúlveda, “Rotating-

disk sorptive extraction of nonylphenol from water samples,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 49, pp. 8598–8602, 2009.

[83] H. M. Mohamed, “Green, environment-friendly, analytical tools give insights in pharmaceuticals and cosmetics analysis,” *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 66, pp. 176–192, 2015.

[84] V. Manzo, L. Honda, O. Navarro, L. Ascar, and P. Richter, “Microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from waste water samples by rotating-disk sorptive extraction,” *Talanta*, vol. 128, pp. 486–492, 2014.

[85] A. Cañas, S. Valdebenito, and P. Richter, “A new rotating-disk sorptive extraction mode, with a copolymer of divinylbenzene and N-vinylpyrrolidone trapped in the cavity of the disk, used for determination of florfenicol residues in porcine plasma Microextraction Techniques,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, no. 8, pp. 2205–2210, 2014.

[86] L. Jachero, B. Sepúlveda, I. Ahumada, E. Fuentes, and P. Richter, “Rotating disk sorptive extraction of triclosan and methyl-triclosan from water samples,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 24, pp. 7711–7716, 2013.

[87] V. Manzo, O. Navarro, L. Honda, K. Sánchez, M. I. Toral, and P. Richter, “Determination of crystal violet in water by direct solid phase spectrophotometry after rotating disk sorptive extraction,” *Talanta*, vol. 106, pp. 305–308, 2013.

[88] A. Cañas, P. Richter, and G. M. Escandar, “Chemometrics-assisted excitation – emission fluorescence spectroscopy on nylon-attached rotating disks . Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of interferences,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 852, pp. 105–111, 2014.

[89] Y. Corrotea, N. Aguilera, L. Honda, and P. Richter, “Determination of Hormones in Wastewater Using Rotating Disk Sorptive Extraction and Gas Chromatography – Mass Spectrometry Determination of Hormones in Wastewater Using Rotating Disk Sorptive Extraction and Gas Chromatography – Mass ARTICLE HISTORY,” *Anal. Lett.*, vol. 2719, pp. 1344–1358, 2016.

- [90] V. Manzo, M. Becerra-herrera, D. Arismendi, A. Molina-Balmaceda, A. Caraballo, and P. Richter, "Rotating-disk sorptive extraction coupled to gas chromatography mass spectrometry for the determination of phthalates in bottled water," *Anal. Methods*, vol. 11, pp. 6111–6118, 2019.
- [91] M. Becerra-Herrera, V. Miranda, D. Arismendi, and P. Richter, "Chemometric optimization of the extraction and derivatization of parabens for their determination in water samples by rotating-disk sorptive extraction and gas chromatography mass spectrometry," *Talanta*, vol. 176, no. August 2017, pp. 551–557, 2018.
- [92] D. Arismendi, M. Becerra-Herrera, I. Cerrato, and P. Richter, "Simultaneous determination of multiresidue and multiclass emerging contaminants in waters by rotating-disk sorptive extraction–derivatization–gas chromatography/mass spectrometry," *Talanta*, vol. 201, no. April, pp. 480–489, 2019.
- [93] F. F. Donato, N. M. G. Bandeira, G. C. dos Santos, O. D. Prestes, M. B. Adaime, and R. Zanella, "Evaluation of the rotating disk sorptive extraction technique with polymeric sorbent for multiresidue determination of pesticides in water by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1516, pp. 54–63, 2017.
- [94] V. Manzo, M. Miró, and P. Richter, "Programmable flow-based dynamic sorptive microextraction exploiting an octadecyl chemically modified rotating disk extraction system for the determination of acidic drugs in urine," *J. Chromatogr. A*, vol. 1368, pp. 64–69, 2014.
- [95] C. Vakh, M. Alaboud, S. Lebedinets, and A. Bulatov, "A rotating cotton - based disk packed with a cation-exchange resin : Separation of ofloxacin from biological fluids followed by chemiluminescence determination," *Talanta*, vol. 196, no. July 2018, pp. 117–123, 2019.
- [96] X. Tu and W. Chen, "A review on the recent progress in matrix solid phase dispersion," *Molecules*, vol. 23, no. 11, pp. 1–13, 2018.
- [97] S. C. Mandal, V. Mandal, and A. K. Das, *Classification of Extraction Methods*. 2015.

- [98] S. C. Moidoveanu and V. David, "Sorbent extraction," *J. Chromatogr. Libr.*, vol. 65, no. C, pp. 341–401, 2002.
- [99] C. E. D. Nazario, B. H. Fumes, M. R. da Silva, and F. M. Lanças, "New materials for sample preparation techniques in bioanalysis," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 1043, pp. 81–95, 2017.
- [100] S. Sauvé and Mélanie Desrosiers, "A review of what is an emerging contaminant," *Chem. Cent. J.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–7, 2014.
- [101] M. Gavrilescu, K. Demnerová, J. Aamand, S. Agathos, and F. Fava, "Emerging pollutants in the environment: Present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation," *N. Biotechnol.*, vol. 32, no. 1, pp. 147–156, 2015.
- [102] D. F. Putnam, "Composition and concentrative properties of human urine," *Natl. Aeronaut. Sp. Adminis CR-1802*, 1971.
- [103] D. L. Sampson, Y. L. Chng, Z. Upton, C. P. Hurst, A. W. Parker, and T. J. Parker, "The highly abundant urinary metabolite urobilin interferes with the bicinchoninic acid assay," *Anal. Biochem.*, vol. 442, no. 1, pp. 110–117, 2013.
- [104] J. F. Kerkhoff and H. J. Peters, "A reproducible estimation of the urobilin concentration un urine by means of a modified Schlesinger test," *Clin. Chim. Acta*, vol. 21, pp. 133–137, 1968.
- [105] A. C. McLean, N. Valenzuela, S. Fai, and S. A. L. Bennett, "Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification," *J. Vis. Exp.*, no. 67, pp. 4–9, 2012.
- [106] T. Lundstedt *et al.*, "Experimental design and optimization," *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, vol. 42, no. 1–2, pp. 3–40, 1998.
- [107] E. A. Bekele, C. E. P. Annaratone, M. L. A. T. M. Hertog, B. M. Nicolai, and A. H. Geeraerd, "Multi-response optimization of the extraction and derivatization protocol of selected polar metabolites from apple fruit tissue for GC-MS analysis," *Anal. Chim. Acta*, vol. 824, pp. 42–56, 2014.

- [108] M. Becerra-herrera, P. Richter, M. Becerra-herrera, V. Miranda, D. Arismendi, and P. Richter, "Chemometric optimization of the extraction and derivatization of parabens for their determination in water samples by ... extraction and gas chromatography mass spectrometry," *Talanta*, vol. 176, no. September, pp. 551–557, 2017.
- [109] H. Miraji, O. C. Othman, F. N. Ngassapa, and E. W. Mureithi, "Research Trends in Emerging Contaminants on the Aquatic Environments of Tanzania," *Scientifica (Cairo)*, vol. 2016, 2016.
- [110] H. Shi, X. Cheng, Q. Wu, R. Mu, and M. Yinfa, "Assessment and Removal of Emerging Water Contaminants," *J. Environ. Anal. Toxicol.*, vol. 02, no. 07, 2012.
- [111] R. Loos *et al.*, "EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents," *Water Res.*, vol. 47, no. 17, pp. 6475–6487, 2013.
- [112] J. Rivera-Utrilla, M. Sánchez-Polo, M. Á. Ferro-García, G. Prados-Joya, and R. Ocampo-Pérez, "Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review," *Chemosphere*, vol. 93, no. 7, pp. 1268–1287, 2013.
- [113] P. Dwivedi, X. Zhou, T. G. Powell, A. M. Calafat, and X. Ye, "Impact of enzymatic hydrolysis on the quantification of total urinary concentrations of chemical biomarkers," *Chemosphere*, vol. 199, pp. 256–262, 2018.
- [114] L. Wan, H. Zhu, Y. Guan, and G. Huang, "Nanocoating cellulose paper based microextraction combined with nanospray mass spectrometry for rapid and facile quantitation of ribonucleosides in human urine," *Talanta*, vol. 169, no. November 2016, pp. 209–215, 2017.
- [115] and Y. F. Jie-Mei Chu, Chu-Bo Qi, Yun-qing Huang, Han-peng Jiang, Yan-Hong Hao, Bi-Feng Yuan, "Metal oxide-based selective enrichment combined with stable isotope labeling-mass spectrometry analysis for profiling of ribose conjugates," *Anal. Chem.*, 2015.
- [116] R. Todorovic *et al.*, "Analysis of potential biomarkers of estrogen-initiated

cancer in the urine of Syrian golden hamsters treated with 4-hydroxyestradiol,” *Carcinogenesis*, vol. 22, no. 6, pp. 905–911, 2001.

[117] G. W. Lien, C. Y. Chen, and G. S. Wang, “Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for determining estrogenic chemicals in water by liquid chromatography tandem mass spectrometry with chemical derivatizations,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 6, pp. 956–966, 2009.

[118] P. R. Valentina Manzo, Jairon Goya-Pacheco, Daniel Arismendi, Mercedes Becerra-Herrera, Alver Castillo-Aguirre, Rosario Castillo-Felices, Milton Rosero-Moreano, Eduardo Carasek, “Cork sheet as a sorptive phase to extract hormones from water by rotating-disk sorptive extraction (RDSE),” *Anal. Chim. Acta*, vol. 1087, pp. 1–10, 2019.

[119] P. Panuwet *et al.*, “Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring,” *Crit Rev Anal Chem.*, vol. 46, no. 2, pp. 93–105, 2016.

[120] I. T. and S. R. S. Luigi Silvestro, “Matrix Effects in Mass Spectrometry Combined with Separation Methods — Comparison HPLC, GC and Discussion on Methods to Control these Effects,” *Tandem Mass Spectrom. - Mol. Charact. Qual.*, vol. Chapter 1, pp. 1–37, 2013.

[121] A. Stopforth, B. V. Burger, A. M. Crouch, and P. Sandra, “The analysis of estrone and 17 β -estradiol by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography/mass spectrometry: Application to urine samples after oral administration of conjugated equine estrogens,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 856, no. 1–2, pp. 156–164, 2007.

[122] M. S. Chang, J. Y. Shen, S. Yang, and G. J. Wu, “Determination of three endocrine disrupting chemicals , triclosan , 4- n -nonylphenol , and di- n - butyl phthalate using stir bar sorptive extraction in samples of different matrices,” *Toxicol. Environ. Chem.*, vol. 94, no. 6, p. 1’27-1033, 2012.

[123] M. Kawaguchi *et al.*, “Determination of urinary triclosan by stir bar sorptive

extraction and thermal desorption – gas chromatography – mass spectrometry,” *J. Chromatogr. B*, vol. 875, pp. 577–580, 2008.

[124] L. Honda, M. Becerra-Herrera, and P. Richter, “Liquid chromatography–time-of-flight high-resolution mass spectrometry study and determination of the dansylated products of estrogens and their hydroxylated metabolites in water and wastewater,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 410, no. 30, pp. 7909–7919, 2018.

[125] P. Keski-rahkonen, R. Desai, M. Jimenez, D. T. Harwood, and D. J. Handelsman, “Measurement of estradiol in human serum by LC-MS / MS using a novel estrogen-specific derivatization reagent,” *Anal. Chem.*, pp. 2–6, 2015.

[126] R. Kostianen and T. J. Kauppila, “Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography–mass spectrometry,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, pp. 685–699, 2009.

[127] M. Ewles and L. Goodwin, “Bioanalytical approaches to analyzing peptides and proteins by LC-MS/MS,” *Bioanalysis*, vol. 3, no. 12, pp. 1379–1397, 2011.

[128] B. Garcia *et al.*, “Investigation of the potential effects of triclosan as an endocrine disruptor in female rats: Uterotrophic assay and two-generation study,” *Toxicology*, vol. 410, no. September, pp. 152–165, 2018.

ANEXO A. Pasantía de Investigación. San Luis, Argentina (Jun/Jul 2018)

Diseño de biosensor usando el Ab-kiss10 para la cuantificación de Kiss-10.

Durante los meses junio-julio del presente año (2018), se asistió a una pasantía de investigación al Laboratorio de Bioanalítica de la Universidad de San Luis (UNSL), con el propósito fundamental de incursionar y aprender todas las herramientas necesarias para el uso y aplicación de anticuerpos en la detección de compuestos, particularmente en el péptido kisspeptina-10, que luego serán utilizados en nuestro laboratorio y acoplados a la técnica de espectrometría de masas.

Como complemento a este aprendizaje teórico, usando la asesoría de los investigadores del laboratorio expertos en biosensores, algunas de las herramientas adquiridas fueron utilizadas para intentar diseñar y construir un biosensor para la determinación selectiva de kisspeptina-10.

Electrodeposición de nanopartículas de oro (AuNPs)

Para este trabajo, se ha decidido trabajar sistemas de AuNPs por el gran interés actual por las nanopartículas en el cambio clínico, óptico, electrónico, nanoquímica y agricultura. Las nanopartículas no son más que partículas con las tres dimensiones menores a 100nm y su importancia radica en sus propiedades químicas y físicas bien diferenciadas con respecto al material en granel y a nivel molecular o atómico. Son utilizadas por su gran afinidad a muchos átomos, por ejemplo, azufre, permitiendo así formar enlaces fuertes en estos sistemas de biodetección. La función principal de estas AuNPs en los biosensores es aumentar la superficie del electrodo y mejorar la transferencia electrónica. Siguiendo un protocolo ya establecido por los investigadores del laboratorio de bioanalítica, se procede de la siguiente manera para la electrodeposición de AuNPs sobre superficies carbono vítreo:

- 1) Limpieza del electrodo mediante lavados en medio ácido y el pulimiento con alúmina.

- 2) Para corroborar la condición inicial del electrodo es necesario contar con un sistema redox conocido, en este caso, el sistema $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ fue el utilizado a través de la medición de voltametría cíclica.
- 3) Realizar la electrodeposición del electrodo en una solución que contiene HAuCl_4 0,3mM en KNO_3 0,1M. Para ello el electrodo se sumerge en esta solución y se le aplica un potencial de -200mV por 30 segundos.
- 4) Realizar medidas nuevamente del electrodo con las AuNPs ya depositadas del sistema $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ y se evaluaron las diferencias con respecto al voltamograma inicial.

Los resultados de estos ensayos se observan en la figura A.1. Se puede observar que efectivamente existe un aumento en la intensidad de la corriente en presencia de las AuNPs lo que indica la mejora en la transferencia electrónica, además de un acercamiento entre los picos de oxidación y reducción propio del aumento de la reversibilidad de la reacción.

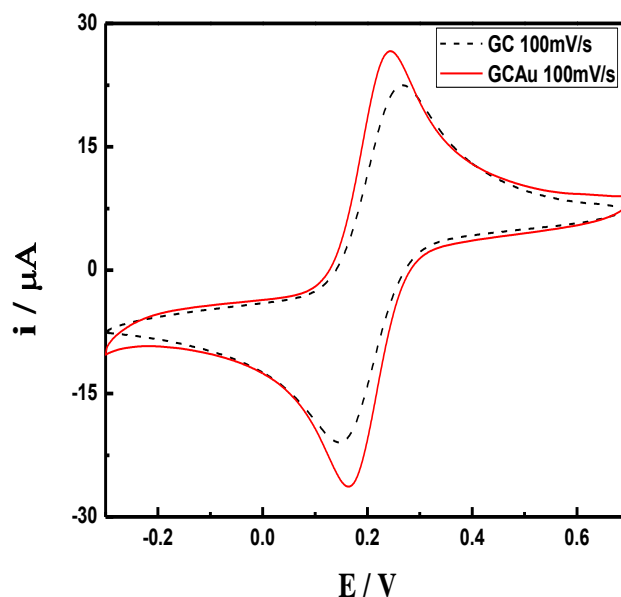


Figura A.1. Voltamogramas cíclicos en solución de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ 1 mmol L⁻¹ utilizando electrodo de GC (línea discontinua) y de electrodo GC modificado con Au NPs (línea continua).

Estudio del potencial aplicado y tiempo para la electrodeposición de AuNPs

Considerando el interés particular de las AuNPs en el estudio, se decidió estudiar más a fondo los potenciales y tiempos necesarios para su electrodeposición. Se hicieron dos experimentos univariados para evaluar el efecto.

En primer lugar se realizó el estudio de potencial aplicado a un mismo tiempo de electrodeposición (30seg). En la figura A.2 se observan los resultados donde se evidencia que a potenciales más negativos (-400mV) aumenta la intensidad de la señal de corriente del sistema Fe^{+2}/Fe^{+3} . Sin embargo se ha encontrado que potenciales tan negativos no son favorables por el aumento del tamaño de la nanopartícula. Es por ello, y además considerando la poca diferencia, entre las intensidades de corrientes, se decidió trabajar con un potencial de -200mV.

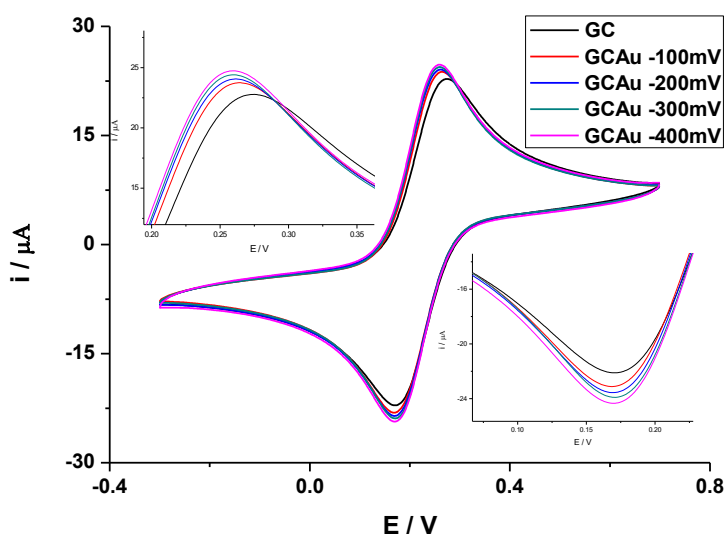


Figura A.2. Estudio de potencial de aplicación para la electrodeposición de AuNPs

Seguidamente, se estudió el tiempo de deposición entre los 7 y 120 segundos encontrando que a menores tiempo de electrodeposición el sistema es más favorable (Figura A.3). Esto debido principalmente a que a tiempos excesivamente largos puede formarse en la superficie del electrodo una capa de nanopartículas que evitan el aumento en la corriente del sistema.

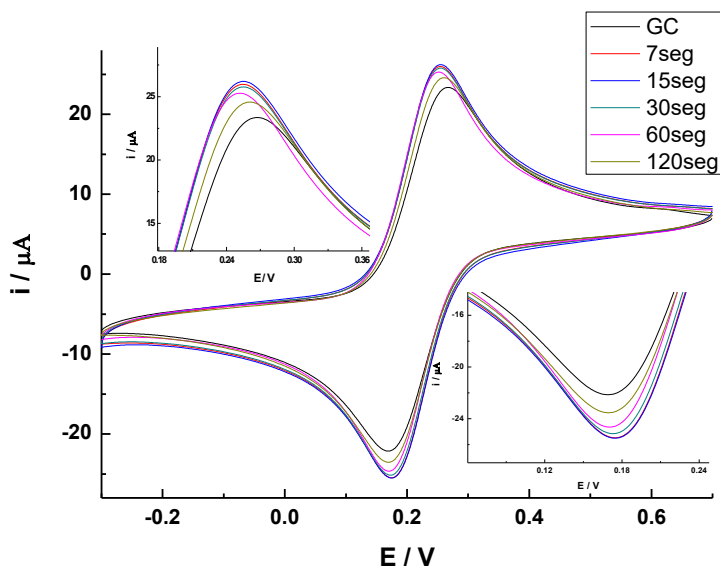


Figura A.3. Estudio de tiempo de aplicación para la electrodeposición de AuNPs

En vista de esto último, y considerando que prácticamente a 7, 15 y 30 segundos se obtiene el mismo resultado, se decidió escoger 30 segundos como tiempo de electrodeposición de las AuNPs en el electrodo de trabajo. De esta manera se asegura una mayor de partículas depositadas en el sistema.

Estudio de aumento del área del electrodo

Como ya se ha mencionado previamente, una de las ventajas del uso de AuNPs en electrodos, es el aumento de su superficie, lo que en fin se traduce en mayores posibles lugares de interacción con el sistema de bioreconocimiento. Para este estudio se utiliza la ecuación que se muestra a continuación:

$$i_{pa} = 2.69 \times 10^5 n^{\frac{3}{2}} A C_0 D_0^{\frac{1}{2}} v^{\frac{1}{2}}$$

Esta es conocida como la ecuación de Randles-Sevcik, en donde: $n=1$, $c=1\text{mmol L}$ del sistema $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$, $D=6,36 \text{ E}^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$. Se hace una representación gráfica de esta ecuación en función de la corriente medida y la velocidad de medición del sistema $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$. En este caso, se hicieron variaciones en la

velocidad entre 10 a 100 mV/s. En la figura A.4, se muestran los resultados obtenidos para la medición de este experimento en presencia de las AuNPs.

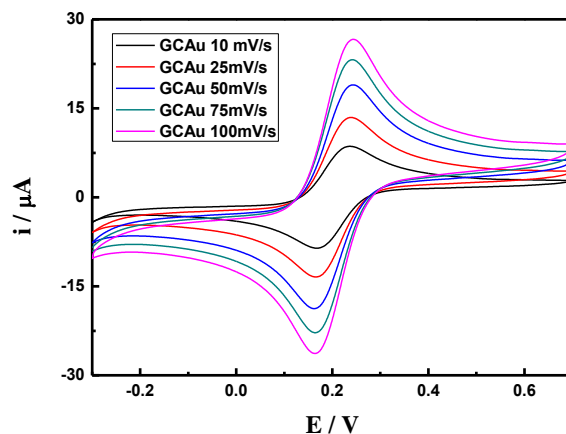


Figura A.4. Voltamogramas cíclicos de la reacción redox Fe+2/Fe+3 a distintas velocidades de barrido.

Una vez obtenidos ambos ensayos, es decir, en presencia y ausencia de las AuNPs, se hace la representación gráfica de cada corriente en función de la velocidad de barrido elevada a 1/2. En la figura A.5 se muestran los resultados.

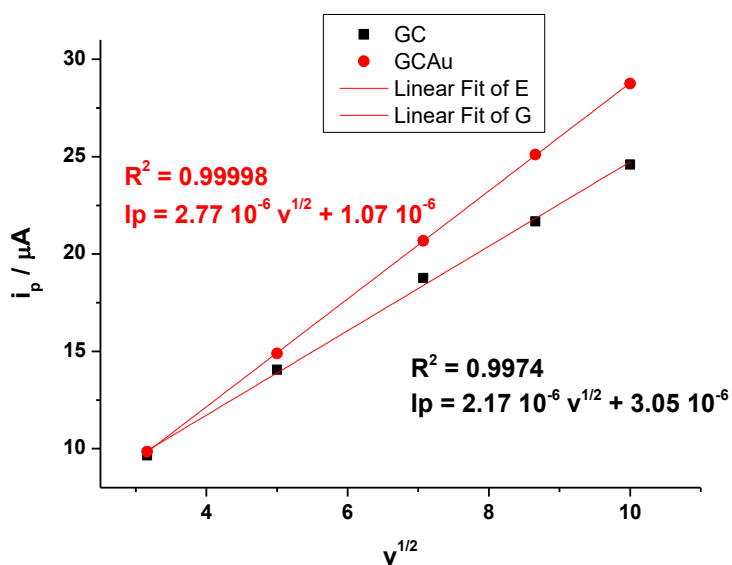


Figura A.5. Representación gráfica de I vs v^{1/2} del sistema fe+2/Fe+3 en presencia y ausencia de las AuNPs

Usando los valores de la pendiente se estiman los valores de área para cada uno de los casos, al realizar esto se obtuvieron áreas de 0,00319 cm² y 0,004 cm² para el electrodo sin y con AuNPs respectivamente. Esto equivale a un aumento del 20% en la superficie.

Inmovilización del anticuerpo de kisspeptina-10

Para los ensayos de inmunoafinidad fue necesario adquirir un kit comercial para la determinación de kisspeptina-10.

Inicialmente se intentó hacer una inmovilización directa del Ab sobre las AuNPs, esto a pesar de no ser una interacción covalente, se pueden establecer interacciones electrostáticas entre el Au y los grupos del Ab-Kiss10. Para la inmovilización del Ab-Kiss10 se añadieron 40uL del anticuerpo concentrado y 960uL del buffer PBS, se sumergió el electrodo con AuNPs y se dejaron en contacto toda la noche refrigerado.

Al final lo que se pretende es realizar una medición amperométrica a través de la medición de corriente de algún intermediario de la reacción, una vez se haya unido previamente el Ab al Ag*. Primeramente se usó peróxido de hidrógeno, pero al no servir se utilizó terbutilcatecol (TBC) como mediador electroquímico. Para ello primeramente se debió examinar los potenciales de oxidación y reducción del TBC en el sistema sin y con AuNPs. En la figura A.6 se observan los resultados.

De estos gráficos se extraen los siguientes potenciales y corrientes de oxidación y reducción para ambos sistemas:

Tabla A.1. Potenciales y corrientes de oxidación y reducción de la reacción TBC sobre el electrodo AuNPs-GC

Superficie	Pot Ox (mV)	I ox (A)	Pot red (mV)	I red (A)
GC-TBC	+ 186	+2,321 x 10 ⁻⁶	+68	-2,272 x 10 ⁻⁶
GC-AuNPs-TBC	+ 164	+2,928 x 10 ⁻⁶	+82	-2,845 x 10 ⁻⁶

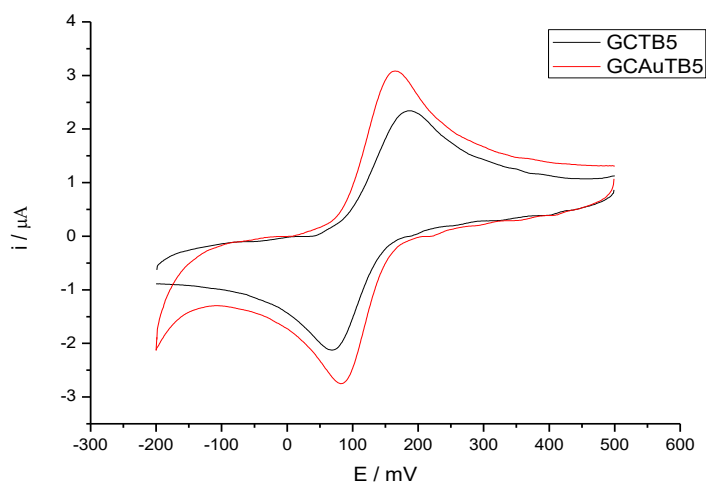


Figura A.6. Voltametría cíclica del sistema TBC en presencia y ausencia de AuNPs

Estos potenciales son registrados con el propósito de conocer cuál es el potencial al cuál se realizará la medición amperométrica final. Ya que el potencial de reducción fue de +82 mV con el sistema GC-AuNPs-TBC se suman 150mV para asegurar la reducción del TBC hacia el lado negativo. Por esto se consideró -100mV como el potencial de medición amperométrica final.

Unión del antígeno (Ag) y antígeno marcado (Ag*)

Primero se hacen reaccionar el Ag* con la peroxidasa (SA-HRP), para ello en dos envases distintos a uno de ellos se le añade el Ag (50% Ag y 50% Ag*) y al otro no (100% Ag*). Como es una reacción por competencia, la medición de corriente final es directamente proporcionalmente a la cantidad de Ag* e inversamente proporcional a la cantidad de Ag, es decir, de Kisspeptina-10.

Una vez extraído electrodo con el anticuerpo (GC-AuNPs-AbKiss10) se lavó con solución de PBS y se secó en corriente de N₂.

Se sumerge cada electrodo modificado (se realizaron 2 réplicas) en cada una de las soluciones mencionadas que contienen el antígeno y anticuerpo por 2 horas. Previo a la medición final se realiza una solución que contiene H₂O₂ y TBC a 1mM y 10mM respectivamente.

Se extrae el electrodo y después de lavado, se sumerge en una solución de PBS, y se empieza a medir en el método amperométrico a -100mV . Una vez estabilizada la señal se añade la solución de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{TBC}$ y se observó el cambio amperométrico esperado. Estos saltos de corriente que se observan en la figura A.7, es propia de la medición redox esperada, por la presencia del TBC. Esto se hizo para las dos réplicas, encontrando que para la mezcla que contiene partes iguales del Ag/Ag^* (b) es menor al encontrado con la solución que solo contiene el Ag^* (a). Esto es congruente a lo esperado ya que la corriente que se genera es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno (kisspeptins-10) presente.

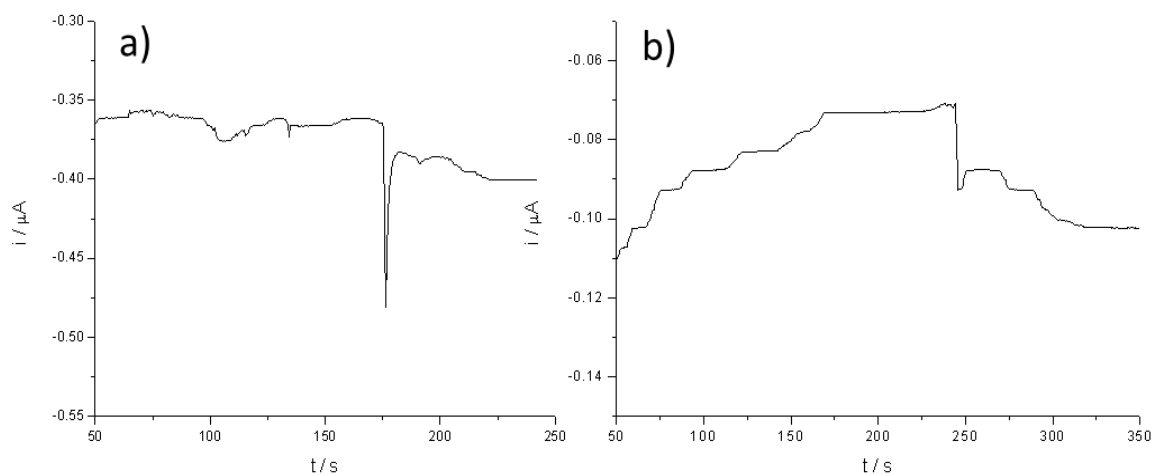


Figura A.7. Amperogramas para la detección de kiss-10 a) solo Ag^* b) mezcla $\text{Ag}-\text{Ag}^*$

Estos resultados corroboran que el desarrollo del biosensor fue realizado con éxito. Sin embargo, debido a que faltó más tiempo para seguir investigando, no se pudo optimizar el biosensor diseñado. Principalmente se quería utilizar otra forma más eficiente de unir el Ab a las AuNPs a través de enlaces covalentes y grupos puentes como por ejemplo, 3-aminopropionic acid (MPA).

A pesar de ello, se logró con el objetivo de la pasantía, la cual estaba principalmente motivada al aprendizaje de inmovilización de anticuerpos en distintas superficies.

ANEXO B. Pasantía de Investigación. Oviedo, España (Ago/Dic 2019)

Inmunoensayo competitivo asistido por nanopartículas de oro para la determinación de kisspeptina-10 en fluidos biológicos mediante ICP-MS.

Propuesta de trabajo: Se propuso un inmunoensayo similar al propuesto en el kit comercial de kisspeptina-10, con la variante de utilizar nanopartículas de oro bioconjugadas con streptavidina (SAV-AuNPs) como agente revelador para luego cuantificar indirectamente kisspeptina-10 mediante ICP-MS. En primer lugar, el inmunoensayo por espectrofotometría fue estudiado para encontrar condiciones óptimas de trabajo, además de tenerlo como medida comparativa con el nuevo método propuesto. Además, se probó el método variando el reactivo reconocedor de la biotina con avidina y luego con streptavidina.

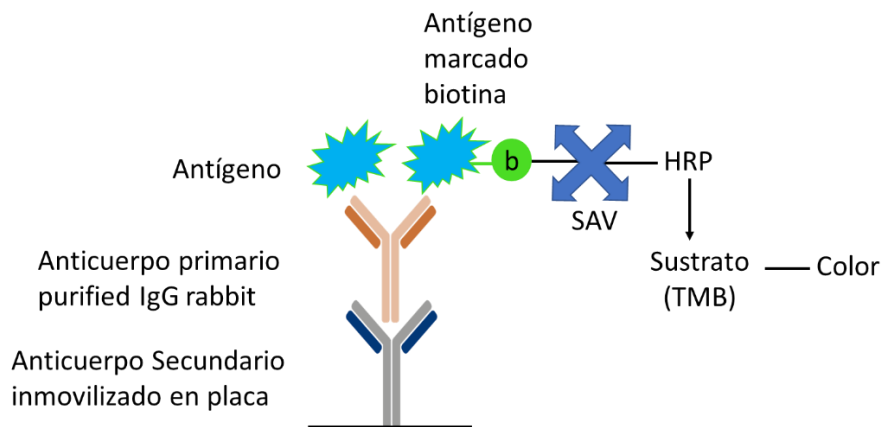


Figura B.1. Ensayo competitivo para medir por espectrofotometría.

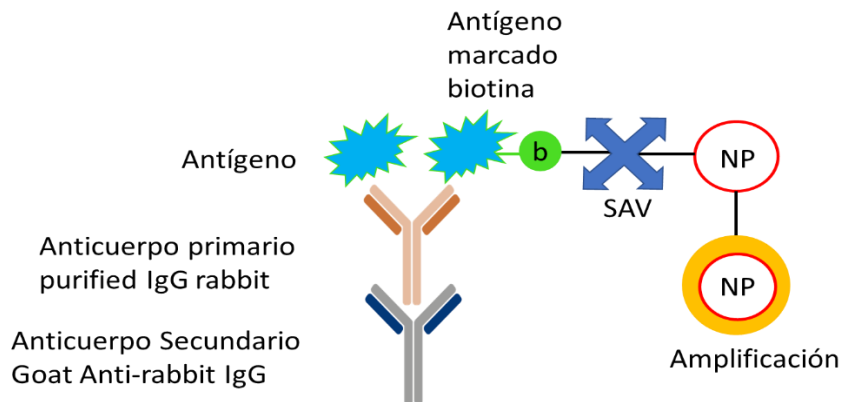


Figura B.2. Ensayo competitivo para medir oro por ICP-MS.

Resumen del trabajo experimental realizado:

A) Inmunoensayo por espectrofotometría:

1. Estudio de condiciones experimentales del inmunoensayo: concentraciones de anticuerpos primario y secundario, etapa de bloqueo y tiempos de incubación, mediante espectrofotometría utilizando el reactivo comercial de SAV-HRP.
2. Construir la curva del inmunoensayo no competitivo para encontrar la concentración mínima de antígeno-biotina (Ag-b) en la cual se obtiene la máxima señal de absorbancia.
3. Construir la curva de inmunoensayo competitivo utilizando la concentración de Ag-b encontrada en el ensayo no competitivo.

B) Inmunoensayo por IPC-MS usando nanopartículas bioconjugadas con avidin (AV-AuNPs):

1. Aplicar las condiciones experimentales optimizadas en el inmunoensayo espectrofotométrico No competitivo utilizando el reactivo AV-AuNPs para el reconocimiento del Ag-b y la posterior medición de oro mediante ICP-MS.
2. Caracterizar la solución de AV-AuNPs mediante AF4-MALS-ICP-MS.
3. Construcción de la curva de inmunoensayo no competitivo.

C) Inmunoensayo por IPC-MS usando nanopartículas bioconjugadas con streptavidin (SAV-AuNPs):

1. Aplicar las condiciones experimentales optimizadas en el inmunoensayo espectrofotométrico No competitivo utilizando el reactivo SAV-AuNPs para el reconocimiento del Ag-b y la posterior medición de oro mediante ICP-MS.
2. Caracterizar la solución de SAV-AuNPs mediante AF4-MALS-ICP-MS.
3. Estudio de balance de masas del inmunoensayo No competitivo y efecto de la dilución del reactivo de reconocimiento.
4. Estudio del efecto de la temperatura y tiempo de incubación del reconocimiento Ag-b y SAV-AuNPs.
5. Construcción de curva competitiva para el inmunoensayo basado en SAV-AuNPs.

RESULTADOS

A. Inmunoensayo por Espectrofotometría

Importante: Debido a la falta de información de las concentraciones de reactivos por parte del fabricante, se desarrolló por completo el inmunoensayo espectrofotométrico. Para ello se compraron por separado todos los reactivos del kit incluyendo: anticuerpo secundario del tipo IgG (Ab-2), anticuerpo primario de kisspeptina-10 (Ab-1), antígeno o estándar de kisspeptina-10 (Ag), antígeno marcado con biotina (Ag-b), HRP-SAV y las soluciones de revelado, TMB y H₂O₂.

En primer lugar, se hizo un estudio de todas las concentraciones de reactivos, reactivos de bloqueo y tiempos de incubación, encontrando como óptimas las siguientes condiciones:

Tabla B.1. Condiciones experimentales optimizadas para inmunoensayo tipo EIA

Etapa	Procedimiento
Tapizado (Ab-2)	100 µL / pocillo de [Ab-2]:3 µg/mL, 1)1h a 37°C y 2) Toda la noche nevera
Bloqueo	150 µL / pocillo BSA 3%, 2h a 37°C
Lavado	150 µL / pocillo de PBS (10mM) / T20 (0,05%) x triplicado
Unión Ab-1	100 µL / pocillo de [Ab-1]= 1 µg/mL, 2h a 37°C
Lavado	150 µL / pocillo de PBS (10mM) / T20 (0,05%) x triplicado
Inmunoensayo	100 µL / pocillo de Ag-b (no competitivo), Ag-b/Ag (competitivo)
Lavado	150 µL / pocillo de PBS (10mM) / T20 (0,05%) x triplicado
Reacción con SAV-HRP	100 µL / pocillo de SAV-HRP kit en Buffer 1X, kit (1:1000)
Lavado	150 µL / pocillo de PBS (10mM) / T20 (0,05%) x triplicado
Revelado TMB / H ₂ O ₂	50 µL / pocillo TMB + 50 µL / pocillo H ₂ O ₂ (COLORACIÓN AZUL)
Finalizar reacción	50 µL / pocillo H ₂ SO ₄ (2M) (COLORACIÓN AMARILLA)

Experimentalmente se pudo concluir lo siguiente de cada paso:

- a) La concentración de anticuerpo secundario (Ab-2) debe ser al menos tres veces mayor a la del primario (Ab-1). Se puede aumentar las concentraciones de reactivos, pero a la vez es innecesario considerando los costos de los reactivos. Según la bibliografía consultada, por lo general, se suelen usar concentraciones de anticuerpo primario entre 1-10 $\mu\text{g/mL}$.
- b) Se probaron dos reactivos de bloqueo: BSA 3% y Caseína 1%. No hubo diferencia entre usar un reactivo u otro. Esta etapa es imprescindible para evitar adsorciones inespecíficas con la superficie de la placa ELISA.

Una vez encontradas las condiciones experimentales óptimas de trabajo se realizó la curva de inmunoensayo no competitiva usando Ag-b a distintas concentraciones (Figura B.1). Este paso es muy importante como paso previo al ensayo competitivo debido a que no puede encontrarse muy concentrado o diluido el reactivo Ag-b ya que entonces no se encontrarían diferencias en la señal al colocar el Ag (no habrá competición).

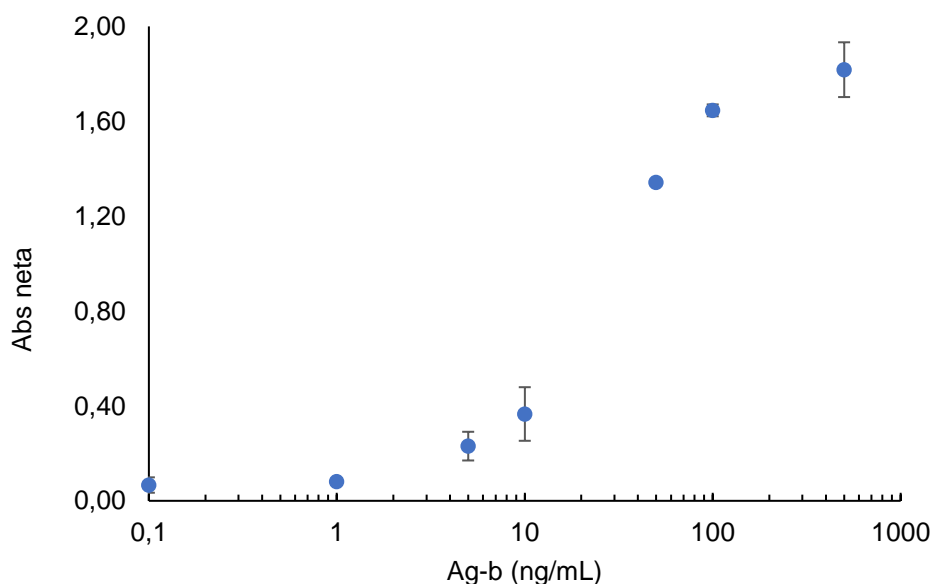


Figura B.1. Curva de inmunoensayo no competitivo por espectrofotometría

Construcción de la curva para el ensayo competitivo

Al observar la Figura B.1 se nota que a los 100 ng/mL de Ag-b ya se encuentra en la parte constante de la curva. Esto se asumió considerando la dispersión de la última medida (500 ng/mL). Por ende, esta concentración de Ag-b: 100 ng/mL fue seleccionada para realizar el ensayo competitivo y como concentración base para los ensayos futuros por ICP-MS. En esta ocasión los resultados no fueron satisfactorios (Figura B.2). Se esperaba una curva contraria a la anterior ya que en este caso se utiliza la concentración de Ag en el eje X del gráfico. Al tratarse de un ensayo competitivo, la respuesta es inversamente proporcional a la cantidad de Ag presente. Es decir, asumiendo que la competencia es la adecuada, a bajas concentración de Ag se debería observar alta intensidad de la señal y a concentración altas de Ag una baja señal de absorbancia.

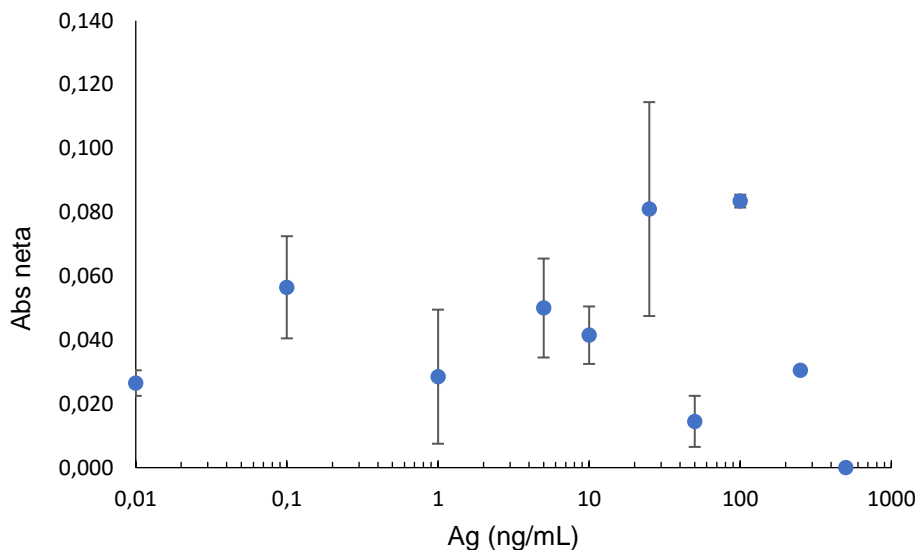


Figura B.2. Curva de inmunoensayo competitivo por espectrofotometría

En los últimos tres puntos de la curva (con exceso de Ag) se observa una tendencia clara que tiende a disminuir ya que la cantidad de Ag supera por mucho a la de Ag-b, pero a bajas concentraciones la dispersión de las medidas es muy alta, lo que cual es muy extraño considerando que prácticamente el inmuno debería estar con exceso de Ag-b y dar prácticamente la misma señal.

Este ensayo no pudo ser repetido ya que en ese momento llegó el reactivo de AV-AuNPs y se empezó a trabajar con ello considerando que era el objetivo fundamental del trabajo.

B. Inmunoensayo con AV-AuNPs e ICP/MS

Importante: Inicialmente se decidió utilizar el reactivo de avidina bioconjugado por nanopartículas de oro por dos razones, primero la mayor afinidad que tiene avidina por la biotina (10^{15}) y segundo, la presencia de azufre en la estructura de avidina permitiría una caracterización del reactivo mediante la medida de la relación de Au/S usando el acoplamiento AF4-MALS-ICP-MS/MS.

Condiciones adicionales para el experimento por ICP-MS:

- a) Se siguieron utilizando las condiciones de inmunoensayos del método espectrofotométrico.
- b) En cuanto al reactivo de AV-AuNPs, es necesario encontrar una condición de dilución idónea del reactivo para poder trabajar. Un exceso del reactivo implicaría muchas adsorciones inespecíficas, y muy poca cantidad no sería suficiente para unirse a toda la biotina disponible en el inmunoensayo.
- c) Se añade el reactivo de AV-AuNPs diluido en PBS y se deja incubar por el mismo tiempo del reactivo SAV-HRP. Se lava el exceso y se procede con la digestión ácida. Para ello a cada pocillo se agregan alrededor de 100 μ L de agua regia recién preparada. Se coloca en agitación por 30 min a 300rpm. Luego se traspasan a un tubo de plástico previamente pesado que contiene Ge (concentración final de 15 ppb) y se añaden 5 mL de agua destilada (pesar al final). Si se hace una dilución intermedia se debe tomar una alícuota de este tubo y diluir con HCl 1% (considerar que el Ge debe quedar al final en 15 ppb).
- d) En cuanto al ICP-MS, se utilizó un método ya optimizado previamente en el laboratorio para medir oro (Au 197) y como estándar interno el patrón de germanio (Ge 72).

Curva competitiva con el reactivo AV-AuNPs

Para empezar, se utilizó una dilución de Av-AUNPs de 1/50, de manera de no gastar tanta cantidad del reactivo inicialmente. Este reactivo fue preparado de forma especial ya que no fue bloqueado con BSA y fue estabilizado solo con citrato. El inmunoensayo es igual al espectrofotométrico solo sustituyendo el paso final del agente revelador de la biotina. Los resultados se muestran en la Figura B.3

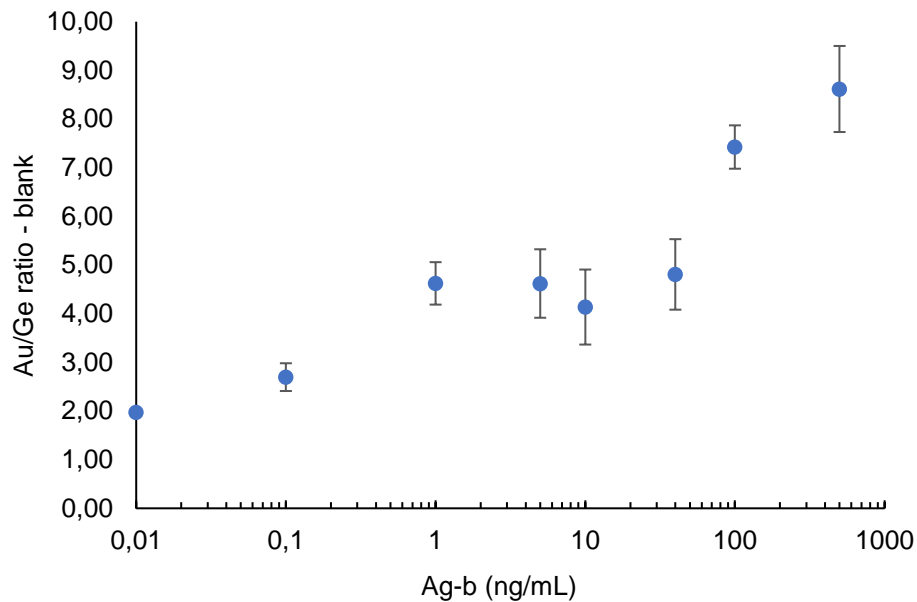


Figura B.3. Curva de inmunoensayo no competitivo usando AV-AuPs

Al ver los resultados se puede decir lo siguiente:

- Se observa una curva típica de inmunoensayo con ciertas variantes a bajas concentraciones del Ag-b. Existe un aumento de la señal a partir de 40 ng/mL, pero faltaron más puntos crecientes para evaluar el punto de señal constante.
- La señal del blanco resultó ser muy alta, casi el 80% del primer punto de la curva.
- Originalmente se pensó que la curva no era la adecuada, pero luego de terminar los experimentos y ver los ensayos futuros, esta curva se adaptaba a lo que se quería lograr.

Estudio de efecto de dilución del reactivo AV-AuNPs, etapa de bloqueo y balance de masas

Considerando el gran aporte del blanco en el ensayo anterior, se decidió probar con distintas concentraciones crecientes y decrecientes del reactivo AV-AuNPs. Para ello, a una misma concentración de 200 ng/mL del Ag-b se ensayaron las diluciones 1/10, 1/25, 1/50, 1/100 y 1/500 del reactivo bioconjugado. Además, distintos blancos fueron considerados, en la Figura B.4 se resumen los resultados:

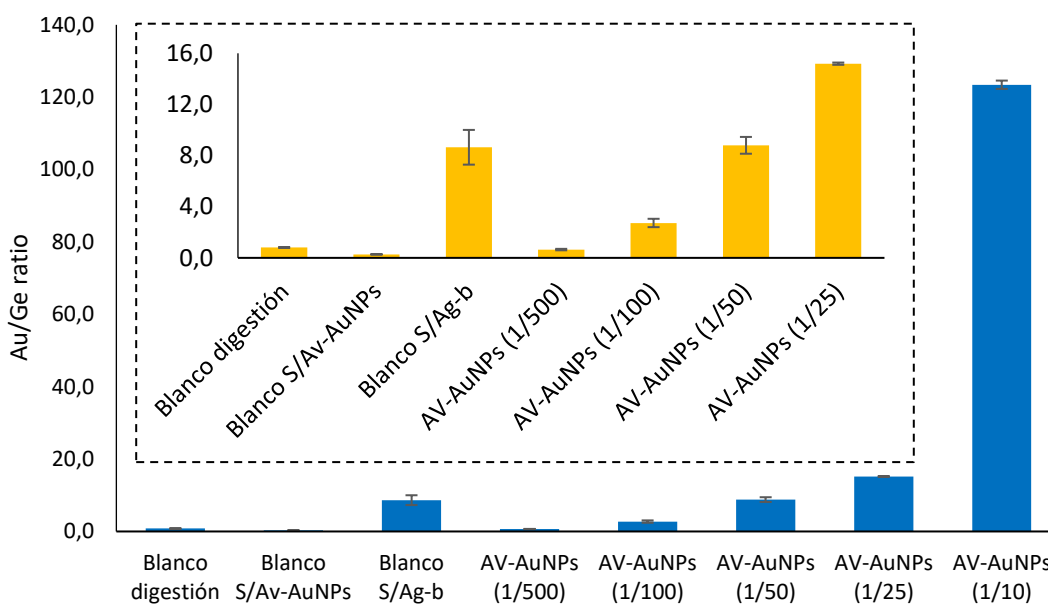


Figura B.4 Efecto de dilución de Av-AuNPs en el inmunoensayo asistido ICP-MS

Es de notar:

- Los blancos de digestión y en ausencia del reactivo AV-AuNPs son muy bajos en comparación a los demás ensayos.
- El blanco sin Ag-b (es decir, pura adsorción inespecífica del reactivo AV-AuNPs) es similar hasta la dilución 1/50 e inferior, lo cual es muy similar a lo encontrado previamente (la realidad es que en el ensayo anterior se diferenciaban mejor con esta dilución). A partir de 1/25 y mucho más en la dilución 1/10, es posible diferenciar claramente el blanco de una muestra con Ag-b.
- Esto es un resultado negativo, considerando lo costoso del reactivo y que apenas trae disponible 1 mL, lo cual implicaría un muy rápido consumo.

En cuanto a la etapa de bloqueo (Figura B.4):

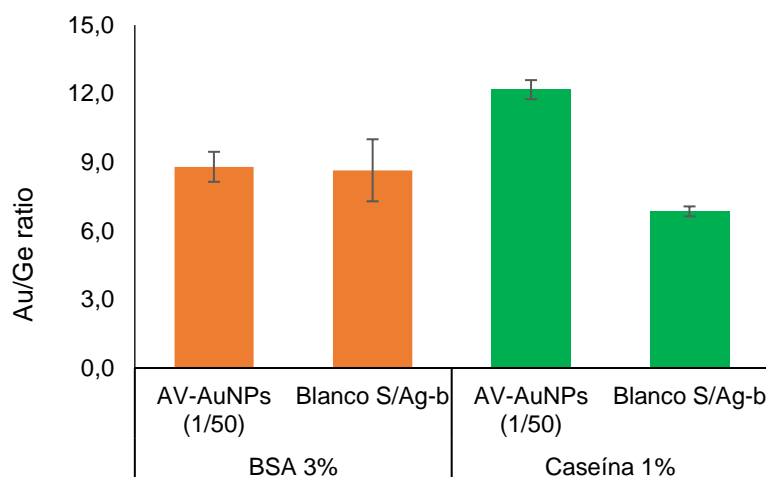


Figura B.4 Efecto de reactivo de bloqueo en el inmunoensayo asistido ICP-MS

Se observa como el bloqueo con caseína permite diferenciar mejor la señal del blanco en comparación al ensayo realizado con el AV-AuNPs (1/50). Lo cuál indica que este reactivo puede ser usado con mejor eficiencia para la etapa de bloqueo del inmunoensayo. En cuanto al balance de masas, se muestra en la Tabla B.2 y Figura B.5.

Tabla B.2. Balance de masas en el inmunoensayo asistido por AV-AuNPs e ICP-MS

Bloqueo	Muestra	Au/Ge prom	DS
BSA 3%	AV-AuNPs (1/50)	8,80	0,66
	Solución despues inmuno	82,87	10,10
	Lavados	1,75	0,31
	Reactivo sin ELISA	105,97	0,00
Caseína 1%	AV-AuNPs (1/50)	12,18	0,42
	Solución despues inmuno	86,23	1,23
	Lavados	1,40	0,01
	Reactivo sin ELISA	105,97	0,00

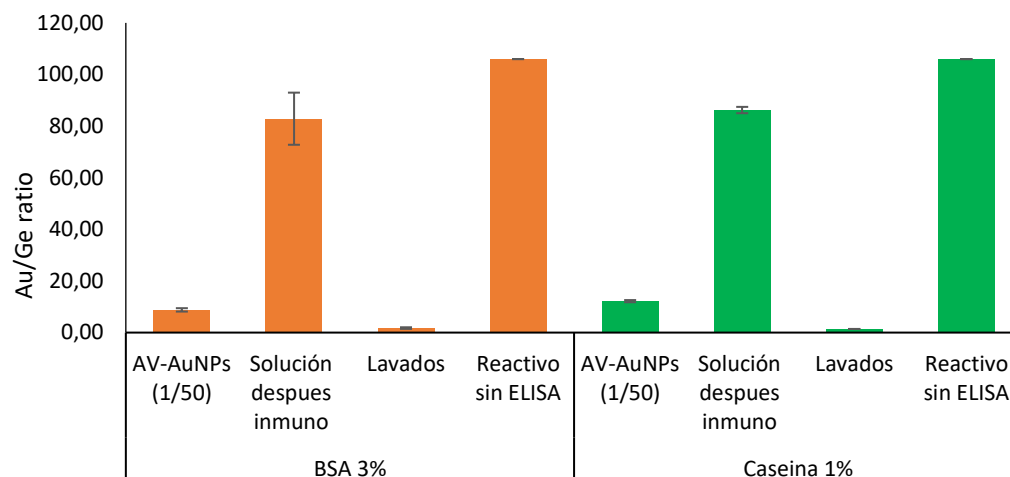


Figura B.5. Balance de masas del inmunoensayo asistido por AV-AuNPs e ICP/MS

Se hizo el estudio de balance de masas para el ensayo con el reactivo AV-AuNPs con dilución 1/50. Se encontró que aproximadamente el 10% del reactivo se quedaba adherido en el inmunoensayo y lo demás era desechado después de la incubación y las etapas de lavado. Originalmente se pensó que era un resultado negativo, pero al igual que un caso anterior, a futuro los resultados obtenidos son peores que estos. Lo que indica que usar este reactivo no fue del todo incorrecto.

Caracterización del reactivo AV-AuNPs por AF4-MALS-ICP-MS/MS

Se pudo realizar la separación por masas moleculares del reactivo AV-AuNPs y las nanopartículas de oro (AuNPs) con el sistema AF4-MALS. Sin embargo, al hacer el acoplamiento con el ICP-MS/MS no fue posible cuantificar el S debido a la poca cantidad que contiene la avidina de este elemento.

C. Inmunoensayo con SAV-AuNPs:

Importante: Luego de analizar los resultados anteriores se decidió cambiar el reactivo de reconocimiento utilizando *streptavidina* bioconjugada con las nanopartículas de oro (SAV-AuNPs). A diferencia del caso anterior, este reactivo fue preparado con BSA como sistema de bloqueo para intentar disminuir las adsorciones inespecíficas.

Estudio de dilución de reactivo SAV-AuNPs (1/25 y 1/100), blancos y reactivo de bloqueo

En cuanto al efecto del sistema de bloqueo, la caseína al 1% no fue muy efectiva en este caso, no se logró diferenciar entre la señal del blanco y los inmunoensayos a ambas concentraciones del reactivo estudiadas. Además, considerando que el reactivo ya contiene BSA, se asumió que éste era mucho más conveniente para el bloqueo.

En cuanto a los resultados con BSA, en primera instancia se observaron resultados parecidos al obtenido con la caseína, no había diferencia entre el blanco y las muestras del inmunoensayo a las dos concentraciones del reactivo en estudio. Sin embargo, al observar tan baja señal (cuentas por segundo, cps) de oro en el ICP-MS, se decidió medir la muestra directamente luego de la digestión ácida, es decir, sin hacer una dilución de las muestras (Figura B.6).

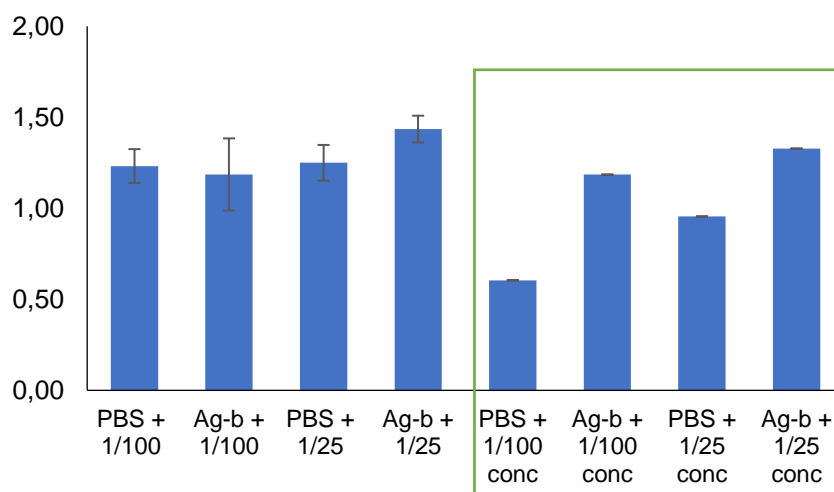


Figura B.6 Efecto de dilución de reactivo SAV-AuNPs y de solución final previo análisis por ICP-MS

Al ver los resultados observamos una diferencia (no muy grande) de la señal del blanco (sin reactivo Ag-b, hecho con PBS) y la muestra que contiene 100 ng/mL de Ag-b. Siendo la diferencia mucho mayor para el caso del reactivo diluido 100 veces.

Además, se realizó un balance de masas del inmunoensayo y se encontró que alrededor del 1% es sólo lo que reacciona del reactivo con el Ag-b, el resto se descarta en los lavados. Esto es de esperarse considerando que en este caso el reactivo se encuentra bloqueado con BSA, lo que probablemente este impidiendo la unión SAV-biotina (Figura B.7).

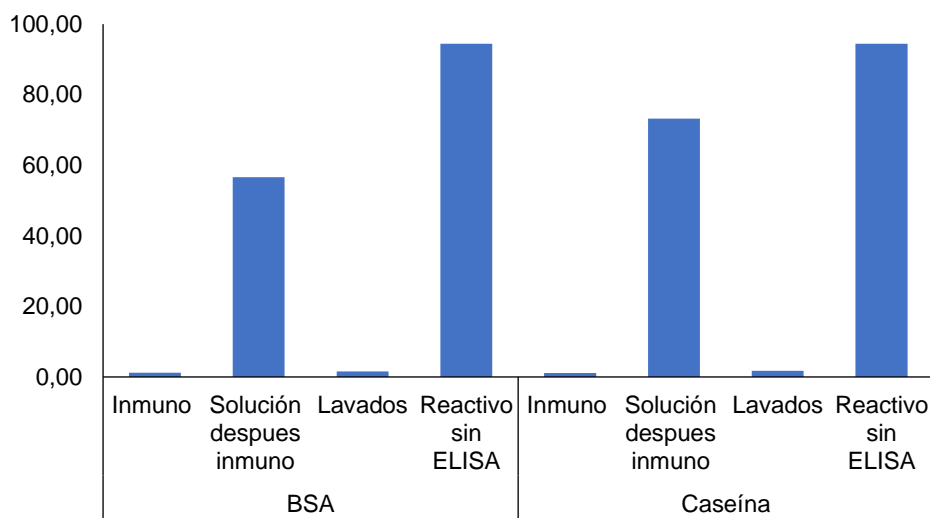


Figura B.7. Balance de masas del inmunoensayo asistido por SAV-AuNPs e ICP/MS

Estudio de disminución de concentraciones de Ag-b y SAV-AuNPs

Con el propósito de evidenciar posibles mejoras a la dilución 1/100, se realizaron ensayos a distintas concentraciones de Ag-b (0; 0,01; 1 y 100 ng/mL) y distintas concentraciones del reactivo SAV-AuNPs (1/50, 1/100 y 1/250). Los resultados se muestran a continuación:

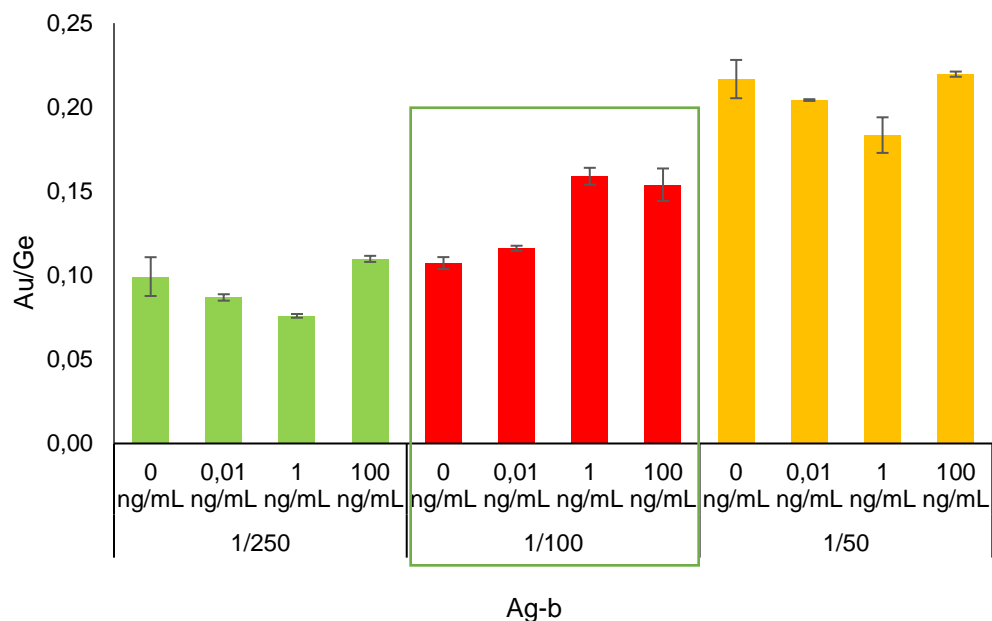


Figura B.8. Efecto de concentraciones de Ag-b y diluciones de SAV-AuNPs para el inmunoensayo por ICP-MS

Se puede destacar lo siguiente:

- El reactivo con dilución 1/100 parece tener un mejor comportamiento con respecto a las otras dos diluciones, considerando que es posible diferenciar mejor entre las muestras más concentradas (1 y 100 ng/mL) del blanco.
- Para el reactivo diluido 50 y 250 veces se observar que no es posible diferenciar entre la muestra más concentrada (100 ng/mL) y los blancos.
- Se podría pensar en utilizar la dilución 1/100, pero la diferencia en señal es muy pequeña (alrededor de 6000 cps para el blanco y 7500 cps para la muestra a 1 ng/mL).

Estudio de efecto de la temperatura de incubación del inmunoensayo en la reacción con SAV-AuNPs. Curva de calibrado de estándares

Este ensayo se hizo con el propósito de evaluar si era posible disminuir las adsorciones inespecíficas disminuyendo la temperatura de incubación. Los resultados se muestran en la Figura B.9.

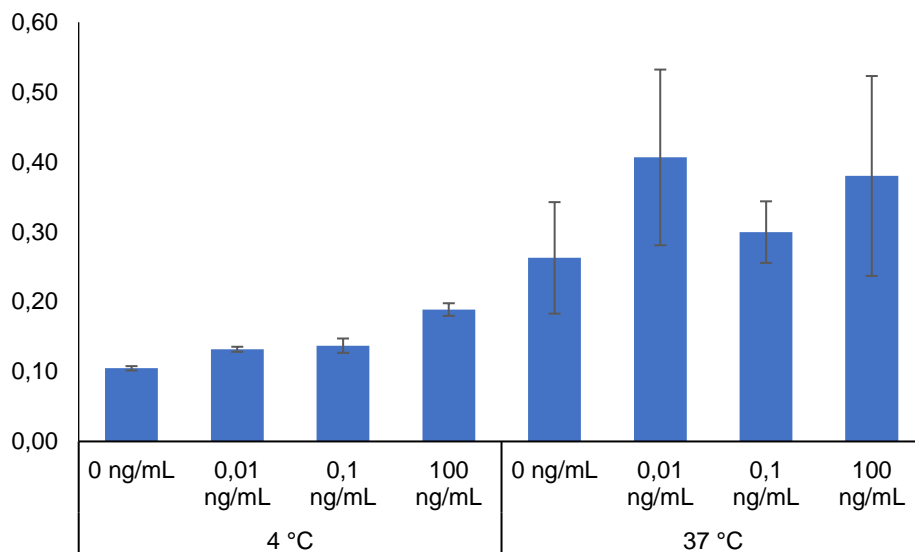


Figura B.9 Efecto de la temperatura en el inmunoensayo asistido por SAV-AuNPs e ICP/MS

Este resultado muestra que a 4°C la reacción no es favorable ya que hay una considerable disminución de la señal para el caso de todas las muestras. Además, que a 37°C no se pudieron extraer datos concluyentes para la gran dispersión de las medidas de las réplicas de cada muestra.

Se inyectaron distintas concentraciones de estándares de oro para estimar que cantidad se está uniendo en el inmunoensayo. Considerando los valores obtenidos en el inmunoensayo (alrededor de Au/Ge de 0,40), se puede evidenciar interpolando en la curva, que menos de 1 ng/mL (ppb) es lo que está reaccionando en el inmunoensayo, es por ello por lo que las señales encontradas son tan bajas. La curva de calibrado se muestra en la Figura B.10.

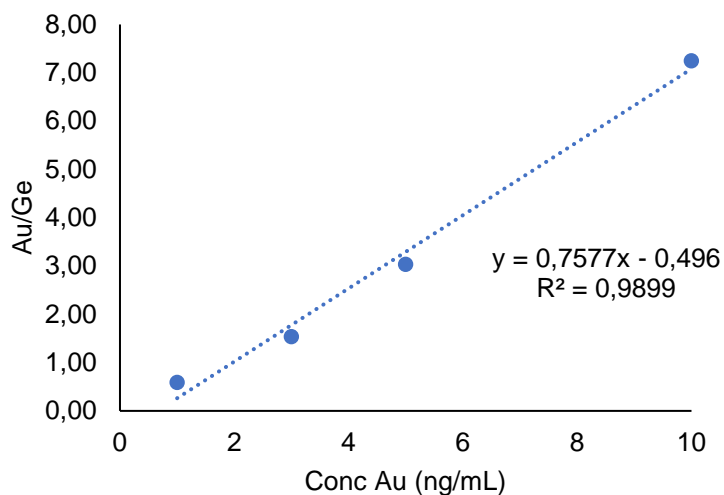


Figura B.10. Curva de calibrado de estándares de oro

Repetición ensayo con reactivos por método espectrofotométrico y efecto de solución usada para la dilución de la SAV-AuNPs

Debido a que aún no se encontraban resultados del todo satisfactorios, se decidió hacer pruebas con los reactivos para evaluar si se encontraban en óptimas condiciones. Para ello se repitió el ensayo espectrofotométrico, y al mismo tiempo se hacían ensayos para ser medidos por ICP-MS. Los de ICP-MS se evaluaron diluyendo el reactivo de dos maneras, con PBS y con el Buffer 1X que trae el kit (con el que diluyen todos los reactivos del kit comercial de kisspeptina-10). En cuanto al ensayo por espectrofotometría, se muestran los resultados en la Figura B.11.

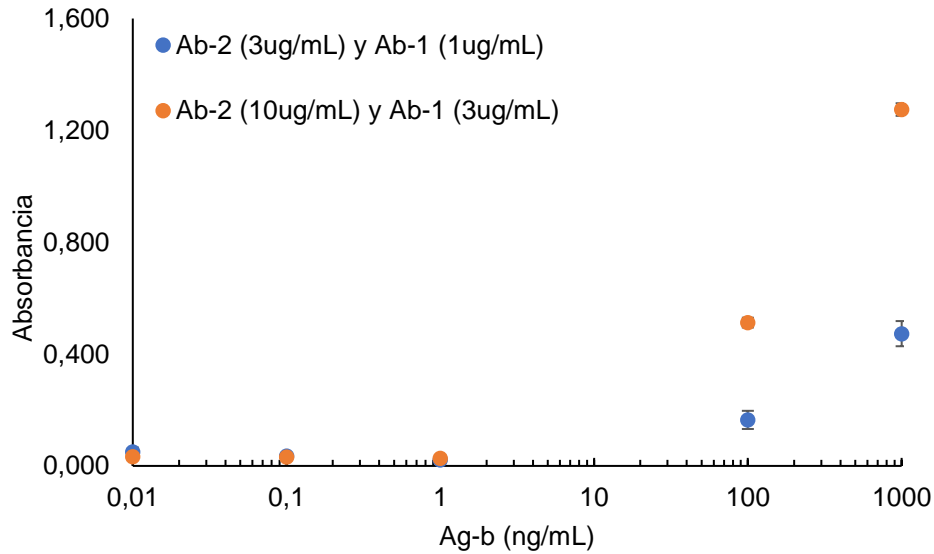


Figura B.11. Repetición de curva no competitiva para el inmunoensayo por espectrofotometría

La curva no competitiva no tiene el mismo comportamiento al encontrado previamente (a principios de este informe). No existe un punto máximo de absorbancia en el inmunoensayo lo cual podría indicar el porqué de los errores encontrados. Quizás se está trabajando a una concentración de Ag-b no adecuada. Por otro lado, los resultados medidos por ICP-MS (Figura B.12) muestra lo siguiente:

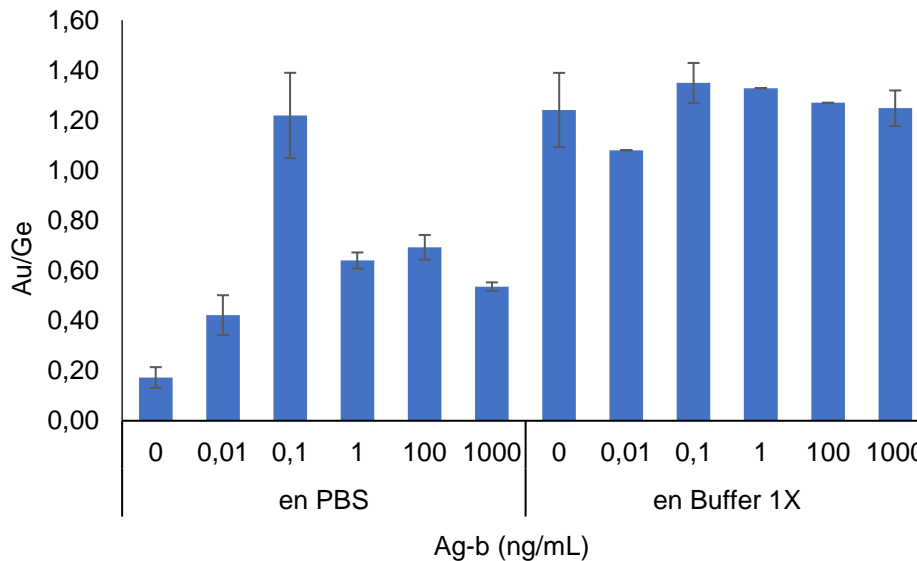


Figura B.12. Repetición de curva no competitiva para el inmunoensayo asistido por SAV-AuNPs e ICP/MS

De la Figura B.12, lo primero a destacar es que el reactivo buffer 1x no es adecuada para diluir la SAV-AuNPs, prácticamente se obtuvo una misma señal a distintas concentraciones del Ag-b. Por otro lado, parece haber resultados favorables con la dilución en PBS del reactivo (la cual se siguió trabajando a 1/100 de dilución). Existe un dato anómalo a 0,1 ng/mL que probablemente sea un error experimental. Si estos resultados se evalúan desde el punto de vista de un gráfico de inmunoensayo (logarítmica) se obtiene la Figura B.13 (restando el valor del blanco):

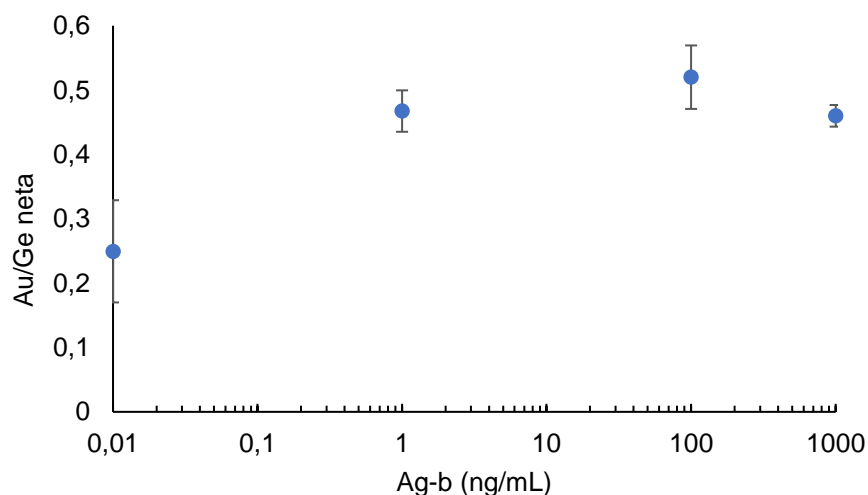


Figura B.13. Curva de inmunoensayo competitiva con SAV-AuNPs diluída en PBS

Otra forma de verlo es a través de la Figura B.14.

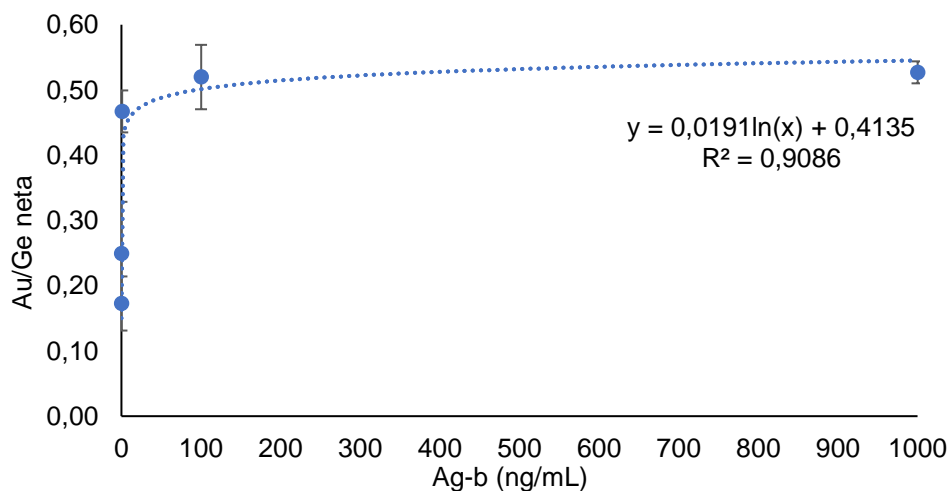


Figura B.14. Curva de inmunoensayo competitiva con SAV-AuNPs considerando logaritmos

En este punto se puede resumir lo siguiente:

IMPORTANTE: La principal diferencia a la cual se puede atribuir las mejoras en los resultados, es que todas las soluciones fueron preparadas de nuevo de alícuotas de los reactivos recién descongeladas.

Se obtuvieron mejores resultados para el caso de las medidas por ICP-MS. Solo unos de los valores (0,1 ng/mL) se salió de la tendencia y por ende fue eliminado para elaborar las últimas dos gráficas.

En el caso del espectrofotométrico se observa una tendencia distinta a la encontrada por ICP-MS (en cuanto a la forma de la curva se refiere), lo que indica la diferencia clara entre realizar la metodología por las distintas formas de detección. Se hizo necesario repetir los experimentos nuevamente, además de agregar puntos adicionales al calibrado que son necesarios.

Repetición de resultados incluyendo etapa de amplificación con oro

Se realizaron los mismos resultados anteriores considerando la dilución 1/100 del reactivo SAV-AuNPs y se añadieron nuevos puntos a la curva de calibrado. Los ensayos se hicieron en dos grupos de duplicados, de manera que a uno de ellos se le hiciera la amplificación depositando oro sobre la nanopartícula.

Para la amplificación con oro se añaden 50 μ L $\text{NH}_4\text{OH.HCl}$ (10mM) y 50 μ L de una solución de Au (III) 0,5 mM y se incuba por 15 min a 37°C. Este proceso se hace luego de la incubación con el reactivo SAV-AuNPs y previo a la digestión con agua regia. Lavar los pocillos con agua (no usar PBS) y digerir los pocillos para luego medir por ICP-MS.

No se encontraron resultados satisfactorios, no se pudo reproducir lo anterior y en cambio no hubo diferencia entre la señal del blanco y las muestras a distintas concentraciones. Esto indica errores ejecutados durante la metodología.

A continuación, se muestran ambos resultados, sin (Figura B.15) y con amplificación con oro (Figura B.16):

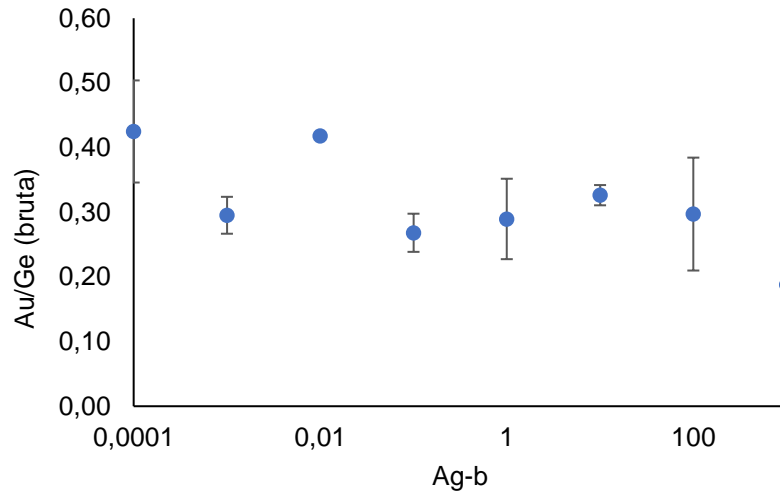


Figura B.15. Curva de inmunoensayo no competitivo por ICP-MS y sin amplificación con oro

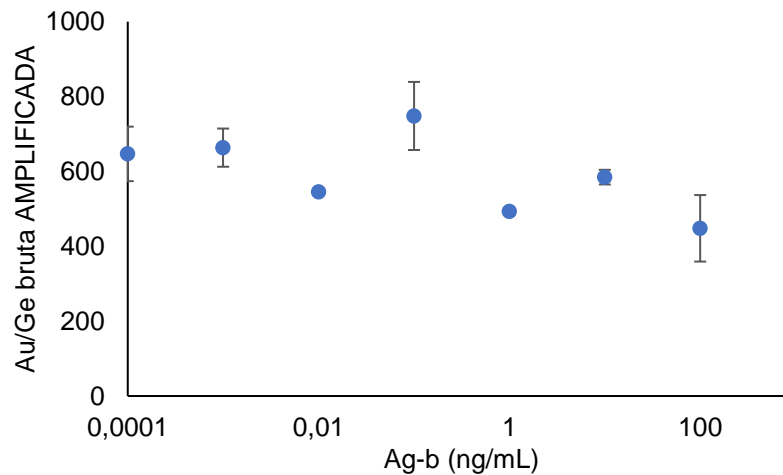


Figura B.15. Curva de inmunoensayo no competitivo por ICP-MS y con amplificación con oro

Los resultados no satisfactorios se atribuyen a que la placa ELISA no fue agitada durante la digestión ácida. Se sugiere a futuro usar siempre el agitador de placas, o en su defecto usar un ultrasonido para la digestión (sugerido en un paper anterior del laboratorio). Lo que es evidente es que la amplificación aumenta hasta 2000 veces la señal de oro observada. Lo que indica la gran utilidad de este paso si se quiere aumentar la sensibilidad del método analítico. Se podría intentar disminuir el tiempo de incubación de la amplificación.

Se debe reproducir los experimentos anteriores con soluciones frescas de los reactivos, además de hacer en paralelo tanto el ensayo espectrofotométrico como el realizado por ICP-MS. En la Tabla B.3 se resumen las condiciones experimentales para la construcción del inmunoensayo asistido por NPs e ICP-MS.

Tabla B.3. Condiciones experimentales para el inmunoensayo asistido por NPs e ICP-MS

Etapa	Procedimiento
Tapizado (Ab-2)	100 μ L / pocillo de [Ab-2]:3 μ g/mL, 1)1h a 37°C y 2) Toda la noche nevera
Bloqueo	150 μ L / pocillo BSA 3%, 2h a 37°C
Lavado	150 μ L / pocillo de PBS (10mM) / T20 (0,05%) x triplicado
Unión Ab-1	100 μ L / pocillo de [Ab-1]= 1 μ g/mL, 2h a 37°C
Lavado	150 μ L / pocillo de PBS (10mM) / T20 (0,05%) x triplicado
Inmunoensayo	100 μ L / pocillo de Ag-b (no competitivo), Ag-b/Ag (competitivo)
Lavado	150 μ L / pocillo de PBS (10mM) / T20 (0,05%) x triplicado
Reacción con SAV-AuNPs	100 μ L / pocillo de SAV-AuNPs (1/100 en PBS), 1 h a 37°C
Lavado	150 μ L / pocillo de PBS (10mM) / T20 (0,05%) x triplicado
Amplificación	50 μ L NH ₄ OH.HCl (10mM) y 50 μ L Au (III) 0,5 mM / pocillo, 15 min a 37°C
Lavado	150 μ L / pocillo de H ₂ O destilada x triplicado
Digestión ácida	100 μ L / pocillo de agua regia, agitación de placa 300 rpm x 30 min
Solución final	Trasvasar a un tubo de 12 mL y 5 mL de agua destilada (con 15 ppb de Ge)
Medición	Medir Au masa 197 y Ge (IS) masa 72 por ICP-MS



Simultaneous determination of multiresidue and multiclass emerging contaminants in waters by rotating-disk sorptive extraction–derivatization–gas chromatography/mass spectrometry

Daniel Arismendi^{a,**}, Mercedes Becerra-Herrera^b, Inmaculada Cerrato^a, Pablo Richter^{a,*}

^a Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Pharmaceutical Sciences, University of Chile, P.O. Box 233, Santiago, Chile

^b Department of Chemistry, Faculty of Sciences, University of Chile, P.O. Box 653, Santiago, Chile

ARTICLE INFO

Keywords:

Multiresidue
Emerging contaminants
Optimal derivatization
Rotating-disk sorptive extraction (RDSE)
Water samples

ABSTRACT

An efficient method has been developed for the multiresidue and multiclass determination of 16 emerging contaminants (parabens, hormones, anti-inflammatory drugs, triclosan and bisphenol A) in water samples using rotating-disk sorptive extraction (RDSE) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Silylation of the compounds prior to GC-MS analysis was optimized using a factorial experimental design; the optimal derivatization conditions to maximize the response of the set of analytes included 70 μL of N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide at 80 °C for 35 min. RDSE was implemented using Oasis[®] HLB as a sorptive phase and an extraction time of 60 min.

The method was applied to Chilean environmental samples. In tap water, none of the analytes under study were detected. In the river and well waters, the concentrations of the four detected contaminants were below 0.38 $\mu\text{g L}^{-1}$. In the effluent and influent of the wastewater treatment plant, the maximum concentrations of contaminants were 3.1 and 4.2 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively.

The proposed analytical strategy suggests clear improvements with respect to other methods reported in the literature, considering not only the different steps involved in the analytical process (extraction, derivatization and chromatography) but also taking into account that this method involves the determination of different families of analytes with different physicochemical and structural properties.

1. Introduction

Emerging contaminant (EC) refers to any chemical discovered in the environment that is not persistent; however, the presence of such chemicals is permanent due to continuous introduction from diverse uncontrolled sources. These compounds are found in natural sources because their purchasing, consumption and use are not regulated by any legislation; therefore, treatment plants do not emphasize or are not qualified for their elimination [1].

ECs consist of many compounds of anthropogenic and natural origin, including personal-care and industrial products, pharmaceuticals, pesticides, hormones, industrial chemicals, among others [2]. Occurrence of these contaminants in natural waters has become a problem of concern at global level, mainly because they have potentially negative effects on organisms, which would appear in future generations and result in irreversible damages [3]. The presence of

these chemicals in the environment depends on many factors, including the frequency and amount of doses and the effectiveness of excretion, as well as sewage treatment plants. Some ECs (v.e. bisphenol A, triclosan, 17 α -ethinylestradiol and 17 β -estradiol) are classified also as endocrine-disrupting chemicals (EDCs) because they have the potential to modify normal endocrine system functions [4].

Natural waters are increasingly exposed to ECs since the conventional wastewater treatment plants were not designed for the removal of these kind of contaminants [5]. In this context, ECs have been determined in a number of environmental matrices such as: freshwater [6], seawater [7], drinking water [8], wastewater [9], sewage sludge [10], sediments [11], and biota [12] ranging in concentrations levels from ng L^{-1} to $\mu\text{g L}^{-1}$ [13]. Although many of these compounds affect health, there are still no regulations for their disposal in the environment.

To study their presence and the potential risk, different techniques

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: daniel.arismendi3@gmail.com (D. Arismendi), prichter@ciq.uchile.cl (P. Richter).

for sample preparation of waters containing emerging pollutants have been commonly used, such as stir-bar sorptive extraction (SBSE) [14], liquid–liquid extraction (LLE) [15], solid-phase microextraction (SPME) [13] solid-phase extraction (SPE) [13] and headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) [16]. However, many of these techniques present drawbacks, including the use of high sample volumes (SPE and LLE), the limitation of the sorbent phase to commercially available fibers (SPME) and the deterioration of the extraction phases supported on the devices with use (SBSE). Rotating-disk sorptive extraction (RDSE) [17] is an alternative microextraction technique with the following premises: the use of low sample volumes, a configuration of the device allowing the incorporation of laminar and powder phases with different polarities (high versatility), and the lack of device deterioration during the extraction since the extracting phase is not in contact with the extraction container. Taking advantage of the versatility of RDSE, different families of emerging pollutants have been studied [18,19]; however, this is the first time RDSE has been used to perform a multiresidue and multiclass analysis to determine multiple families of compounds simultaneously. Only one multiresidue RDSE method has been previously reported but was based on the analysis of pesticides using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [20].

The determination of multiple emerging pollutants can be performed by liquid chromatography-mass spectrometry [10,13,15] and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) [14,16,21], with the latter being much more accessible in terms of cost, favoring its availability in routine laboratories. The main limitation of GC-MS is that in some cases, derivatization of the analytes is mandatory [21,22]. In this work, considering the determination of different analyte families, the silylation reaction was studied in detail using experimental design as a chemometric tool [23]. For the extraction process using RDSE, the optimum sorbent phase and extraction time were evaluated.

The aim of this study was to develop a rapid, reliable and sensitive method for the determination of emerging pollutants in water samples by RDSE-derivatization-GC-MS. In general, previously described methodologies for these analytes have focused only on specific analysis for limited chemical families of pollutants [18,19]. To the best of our knowledge, the development of such multiresidue, interfamilial methods, including the analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), parabens, natural and synthetic hormones, bisphenol A and triclosan, has not been proposed previously. Finally, the method was applied for the analysis of drinking and natural water samples near the city of San Antonio, Chile and the effluent and influent of a wastewater treatment plant in Santiago, Chile.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Methyl paraben (MP), ethyl paraben (EP), propyl paraben (PP), butyl paraben (BP), estrone (E1), 17- β -estradiol (E2), estriol (E3), 17- α -ethinylestradiol (EE2), bisphenol A (BPA), triclosan (TCS) and PCB 77 (used as internal standard) were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). Ibuprofen (Ibu), ketoprofen (Ket), naproxen (Nap), diclofenac (Dic), mefenamic acid (MAc) and acetylsalicylic acid (AsA) were obtained from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, United States). Water from a Millipore Milli-Q Plus water system (Billerica, MA, United States) was used throughout the experiment. Standard stock solutions of the analytes (10 mg L⁻¹) were prepared separately in methanol (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, United States). Multistandard solutions were prepared in methanol at concentrations of 2, 5, 10, 25, 50 and 100 μ g L⁻¹. Nitrogen (99.995% purity) and helium (99.9999% purity) were purchased from Linde (Santiago, Chile) and were used for final extract evaporation and as the chromatographic carrier gas, respectively. Methanol, ethyl acetate, acetic acid (HPLC grades) and sodium acetate (> 99% purity) were purchased from

Merck (Darmstadt, Germany). Oasis[®] HLB, C18 and styrene-divinylbenzene (St-DVB) extraction cartridges were obtained from Waters Corporation (Milford, MA, United States). N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) and pyridine (pyr) obtained from Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, United States) were used as the derivatizing agent.

2.2. Instruments

A Thermo Scientific TRACE 1300 gas chromatograph (Milan, Italy) coupled to a Thermo Fisher Scientific ISQ (Austin, TX, United States) mass-selective detector was used for GC-MS determinations. A Restek (Bellefonte, PA, United States) RTX-5MS (30 m \times 0.25 mm i.d.; 0.25 μ m film thickness) was used as chromatographic column. Two microliters of sample extract were injected into the gas chromatograph using an injector temperature of 250 °C and splitless mode. The column temperature started at 75 °C (1 min), and it was increased to 150 °C at 20 °C min⁻¹ (5 min) and to 300 °C at 10 °C min⁻¹ (5 min). Helium was used as the carrier gas at 1.0 mL min⁻¹. The solvent delay was 7 min. A dwell time of 0.2 s was used for each m/z value. The MS transfer line and ion source were kept at 250 °C and 200 °C respectively, and compound quantification was based on matrix-matched calibration using the mass spectrometer in selective ion monitoring (SIM) mode. Table 1 shows the retention time and m/z ions used in SIM mode for each analyte.

The vial containing the sample and the rotating disk was placed on an MR 300 magnetic stirrer (Heidolph Instruments, Germany). The pH values were measured with a Microprocessor pH-Meter 537A (WTW, Germany). A KMC-1300V vortex mixer (Vision Scientific Co., Ltd., Korea) and an analog heat block evaporator (VWR, United States) were used for the derivatization reaction.

Statistical software (Statgraphics Centurion XV for Windows; Manugistics, United States) was used for both chemometric designs and the analysis of variance (ANOVA) of the results.

2.3. Derivatization procedure

An aliquot of 100 μ L of a multistandard of 100 μ g L⁻¹ or a sample extract was added to a 2 mL vial. The solvent was evaporated under a N₂ stream. Aliquots of 70 μ L of derivatizing agent (MSTFA) and 50 μ L of pyridine were added and stirred on a vortex to homogenize the solution. The derivatization reaction was carried out on a heating plate at 80 °C for 35 min. After cooling, the derivatized solution was analyzed in GC-MS.

Three factors involved in the derivatization process, the volume of MSTFA, temperature, and reaction time, were optimized using an experimental design. The repeatability of the final selected derivatization

Table 1
GC-MS data.

Analyte	Retention time (min)	Target ion m/z values	Qualifier ion m/z values
MP	9.61	209	224
AsA	10.05	267	268
EP	11.19	238	223
Ibu	12.31	234	278
PP	13.06	210	195
BP	14.66	195	210
Nap	18.48	302	287
TCS	19.02	200	345
BPA	19.63	357	358
MAc	19.70	298	313
Ket	19.70	311	282
Dic	20.59	214	242
E1	23.44	257	342
E2	23.67	285	416
EE2	24.53	425	440
E3	25.17	345	504

method was evaluated from six replicate samples. The stability of derivatized samples was assessed by injecting the same sample repeatedly over a period of 30 h.

2.4. Rotating-disk sorptive extraction (RDSE)

The extraction device used in RDSE was a Teflon disk (1.5 cm diameter) containing an embedded miniature magnetic stirring bar (nickel-coated Micro Stir bar, Ningbo Xinghan Trading Co., LTD, China). The disk had a 0.44 cm³ cavity on one of its faces, in which 40 mg of Oasis[®] HLB sorbent was loaded. The cavity was covered with a fiberglass filter (1.4 diameter, 0.38 μm mean pore size) and sealed with a Teflon ring. Before analysis of the samples, the phase was conditioned by rotation of the disk sequentially in vials containing 5 mL ethyl acetate, 5 mL methanol, and 5 mL deionized water for 5 min each. The same aliquot of each solvent was reused for the conditioning of all disks [19,24].

A 20 mL aliquot of water sample was poured into a vial and adjusted to a pH of 5.8 with an acetate buffer. The rotating disk conditioned was placed inside the vial, and the disk was rotated using a rotation velocity of 3000 rpm for 60 min at room temperature. After extraction, the disk was placed into other vial containing 10 mL of methanol as a desorbing agent and stirred for 10 min at 2000 rpm. The methanol extract containing the concentrated analytes was then evaporated under a N₂ stream to dryness. The extract was derivatized by the previously optimized derivatization method and analyzed by GC-MS in SIM mode.

A flow chart of the whole analytical procedure is summarized in Fig. 1.

2.5. Method validation

The method was validated by determining the main figures of merit, including [25] linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ), repeatability (%RSD), matrix effect (%ME), absolute recovery (%Re) and enrichment factor (%EF). The linearity of the calibration curve was established using 6 spiked water samples at fortification

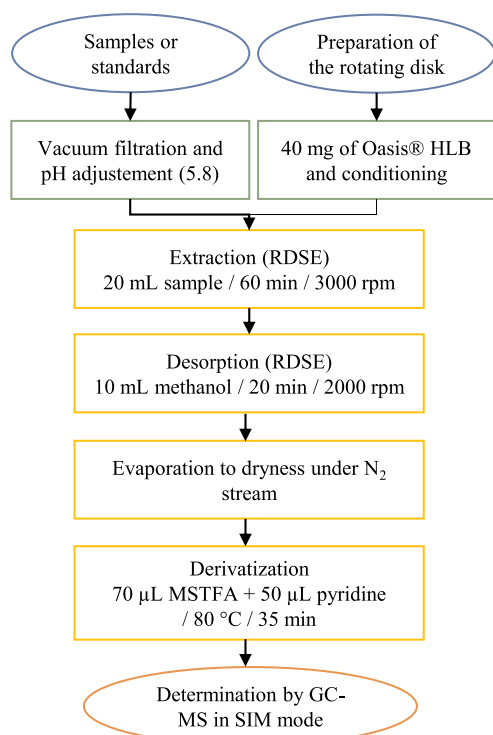


Fig. 1. Flow chart of the analytical procedure.

levels from 0.1 to 20 μg L⁻¹. Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were determined based on 3 times and 10 times the estimated standard deviation of the regression of a curve at low concentration (0.1–1 μg L⁻¹) and the slope of the calibration curve for each analyte. The repeatability of the final selected method was evaluated from six replicate samples prepared at 4 μg L⁻¹ in each matrix. The absolute recovery and matrix effect were calculated separately at an analyte concentration of 4 μg L⁻¹ according to the procedure described previously [26]. The enrichment factors (%EF) were calculated based on the relationship between the theoretical preconcentration factor and the absolute recovery.

2.6. Real samples

Drinking water and natural waters (well and river) were collected in the vicinity of San Antonio, Chile. Effluent and influent water was obtained from a water treatment plant in the city of Santiago, Chile. To preserve the samples prior to analysis, they were filtered and frozen at -18 °C. All samples were analyzed in triplicate.

3. Results and discussion

Table 2 shows the physicochemical properties of the compounds under study, which were chosen because they are a representative set of typical emerging contaminants and cover a wide range of acid-base properties, hydrophobicity and water solubility.

3.1. Chromatographic analysis

As shown in Fig. 2, all compounds eluted in approximately 25 min. The signals for the majority of the analytes are well resolved (resolution greater than 1.5), with the exception of mefenamic acid, bisphenol A and ketoprofen, which coelute. However, these compounds can be identified and quantified by considering the differences in their mass spectra (see Fig. A1, Supplementary Information). The adequate selection of noninterfering quantification and qualification ions allowed the identification and quantification of these analytes without interference.

3.2. Screening of the derivatization process

Three variables (*k*), the derivatization reaction temperature,

Table 2
Description of emerging contaminants under study.

Compound	Use	Molecular weight (g mol ⁻¹) ^a	pKa ^a	Log K _{o/w} ^a	Water solubility (mg L ⁻¹) ^a
MP	Preservative	152.15	8.50	1.96	2500
EP	Preservative	166.17	8.34	2.47	885
PP	Preservative	180.20	8.50	3.04	500
BP	Preservative	194.23	8.47	3.57	207
E3	Natural hormone	288.38	10.33	2.45	441
E1	Natural hormone	270.37	10.33	3.13	30
EE2	Synthetic hormone	296.40	10.33	3.67	11.3
E2	Natural hormone	272.38	10.33	4.01	3.6
AsA	NSAID	180.16	3.49	1.19	4600
Ket	NSAID	254.28	4.45	3.12	51
Nap	NSAID	230.26	4.15	3.18	15.9
Ibu	NSAID	206.29	4.91	3.97	21
MAC	NSAID	241.29	4.20	5.12	20
Dic	NSAID	296.15	4.15	4.51	2.37
TCS	Antibacterial	289.54	7.90	4.76	10
BPA	Plasticizer	228.29	9.60	3.32	120

^a Physical property data was provided in ChemIDplus by SRC, Inc.

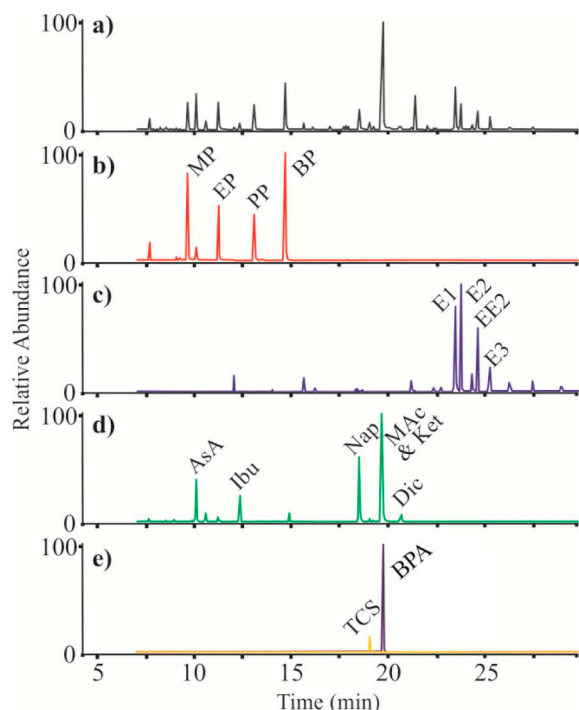


Fig. 2. (a) Total ion chromatogram of all compounds, (b) paraben chromatogram ($m/z = 195, 209, 223, 224, 238$), (c) hormone chromatogram ($m/z = 257, 285, 342, 345, 416, 425, 440, 504$), (d) anti-inflammatory drug chromatogram ($m/z = 214, 242, 234, 267, 268, 278, 282, 287, 298, 302, 311, 313$), and (e) TCS and BPA chromatogram ($m/z = 200, 345, 357, 358$).

reaction time and volume of MSTFA, were studied using a two-level screening factorial design (+1, -1) to select the most significant factors on the derivatization procedure. Several studies have been reported regarding the silylation reaction, including reaction times from 15 to 125 min and reaction temperatures from 25 to 95 °C [22,27,28]. In the current case, in this first exploratory study, the upper limits were set at 60 min and 80 °C, and the lower limits were set at 20 min and 40 °C for the reaction time and temperature, respectively. The same approach was used to determine the volume of MSTFA required for obtaining good derivatization of all analytes. The literature shows that different amounts of derivatizing agent have been used depending on the compounds under study. On the one hand, only 5 μL of derivatizing agent was used for the paraben family [21]; in contrast, there are studies where 50 μL was needed to derivatize NSAIDs and hormones [19,24]. Taking this information into account and considering the greater number of compounds (belonging to different compound families) studied in this research, the upper limit of MSTFA volume was set at 70 μL , and the lower limit was set at 30 μL (for more details, see Table A1, Supplementary Information). The influence of each factor was determined from the estimation of the experimental variance with a t-test, and the results are shown on a factor interaction graph with 95% confidence intervals.

Fig. 3 shows Pareto diagrams showing the significance of the factors for the derivatization of some compounds. For some cases, such as E2, none of the variables under study was significant. For butyl paraben, only one variable was significant. For other cases, such as triclosan and naproxen, the remaining two and three were significant for derivatization, respectively. The same behavior was observed for members of the same family (parabens and hormones). Other compounds do not have as clear a trend as do the mentioned families because the other compounds are less similar. Considering the results of this screening, the three factors should be optimized.

3.3. Optimization of the derivatization process

Response surface methodology (RSM) based on a Doehlert design for optimization of the derivatization step was then conducted based on the most significant factors [23]. The Doehlert design allows the description of a region around an optimal response that contains $k^2 + k + 1$ points for k variables. One of the properties of this design is the uniform distribution of the experiments in a three-dimensional space, allowing each factor to be assigned a particular number of levels according to the significance found in the screening stage. For example, considering that the MSTFA volume was the most significant variable for most compounds, 7 levels of study (X2) were assigned. Following this outline, 5 levels were assigned to reaction time (X1), and only three levels were assigned to reaction temperature (X3). For these three variables, a set of 15 experiments was performed (including 3 centers). The areas of the normalized peaks of the compounds were used as response variables. The coded (Xi) and experimental (real) values of these three factors are listed in Table A2, Supplementary Information.

Analysis of variance (ANOVA) was performed to assess the significance of the overall model and of each regression coefficient. Table 3 shows the prediction power of the model based on the significance of the regression models (p -value, regression/residual error), lack-of-fit (p -value, lack of fit/pure error), and adjusted coefficient of determination (R^2). The p -value for regression/residual error was lower than 0.05 for all compounds, demonstrating the feasibility of the model. On the other hand, the lack of fit test measures the suitability of the quadratic models by comparing the variation due to adjustment with the variation due to analytical error [21]; considering that the desired value is greater than 0.05, it is notable that all the compounds showed higher values. Finally, the R^2 adjusted value refers to the adjustment of the model with respect to the polynomial equation [29]; in this case, the majority of anti-inflammatories (except Ibu) presented good adaptation to the polynomial adjustment (greater than 70%). For the other compounds, mainly parabens and hormones, the adjustment to the polynomial equation was not ideal (between 33 and 55%) but was acceptable considering the large number of analytes with such different properties.

After evaluation of the response surfaces for each analyte, multi-criteria response surface optimization based on Derringer's desirability function was employed [30]. The desirability functions of the analytes were combined using the geometric mean (given equal importance to each of them), to obtain the overall desirability D . The overall desirability for all analytes was 0.93415. Fig. 4 shows the global response surface (volume of MSTFA vs. reaction time) at the highest temperature point (this value was used because it is the optimal condition for this factor). The optimal values extracted from this global response surface analysis were a reaction time of 35 min, a silylation temperature of 80 °C and an MSTFA volume of 70 μL .

The optimized derivatization method was linear ($R^2 > 0.99$) in the concentration range of 0.1–100 $\mu\text{g L}^{-1}$ for all compounds. The results of repeatability experiments ($n = 6$) at 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ for derivatization showed RSD values lower than 6% for all analytes, very acceptable values for this first step, considering that the next step is the extraction, which tends to generate greater imprecision to the methodology (detailed in the validation section of the method). A study of derivatization stability was performed for 30 h. The same sample was injected after the derivatization process (time 0) and after 4, 8, 16, 24 and 30 h. Some compounds, such as acetylsalicylic acid, bisphenol A and the paraben family (methyl, ethyl, propyl and butyl paraben), showed a 30% decrease in chromatographic area after 8 h (for more detail, see Fig. A2, Supplementary Information). This result is valuable information for ensuring the quality of the results when the methodology is applied to a high number of samples. In view of this, all the samples subjected to the methodology were derivatized and measured by GC-MS in a period no longer than 4 h.

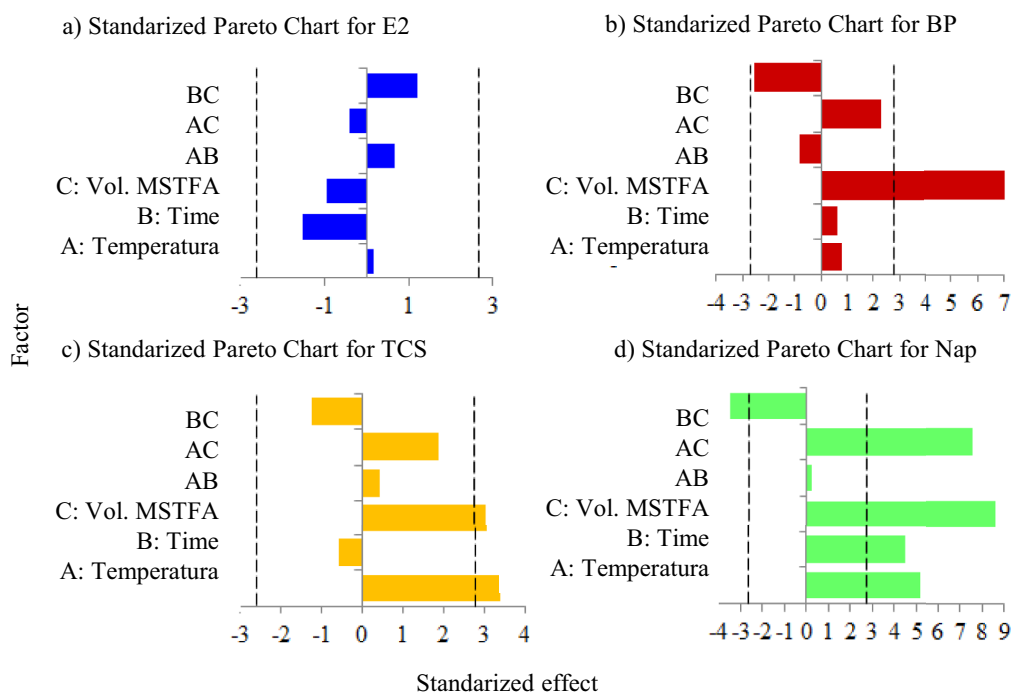


Fig. 3. Pareto chart of the main effects and related interactions. The vertical dashed line indicates the 95% confidence interval for a) E2, b) BP, c) TCS, and d) Nap.

Table 3

Analysis of variance for the suggested third-order Doehlert model.

Compound	ρ -value REG/RE	ρ -value LOF/PE	R ² adjusted (%)
MP	0.01	0.07	74.12
EP	< 0.01	0.06	85.21
PP	0.02	0.05	37.63
BP	0.01	0.06	52.19
E1	0.02	0.25	55.06
E2	0.03	0.08	45.55
E3	0.04	0.32	33.14
EE2	0.04	0.60	39.75
AsA	0.03	0.35	68.11
Ibu	0.02	0.06	34.79
Nap	< 0.01	0.40	80.72
MAc	0.04	0.23	72.95
Dic	0.01	0.36	74.59
Ket	< 0.01	0.69	85.68
TCS	< 0.01	0.67	77.68
BPA	0.01	0.69	74.70

REG: regression, RE: residual error, LOF: lack of fit, PE: pure error.

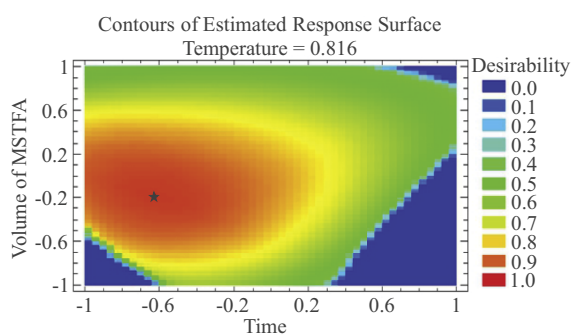


Fig. 4. Response surface of global desirability for the simultaneous derivatization of emerging contaminants.

3.4. Study of the extraction process

Taking into account previous experiences in RDSE [18,19,31], a 20 mL sample volume (theoretical preconcentration factor of 167) at pH 5.8 (adjusted with a buffer solution composed of acetic acid/sodium acetate) with a disk rotation velocity of 3000 rpm was selected for this optimization study. The studied variables for the extraction were the nature of the sorbent phase and the extraction time. The experiments were performed by using deionized water and real samples spiked with a known concentration of the analytes.

Considering the polarity of the analytes studied, different sorbent phases, including Oasis[®] HLB, styrene-divinylbenzene (St-DVB) and C18, were tested. An extraction time of 60 min was fixed to compare these three sorbent phases. As seen in Fig. 5, Oasis[®] HLB showed the highest extraction efficiency for all of the analytes, and this is because its hydrophilic-lipophilic balance enables to interact with the polar and apolar functional groups of the different analytes [18], achieving higher responses than those obtained with C18 and St-DVB. Despite this, St-DVB could be considered as an alternative phase because it provides similar areas for most of the analytes, except for MP and AsA, which was to be expected considering the high affinity that this phase has for semipolar and apolar compounds (only π - π interactions), which makes it impossible to extract highly water-soluble compounds. Thus, Oasis[®] HLB was selected as the sorbent phase for the extraction of the 16 compounds mentioned.

Considering the high cost associated with the Oasis[®] HLB, it is important to point out, that the use of nanomaterials as alternative sorbents can be considered in the future for RDSE, for example nanotubes [32] or nanoparticles [33], which have shown good performance in microextraction techniques.

Extraction times between 30 and 120 min were tested both to establish the extraction profile of each analyte and to select the extraction time for routine analysis. Fig. 6 shows the extraction profiles for four representative compounds in this study, MP, E1, AsA and BPA. Equilibrium was reached in 60 min of extraction; this time was selected for further studies.

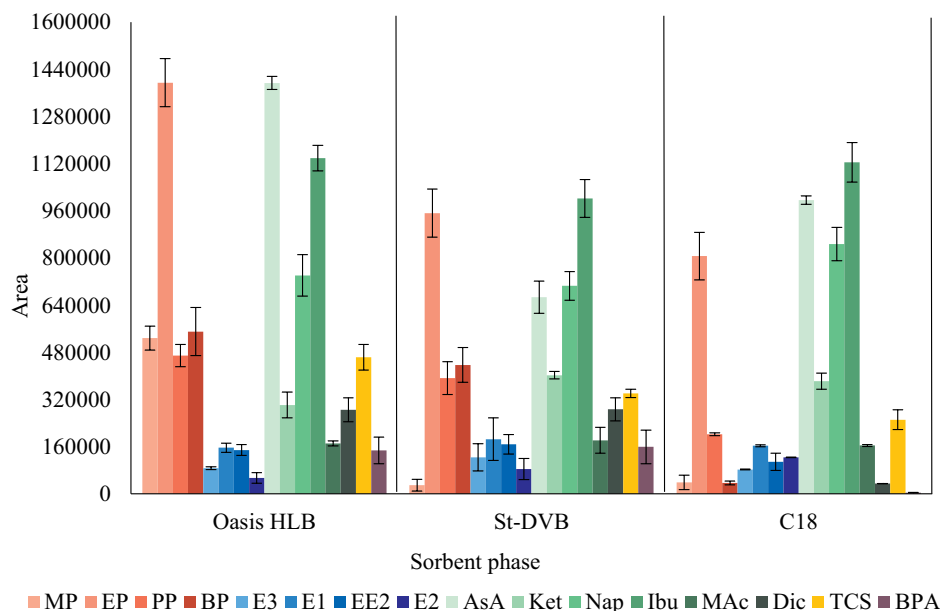


Fig. 5. Areas of 16 analytes using different sorbent phases.

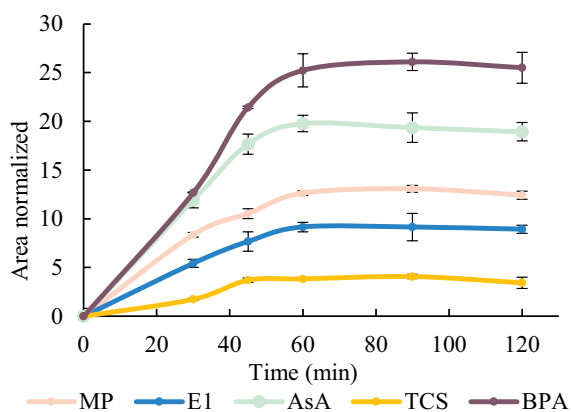


Fig. 6. Extraction profiles of MP, E1, AsA, and BPA.

3.5. Analytical features of the method

The method was validated by determining the following analytical features: sensitivity (calibration curve), linearity (R^2), precision, limits of detection and quantification (LOD and LOQ), recovery (%Re), enrichment factor (%EF) and matrix effect (%ME) (Table 4). GC-MS analysis was performed in SIM to improve the sensitivity and selectivity of the determination.

Intraday ($n = 6$) and interday ($n = 3$) precision, expressed in terms of the relative standard deviation (%RSD), were evaluated for each compound using different extraction disks with a concentration level of $4 \mu\text{g L}^{-1}$ in a water sample. As shown in Table 4, the values were consistently lower than 13 and 20%, respectively. The LODs and LOQs ranged from 0.02 to 0.15 and $0.06\text{--}0.44 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively, which were achieved through the enrichment factor (EF%) implicit in RDSE. Good absolute recoveries ($> 74\%$) were found for most of the analytes under study, particularly for the paraben family (MP, EP, PP, and BP), less-polar hormones (E1, E2 and EE2), some anti-inflammatories (Ibu

Table 4
Validation of the analytical method.

Analyte	Sensitivity ($\text{L } \mu\text{g}^{-1}$)	Linearity (R^2)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	%Re	%RSD		%ME	%EF
						Intraday ($n = 6$)	Interday ($n = 3$)		
MP	11039	0.9904	0.08	0.23	75	10	13	90	125
EP	5697.3	0.9960	0.07	0.20	74	11	12	83	124
PP	5450.7	0.9943	0.11	0.33	81	11	12	77	135
BP	9915.2	0.9949	0.04	0.11	97	12	16	74	162
E3	452.64	0.9968	0.07	0.21	38	9	16	51	63
E1	4642.4	0.9982	0.04	0.11	75	10	14	65	125
EE2	3066.7	0.9935	0.07	0.21	79	9	16	45	132
E2	4068.7	0.9929	0.04	0.11	80	13	15	48	134
AsA	17547	0.9994	0.03	0.10	11	7	16	61	18
Ket	340.95	0.9911	0.15	0.44	82	8	17	38	137
Nap	3150.1	0.9996	0.07	0.20	31	11	15	58	52
Ibu	2499.4	0.9966	0.03	0.08	75	10	15	74	125
MAc	1312.7	0.9965	0.09	0.27	30	11	14	74	50
Dic	1413.9	0.9898	0.04	0.12	33	11	20	33	55
TCS	4757.9	0.9971	0.07	0.21	44	10	16	54	73
BPA	6118.6	0.9989	0.02	0.06	94	10	18	61	157

and Ket), and BPA. Lower absolute recoveries were obtained for compounds such as AsA, E3, Nap, MAc, Dic and TCS (11–44%). It is important to point out that RDSE is a non-exhaustive extraction technology based on the partition equilibrium, similarly to other microextraction techniques previously described (SPME, SBSE), which means that after the extraction equilibrium has been achieved a significant portion of the analytes usually remain in the water sample. Taking this into account, absolute recoveries lower than 50% are common in this type of techniques, allowing quantitation of the analytes in the sample by using matrix-matched calibration.

In this context, to compensate for matrix effects, the calibration curve was obtained using spiked water samples at six concentration levels (matrix-matched calibration). The matrix effect (%ME) was measured in river water samples; values close to 100% indicated a low matrix effect, and the opposite (close to 0%) reflected a high matrix effect. For most of the compounds, a low matrix effect was observed; however, greater matrix effects were determined for Dic (33%), Ket (38%), EE2 (45%) and E2 (48%).

3.6. Real sample analysis

Different water samples (tap, river and well waters) were taken from San Antonio, Chile to evaluate the applicability of the methodology. In addition, effluent and influent samples were taken from a wastewater treatment plant in the city of Santiago, Chile.

Table 5 summarizes the concentrations found in the waters studied. In tap water, none of the analytes under study was detected. In well-1, the presence of EP and AsA was detected, but the concentrations were not quantified (< LOQ). In well-2 and river waters, it was possible to quantify these two analytes, with concentrations not higher than 0.38 and 0.28 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. This is the first time that concentrations of these compounds have been reported in these specific matrices. In the effluent and influent samples, the same analytes were detected. In addition, triclosan and naproxen were quantified in both kinds of waters, and ibuprofen was quantified in influent water. In these waters, the maximum concentrations of CEs found were 3.1 and 4.2 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively.

Similar concentrations of AsA, Nap, Ibu and TCS have been found [34–37] in North American, European and African countries. It should be stressed that according to the results, the concentrations of emerging contaminants in natural waters in the San Antonio region are lower than the concentrations found in the wastewater effluent of the city of Santiago, perhaps due to the effects of dilution and degradation of the compounds or absorption in sediments, sludge, plants, fish or other living organisms during their natural transport.

3.7. Comparison with other methodologies

These contaminants have been quantified in different regions of the world in similar types of samples; however, different analytical methods measuring each analyte family separately have been used. Table 6 summarizes previous studies related to the determination of these analytes. First, large volumes of derivatizing agent were used to ensure the complete derivatization of all the analytes [38], which demonstrated poor repeatability (RSD 12–40%) due to the lack of catalyst

in the reaction. In contrast, it has been reported that the use of pure derivatizing agents was sufficient to derivatize all analytes with good repeatability (RSD 6–9%) [39]; however, the referenced work did not involve hormones, which undergo the most steric hindrance in this type of derivatization (silylation). Taking this into account, pyridine has been used as a mediator of these reactions [40]; however, high sample volumes and high extraction times were necessary for the use of SPE. Alternatively, other methodologies have emerged that use two different derivatization procedures [41,42] and two techniques (GC and LC) [4] for a set of analytes, one for compounds with phenolic groups and another for more acidic compounds, which causes the use of more derivatizing agents and equipment and increased work times.

In the present study, the derivatization process was optimized, ensuring the complete simultaneous derivatization of all 16 analytes in different families of compounds; in addition, efficient extraction was performed with RDSE for 60 min and 3000 rpm, with analysis by GC-MS in 25 min and a method RSD between 6 and 13%.

Recently, other derivatization methodologies have been reported, using reagents such as BCE-Cl [43] and ECF [44] with figures of merit comparable with the ones reported in this study; however, these methods have not been tested for a large group of analytes, and a high volume of derivatizing agent is needed to complete the reaction.

Compared with liquid chromatography without derivatization [9,45–47], significantly higher detection limits were obtained, indicating that derivatization not only improves the volatility and thermal stability of the analytes but also substantially increases the detection sensitivity.

4. Conclusions

An efficient method has been proposed for the multiclass determination of emerging contaminants in water samples using the optimized analytical strategy RDSE-derivatization-GC/MS. This study confirmed that Oasis HLB, normally used in solid-phase extraction, can also be used in rotating-disk sorptive extraction under an equilibrium-based regime of extraction, achieving good extraction performance for compounds of different polarities, such as the analytes considered here. In general, compounds with lower polarities and solubility in water presented higher recovery percentages because of their good affinity for the sorbent phase. The optimized methodology of derivatization with MSTFA showed clear improvements with respect to other alternatives, from the perspective of cost, time and eco-efficiency.

The application of the proposed method allows us to report, for first time, the presence of some of these compounds (< 0.38 $\mu\text{g L}^{-1}$) in well and river Chilean waters, which leads us to consider the potential risks of the consumption of these waters, knowing that compounds such as parabens have been categorized as endocrine-disrupting compounds. This multidetermination methodology for these compounds allowed us to simultaneously evaluate not only analytes of different families (in general, there is one methodology per family) but also different aqueous matrices.

These results suggest that further studies should be conducted with a more detailed sampling plan throughout the Maipo River, into which the effluents of main wastewater treatment plants are discharged.

Table 5
Concentrations of CEs in the different water samples studied in $\mu\text{g L}^{-1}$.

CEs	Tap	Well-1	Well-2	River	Effluent	Influent
EP	< LOD	< LOQ	0.24 ± 0.05	0.38 ± 0.03	0.43 ± 0.03	0.62 ± 0.03
PP	< LOD	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOQ	< LOQ
AsA	< LOD	< LOQ	0.15 ± 0.05	0.28 ± 0.04	3.1 ± 1.1	3.4 ± 0.9
Nap	< LOD	< LOD	< LOQ	< LOQ	0.5 ± 0.2	4.16 ± 0.07
Ibu	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	1.13 ± 0.09
TCS	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	0.7 ± 0.2	1.02 ± 0.04

Table 6
Comparison of the analytical features of different analyte extraction methods.

Technique	Compounds	Samples	Sample volume (L)	Derivatization		Extraction time (min)	Chromatographic time (min)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)	Reference	
				Agent	Volume (μL)						Temperature ($^{\circ}\text{C}$)
SPE-GC-MS	Nap, Ibu, TCS, BPA, E1, EE2	surface water, effluent and drinking water	1	BSTFA	1000	80	20	20	0.0001–0.0026	12–40	[36]
SPME-GC/MS	Ibu, Nap, TCS, BPA	wastewater	0.005	MTBSTFA	100	60	30	35	0.03–0.41	6–9	[37]
SPE-GC-MS	E1, E2, EE2, Dic	surface water	2.5	MSTFA/pyr	50/50	60	60	300	0.0001–0.0011	1–35	[38]
QuEChERS GC-MS/MS (EDCs) and LC-MS/MS (PhACs)	TCS, EE2, E2, E1, E3 and 26 pharmaceutically active chemicals	marine sediments	1 (g)	pyr-BSTFA-TMCS	1000	60	30	15	n.r.	< 20	[4]
SPE-GC/MS	MP, EP, PP, BP, BPA, TCS, E1, E2, Ibu, Nap, Ket, Dic	wastewaters	1	N/A to pharmaceuticals		25	20	100	0.001–0.01	< 7	[39]
				MTBSTFA-1% TBDMSCI	75	75	30				
SPE-GC-MS	Ibu, Nap, Ket, Dic, TCS, BPA, E1, E2, EE2	wastewaters and spring waters	0.25	AcOEt/MSBSTFA	25/50	60	30	60	0.0005–0.05	4–19	[40]
RDSE-GC-MS	MP, EP, PP, BP, E1, E2, E3, EE2, Ibu, Nap, Dic, AsA, MAc, Ket, TCS, BPA	Drinking, well and river waters and wastewaters	0.02	BSTFA/pyr	25/50	60	30	60	0.02–0.15	6–13	This work
DLLME-HPLC-FLD	E1, E2, E3, BPA	water, fish, chicken	6	BCE-Cl/NaHCO3	50	43	14	15	0.03–0.07	4–6	[41]
UA-DLLME- GC-MS/MS	Ibu, Dic, E1, EE2, PP	well, river and dam waters	0.004	ECF/ethanol/pyr	200/200/200	25	10	15	0.01–0.03	2–16	[42]
SD-DLLME- LC-MS/MS	BPA, Dic, Ibu, MP, PP, TCS	surface water	0.02	N/A	N/A	N/A	N/A	30	0.01–1.25	3–20	[43]
SPE-DLLME-UPLC-MS/MS	BP, EP, Ibu, MP, Nap, PP, TCS	wastewaters	0.25	N/A	N/A	N/A	N/A	90	0.10–1.80	0.6–5.4	[9]
SPE-SFC-DAD	EE2, BPA, E2, TCS	environmental water samples	0.15	N/A	N/A	N/A	N/A	23	0.23–1.59	5–9	[44]
LLE-LC-MS/MS	Dic, Nap, TCS, Ibu	fish plasma microaliquots	0.00002	N/A	N/A	N/A	N/A	16	0.39–8.11	2–20	[45]

N/A: not available.

SPE: solid-phase extraction.

SPME: solid-phase microextraction.

QuEChERS: acronym for Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe.

RDSE: rotating-disk sorptive extraction.

DLLME: dispersive liquid-liquid microextraction.

UA-DLLME: ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction.

SD-DLLME: solvent demulsification dispersive liquid-liquid microextraction.

LLE: liquid-liquid extraction.

HPLC-FLD: high-performance liquid chromatography with fluorescence detection.

SFC-DAD: supercritical-fluid chromatography with diode-array detection.

Acknowledgments

The authors would like to thank FONDECYT (Regular Project 1180742) and CONICYT (National PhD scholarship 21180429 and PAI Project PAI79170018) for financial support. The authors would also like to acknowledge Rodrigo A. González and Aguas Andinas for their collaboration and help in supplying the samples.

Appendix A. Supplementary data

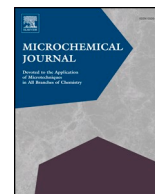
Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.120>

References

- [1] S. Sauvé, M. Desrosiers, A review of what is an emerging contaminant, *Chem. Cent. J.* 8 (2014) 1–7.
- [2] M. Gavrilescu, K. Demnerova, J. Aamand, S. Agathos, F. Fava, Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation, *Nat. Biotechnol.* 32 (2015) 147–156.
- [3] F. Eertmans, W. Dhooge, S. Stuyvaert, F. Comhaire, Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment, *Toxicol. Vitro* 17 (2003) 515–524.
- [4] D.M. dos Santos, L. Buruam, R. Gonçalves, D. Abessa, R. Kookana, M.R. de Marchi, Multiresidue determination and predicted risk assessment of contaminants of emerging concern in marine sediments from the vicinities of submarine sewage outfalls, *Mar. Pollut. Bull.* 129 (2018) 299–307.
- [5] R.S. Al-Farsi, M. Ahmed, A. Al-Busaidi, B.S. Choudhri, Translocation of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) into plant tissues: a review, *Emerg. Contam.* 3 (2017) 132–137.
- [6] K.E. Murray, S.M. Thomas, A.A. Bodour, Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 3462–3471.
- [7] M. Brumovsky, J. Becanova, J. Kohoutek, M. Borghini, L. Nizzetto, Contaminants of emerging concern in the open sea waters of the Western Mediterranean, *Environ. Pollut.* 229 (2017) 976–983.
- [8] F. Riva, S. Castiglioni, E. Fattore, A. Manenti, E. Davoli, E. Zuccato, Monitoring emerging contaminants in the drinking water of Milan and assessment of the human risk, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 221 (2018) 451–457.
- [9] R. Celano, A.L. Piccinelli, L. Campone, L. Rastrelli, Ultra-preconcentration and determination of selected pharmaceutical and personal care products in different water matrices by solid-phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction prior to ultra high pressure liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1355 (2014) 26–35.
- [10] M.B.R. Cerqueira, J.R. Guilherme, S.S. Caldas, M.L. Martins, R. Zanella, E.G. Primel, Evaluation of the QuEChERS method for the extraction of pharmaceuticals and personal care products from drinking-water treatment sludge with determination by UPLC-ESI-MS/MS, *Chemosphere* 107 (2014) 74–82.
- [11] A. Berlioz-Barbier, A. Vauchez, L. Wiest, R. Baudot, E. Vulliet, C. Cren-Olive, Multi-residue analysis of emerging pollutants in sediment using QuEChERS-based extraction followed by LC-MS/MS analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 1259–1266.
- [12] R. Gonzalo-Lumbreras, J. Sanz-Landaluze, C. Camara, Analytical performance of two miniaturised extraction methods for triclosan and methyltriclosan, in fish roe and surimi samples, *Food Chem.* 146 (2014) 141–148.
- [13] J.Q. Jiang, Z. Zhou, V.K. Sharma, Occurrence, transportation, monitoring and treatment of emerging micro-pollutants in waste water - a review from global views, *Microchem. J.* 110 (2013) 292–300.
- [14] F.J. Camino-Sánchez, A. Zafra-Gómez, S. Cantarero-Malagon, J.L. Vılchez, Validation of a method for the analysis of 77 priority persistent organic pollutants in river water by stir bar sorptive extraction in compliance with the European Water Framework Directive, *Talanta* 89 (2012) 322–334.
- [15] C. Wang, Q. Wu, C. Wu, Z. Wang, Application of dispersion-solidification liquid-liquid microextraction for the determination of triazole fungicides in environmental water samples by high-performance liquid chromatography, *J. Hazard Mater.* 185 (2011) 71–76.
- [16] M. Tankiewicz, C. Morrison, M. Biziuk, Application and optimization of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography-flame-ionization detector (GC-FID) to determine products of the petroleum industry in aqueous samples, *Microchem. J.* 108 (2013) 117–123.
- [17] P. Richter, C. Leiva, C. Choque, A. Giordano, B. Sepúlveda, Rotating-disk sorptive extraction of nonylphenol from water samples, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8598–8602.
- [18] M. Becerra-Herrera, V. Miranda, D. Arismendi, P. Richter, Chemometric optimization of the extraction and derivatization of parabens for their determination in water samples by rotating-disk sorptive extraction and gas chromatography mass spectrometry, *Talanta* 176 (2018) 551–557.
- [19] Y. Corrotea, N. Aguilera, L. Honda, P. Richter, Determination of hormones in wastewater using rotating disk sorptive extraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Anal. Lett.* 49 (2016) 1344–1358.
- [20] F.F. Donato, N.M.G. Bandeira, G.C. dos Santos, O.D. Prestes, M.B. Adame, R. Zanella, Evaluation of the rotating disk sorptive extraction technique with polymeric sorbent for multiresidue determination of pesticides in water by ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1516 (2017) 54–63.
- [21] E.A. Bekele, C.E.P. Annaratone, M.L.A.T.M. Hertog, B.M. Nicolai, A.H. Geeraerd, Multi-response optimization of the extraction and derivatization protocol of selected polar metabolites from apple fruit tissue for GC-MS analysis, *Anal. Chim. Acta* 824 (2014) 42–56.
- [22] P. González, I. Racamonde, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, Combined solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry used for determination of chloropropanols in water, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 2697–2704.
- [23] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, A. Nyström, J. Pettersen, R. Bergman, Experimental design and optimization, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 42 (1998) 3–40.
- [24] V. Manzo, L. Honda, O. Navarro, L. Ascar, P. Richter, Microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from waste water samples by rotating-disk sorptive extraction, *Talanta* 128 (2014) 486–492.
- [25] E. Commission, Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Off. J. Eur. Union* L221 (2002) 8–36.
- [26] M. Becerra-Herrera, L. Honda, P. Richter, Ultra-high-performance liquid chromatography-Time-of-flight high resolution mass spectrometry to quantify acidic drugs in wastewater, *J. Chromatogr. A* 1423 (2015) 96–103.
- [27] Z. Jemmali, A. Chartier, C. Dufresne, C. Elfakir, Optimization of the derivatization protocol of pentacyclic triterpenes prior to their gas chromatography-mass spectrometry analysis in plant extracts, *Talanta* 147 (2016) 35–43.
- [28] Y. Zhang, J. Wang, G. Wang, C. Gao, Y. Yan, B. Wen, Optimization of derivatization procedure and gas chromatography-mass spectrometry method for determination of bensulfuron-methyl herbicide residues in water, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 995–996 (2015) 31–37.
- [29] J. Christian, P. Shah, M. Patel, K. Patel, T. Gandhi, Optimizing derivatization conditions using an experimental design and simultaneous estimation of artemether and lumefantrine by ratio first order derivative spectrophotometric method, *J. Taibah Univ. Sci.* 11 (2017) 729–740.
- [30] F. Safa, M.R. Hadjmohammadi, Simultaneous optimization of the resolution and analysis time in micellar liquid chromatography of phenyl thiohydantoin amino acids using Derringer's desirability function, *J. Chromatogr. A* 1078 (2005) 42–50.
- [31] L. Jachero, B. Sepúlveda, I. Ahumada, E. Fuentes, P. Richter, Rotating disk sorptive extraction of triclosan and methyl-triclosan from water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 7711–7716.
- [32] F. Fernandes, H. Costa, A. Carvalho, P. Serp, V. Antipoff, Z. Cardeal, Versatile magnetic carbon nanotubes for sampling and pre concentration of pesticides in environmental water, *Talanta* 167 (2017) 538–543.
- [33] G. Sheykhaaghai, M. Hossainisadr, S. Khanahmadzadeh, M. Seyedasajadi, A. Alipourmajid, Magnetic molecularly imprinted polymer nanoparticles for selective solid phase extraction and pre-concentration of Tizanidine in human urine, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1011 (2016) 1–5.
- [34] H. Miraji, O.C. Othman, F.N. Ngassapa, E.W. Mureithi, Research trends in emerging contaminants on the aquatic environments of Tanzania, *Scientifica* (2016) 1–6.
- [35] H. Shi, X. Cheng, Q. Wu, R. Mu, M. Yinfa, Assessment and removal of emerging water contaminants, *J. Environ. Anal. Toxicol.* 2 (2012) 1–14.
- [36] R. Loos, R. Carvalho, D. Antonio, S. Comerio, G. Locoro, S. Tavazzi, B. Parachini, M. Ghiani, T. Lettieri, L. Blaha, B. Jarosova, S. Voorspoels, K. Servaes, P. Haglund, J. Fick, R.H. Linderg, D. Schwesig, B.M. Gawlik, EU-wide monitoring survey on emerging polar organic contaminants in wastewater treatment plant effluents, *Water Res.* 47 (2013) 6475–6487.
- [37] J. Rivera-Utrilla, M. Sánchez-Polo, M.A. Ferro-García, G. Prados-Joya, R. Ocampo-Pérez, Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review, *Chemosphere* 93 (2013) 1268–1287.
- [38] G.R. Boyd, H. Reemtsma, D.A. Grimm, S. Mitra, Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada, *Sci. Total Environ.* 311 (2003) 135–149.
- [39] A. Peña-Álvarez, A. Castillo-Alanis, Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM), *Tip. Rev. Espec. Ciencias Quımico-Biol.* 18 (2015) 29–42.
- [40] M. esen, E. Heath, “Disk-based solid phase extraction for the determination of diclofenac and steroidal estrogens E1, E2 and EE2 listed in the WFD watch list by GC-MS, *Sci. Total Environ.* 590–591 (2017) 832–837.
- [41] H.B. Lee, T.E. Peart, M.L. Svoboda, Determination of endocrine-disrupting phenols, acidic pharmaceuticals, and personal-care products in sewage by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1094 (2005) 122–129.
- [42] R. Gibson, E. Becerril-Bravo, V. Silva-Castro, B. Jiménez, Determination of acidic pharmaceuticals and potential endocrine disrupting compounds in wastewaters and spring waters by selective elution and analysis by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1169 (2007) 31–39.
- [43] H. Wu, G. Li, S. Liu, N. Hu, D. Geng, G. Chen, Z. Sun, X. Zhao, L. Xia, J. You,

Monitoring the contents of six steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in chicken, fish and aquaculture pond water samples using pre-column derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction with the aid of experimental design method, *Food Chem.* 192 (2016) 98–106.

- [44] B. Albero, C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, J.L. Tadeo, Rapid determination of emerging contaminants in water and herbal infusions by in situ derivatization and gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Methods* 7 (2015) 3006–3014.
- [45] S.S. Caldas, C. Rombaldi, J.L. De Oliveira Arias, L.C. Marube, E.G. Primel, Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta* 146 (2016) 676–688.
- [46] V. Del Carmen Salvatierra-Stamp, S.G. Ceballos-Magaña, J. Gonzalez, V. Ibarra-Galván, R. Muñoz-Valencia, Analytical method development for the determination of emerging contaminants in water using supercritical-fluid chromatography coupled with diode-array detection, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 4219–4226.
- [47] F. Chen, Z. Gong, B.C. Kelly, Rapid analysis of pharmaceuticals and personal care products in fish plasma micro-aliquots using liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1383 (2015) 104–111.



Rotating-disk sorptive extraction for the determination of sex hormones and triclosan in urine by gas chromatography-mass spectrometry: Clean-up integrated steps and improved derivatization

Daniel Arismendi*, Karolina Díaz, Natalie Aguilera-Marabolí, Betsabet Sepúlveda, Pablo Richter*

Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Faculty of Chemical and Pharmaceutical Sciences, University of Chile, P.O. Box 233, Santiago, Chile

ARTICLE INFO

Keywords:

Rotating-disk sorptive extraction (RDSE)
Clean-up
Urine
Derivatization
Sex hormones
Triclosan

ABSTRACT

Different clean-up stages were coupled to rotating-disk sorptive extraction (RDSE) of testosterone, progesterone, 17β -estradiol and triclosan in urine samples prior to derivatization and detection by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). By using Oasis® HLB as the sorptive phase, extraction equilibrium was reached after 60 min at a disk rotation velocity of 2000 rpm.

The factors involved in sample preparation of the urine were comprehensively studied and implemented to minimize matrix effects that were mainly produced by polar pigments in the urine. A 10-fold dilution of the sample was necessary prior to RDSE, followed by a washing step of the sorptive phase with 10% (v/v) methanolic solution and final selective desorption of the analytes with ethyl acetate. Derivatization of the analytes was also studied in detail and implemented prior to GC-MS. The reaction was optimized in terms of derivatizing agent consumption, time and temperature, achieving significant improvements in these factors.

Under the optimized conditions, the matrix effects decreased almost five-fold for all analytes, and the relative recoveries were between 89 and 111% with detection limits in the range of 0.004–0.54 ng mL⁻¹, whereas the precision, expressed as relative standard deviation (RSD), was below 14%.

Analytes were determined in real samples in the presence and absence of enzymatic hydrolysis, assessing both their free and total forms. The free triclosan concentration was only 10% of the total concentration found in the same sample after hydrolysis. Estradiol and testosterone were quantified with high sensitivity at concentrations between 0.11 and 10.45 and 0.20–21.23 ng mL⁻¹, respectively. Progesterone was only quantified in a urine sample from a woman during pregnancy.

1. Introduction

Sex hormones are related to a wide variety of biochemical processes mainly concerning reproductive function and sexual development [1]. Progesterone (Prog) and 17β -estradiol (E2) are the principal female sex hormones and they play an important role in pregnancy, fertility and the menstrual cycle. Analogously, testosterone (Test) is the male sex hormone associated with the production of sperm and the development of physical characteristics. Alterations in these hormones are related to various clinical conditions, such as a reduction in sexual impulse, infertility, depression and decreased energy [2]. It has also been reported that sex hormones are related to eating disorders [3], polycystic ovary syndrome [4], circulating natriuretic peptide [5], benign prostatic hyperplasia [6], hypogonadism [7], breast cancer [8–11], laryngeal cancer [12] and prostate cancer [2,13].

Traditionally, sex hormone testing is performed via serum, in which the reference ranges are well established. In this case the sample collection is relatively simple, although it includes an invasive method. In addition, in some cases, it is not possible to distinguish between bound and free hormones, which may result in misdiagnosis [14], and punctual sampling is not entirely correct since the secretion of hormones is pulsatile throughout the day. Additionally, it is possible to test sex hormones and metabolites in urine to assess their concentrations. For instance, a 24 h collection is frequently used and is the most reliable way to assess the metabolism of steroid hormones [15,16] because urine tests can measure the free and total hormones, reflecting the amount that is bioavailable; moreover, there is the advantage in that the collection of samples is not invasive. In addition, access to high sample volumes allows the preconcentration of analytes, favoring the analytical sensitivity of chemical methodologies. A hormonal profile in

* Corresponding authors.

E-mail addresses: daniel.arismendi3@gmail.com (D. Arismendi), prichter@ciq.uchile.cl (P. Richter).

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105149>

Received 18 May 2020; Received in revised form 8 June 2020; Accepted 9 June 2020

Available online 11 June 2020

0026-265X/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

urine reflects not only endocrine disorders through the inadequate action of the glands [17] but is also a measure for doping control in athletes to establish possible ingestion of endogenous hormones [1,18].

There have been several studies in which specific alterations associated with the metabolism and secretion of sex hormones are related to the presence of organic pollutants, including polychlorinated biphenyls [19], zearalenone [20], phthalates [21], acrylamide [22] and phenols, parabens and triclocarban [23]. Other pollutants, such as triclosan (TCS), which has been described as an endocrine-disrupting chemical, could also affect the level of sex hormones in urine after continuous exposure. To assess its eventual effects, it is first necessary to develop a simultaneous analytical methodology, such as the one proposed in this work, and then exposure to TCS and its effects on sex hormones could be studied elsewhere.

The simultaneous determination of sex hormones by GC-MS represents some drawbacks in terms of cost, time and efficiency because it requires two methods of derivatization (one for keto groups and another for hydroxy groups) [24,25]. An alternative proposed by some authors is the use of a derivatizing mixture composed of one derivatizing agent, a catalyst and a reducing agent for the determination of sex hormones by the same reaction route [26–31]. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS), mainly with MS/MS, is another derivatization-free alternative for the determination of sex hormones in urine [32–34]. However, in the case of estrogens, derivatization reactions have been necessary to improve the sensitivity [35,36]. A comparative study between LC-MS and GC-MS for the analysis of estrogens and their metabolites in urine (both with derivatization) shows that the limits of quantification by GC are 50 times smaller, although LC is faster and less expensive [37].

Sample preparation prior to determination by the mentioned techniques is conditioned by the complexity of each matrix under study. When biological samples are analyzed, different interferences can affect the quality of the results. Therefore, known methods of extraction, including clean-up steps prior to or during the application of the methodology should be implemented. For example, in solid-phase extraction (SPE) of hormones from urine, some authors include a clean-up stage with a methanolic solution to discard unwanted components of the sample [38]. Other researchers have quantified estrogens in urine samples by stir bar sorptive extraction (SBSE) using a sorbent of polydimethylsiloxane (PDMS) and GC-MS [39], and they considered a dilution of approximately three times that of the urine sample in addition to enzymatic hydrolysis prior to extraction to decrease matrix complexity. Similarly, other authors used SBSE combined with HPLC-DAD for the determination of estrogens and progestogens in urine matrices [40]. They refer to the high complexity of the urine matrix; however, studies of matrix effects were not executed in their research to compensate for the low recoveries of some compounds.

Similar to SBSE, rotating-disk sorptive extraction (RDSE) is an equilibrium-based microextraction technique that integrates extraction and rotation in the same device [41,42]. An important advantage of RDSE is its considerable cost savings because the que body of the Teflon extraction device can be reused countless times, easily changing the sorptive phase portion. In addition, the high rotation velocity of the disk (2000–3000 rpm) in most RDSE applications together with the high surface area to volume of the sorptive phase make this microextraction technique highly efficient from a kinetic point of view.

Different strategies for quantification have been described in RDSE applied to different kinds of liquid samples, such as wastewater [41], drinking water [42], river water [24], leachates [43], animal plasma [44] and urine [45,46]. Although matrix effects can be much higher in urine, in previous RDSE applications, only dilution of the sample was required because the pigments contained in the urine were not significantly sorbed onto the nonpolar sorptive phases (e.g., C18). In contrast, in more polar sorptive phases, such as Oasis® HLB, pigments (mainly urobilin) are coextracted together with analytes, which can be transferred to the final extract after elution. A detailed study of the

clean-up steps integrated into the RDSE process have been developed to minimize the effects of urobilin interference in the measurement of sex hormones (E2, Test and Prog) and TCS by GC-MS with preoptimized derivatization.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Water from a Simplicity® Water Purification System, Millipore (Darmstadt, Germany) was used throughout the experiment. Testosterone (Test), 17 β -estradiol (E2), progesterone (Prog) and triclosan (TCS) were purchased from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). Testosterone-2,3,4-¹³C₃ (Test-¹³C₃) from Sigma-Aldrich (Milwaukee, United States) and triclosan-2,3,5-D₃ (TCS-D₃) from Dr. Ehrenstorfer GmbH were used as surrogate standards. The HPLC grade solvents ethyl acetate (EtAcO), dichloromethane (DCM), methanol (MeOH), acetonitrile (ACN), and acetic acid/sodium acetate buffer (> 99% purity) were from Merck (Darmstadt, Germany). Standard stock solutions of the analytes (10 mg L⁻¹) were prepared separately in MeOH. Multistandard solutions were prepared between 0.1 and 100 ng mL⁻¹. Nitrogen (99.995% purity) and helium (99.9999% purity) were purchased from Linde (Santiago, Chile) and were used for final extract evaporation and as the chromatographic carrier gas, respectively. Oasis® HLB and PRiME HLB were obtained from Waters Corporation (Milford, United States). N-Methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (MSTFA) from Merck and iodotrimethylsilane (TMIS) and 1,4-dithioerythritol (DTE) from Sigma-Aldrich were used for derivatization. β -Glucuronidase from *Helix pomatia* type HP-2 aqueous solution, $\geq 100,000$ units mL⁻¹ from Sigma-Aldrich was used for enzymatic hydrolysis. The physicochemical properties of the analytes and solvents mentioned in the text were provided by ChemIDplus by SRC, Inc.

2.2. Instruments

A Thermo Scientific TRACE 1300 gas chromatograph (Milan, Italy) coupled to a Thermo Fisher Scientific ISQ (Austin, TX, United States) mass-selective detector was used for GC-MS determinations. A Restek (Bellefonte, United States) RTX-5MS (30 m \times 0.25 mm i.d.; 0.25 μ m film thickness) was used as the chromatographic column. Two microliters of sample extract were injected into the gas chromatograph using an injector temperature of 250 °C in splitless mode. The column temperature started at 75 °C (1 min) and then increased to 150 °C at a rate of 20 °C min⁻¹ (5 min) and to 300 °C at a rate of 10 °C min⁻¹ (5 min). Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The solvent delay was 7 min. A dwell time of 0.2 s was used for each *m/z* value. The MS transfer line and ion source were maintained at 250 °C and 200 °C, respectively, and compound quantification was based in selective ion monitoring (SIM) mode.

The vial containing the sample and the rotating disk was placed on an MR 300 multimagnetic stirrer (Heidolph Instruments, Germany). The pH values were measured with a Microprocessor 537A pH meter (WTW, Germany). A KMC-1300 V (Vision Scientific Co., Ltd., Korea) was used as the vortex mixer. Statistical software (Statgraphics Centurion XV for Windows; Manugistics, United States) was used for chemometric designs.

A Nicolet iS5 FTIR (Thermo Fisher Scientific) spectrometer equipped with a KBr/Ge beam splitter, a high-performance deuterated triglycine sulfate detector and a smart iTX-ID7 attenuated total reflectance (ATR) sampling accessory with diamond crystal was used for infrared spectra measurements. It has the all-reflective optics that allow the highest throughput possible without spectral range losses associated with using focusing lenses or elements. The wavenumber range was 4,000 to 400 cm⁻¹. A resolution of 4 cm⁻¹ and 16 scans per sample were used. OMNIC 8.0 software (Thermo Fisher Scientific) was used to resolve the spectra.

Table 1
Experimental conditions associated with RDSE and sample clean-up.

Stage	Experimental conditions
Extraction	20 mL of diluted urine at 2000 rpm for 60 min. The solution was discarded and the disk was washed with deionized water.
Washing	10 mL of 10% MeOH at 2000 rpm for 5 min. The solution was discarded and the disk was washed with deionized water.
Elution	10 mL of EtAcO at 2000 rpm for 20 min. The ethyl acetate extract was transferred to another vial and evaporated to dryness for derivatization and measurement by GC-MS.

2.3. Rotating-disk sorptive extraction (RDSE)

The material of the disks used was Teflon, and they contained an internal magnetic stirrer. The disk contains a cavity where 50 mg of Oasis® HLB was added. The cavity was covered with a fiberglass filter and sealed with a Teflon ring. Preconditioning of the sorptive phase in the disk was performed with 5 mL of ethyl acetate, 5 mL of methanol and 5 mL of water. A 2 mL aliquot of each urine sample was added to an extraction vial, and 18 mL of deionized water (10 × dilution) was added followed by manual stirring. The pH was adjusted to 5.8 with acetate buffer. The extraction procedure is summarized in Table 1.

2.4. Derivatization

The derivatization mixture was previously prepared; 1000 µL of MSTFA was added to 5 mg of DTE, and the mixture was mixed by vortexing until the reducing agent dissolved. Then, 2 µL of TMIS was added and manually homogenized, and the reagent was stored at 4 °C until use. The multistandard or sample extract (after RDSE) was placed in a vial and evaporated to dryness under a N₂ stream. An aliquot of 50 µL of the derivatizing mixture consisting of MSTFA/DTE/TMIS and 50 µL of ethyl acetate was added to the dry vial and mixed on a vortex for 5 min at room temperature. Then, the sample was transferred to a vial insert and was ready to be analyzed by GC-MS. Different organic solvents were studied as part of the derivatization reaction to reduce the volume of the derivatizing mixture. In addition, the ratio of the volume of solvent selected and the volume of derivatizing mixture was tested.

2.5. Validation of the method

The analytical quality of the proposed methodology was verified through figures of merit at 5 ng mL⁻¹. Accuracy was expressed as a function of recovery (%Re), precision was based on percent relative standard deviation (%RSD, n = 6), sensitivity according to detection (3 times the σ blank signal) and quantification (10 times the σ blank signal) limits and matrix effects when comparing the response of the analytes in the organic solvent and the urine matrix. Linearity was verified between 1 and 100 ng mL⁻¹ in the urine matrix. The recoveries (eq. (1)) and matrix effects (eq. (2)) were calculated according to the following equations:

$$\text{Re}(\%) = (A_{S4} - A_{S3})/A_{S2} \quad (1)$$

$$\text{ME}(\%) = (A_{S2} - A_{S3})/A_{S1} \quad (2)$$

where each term corresponds to the relative area (A) of S1: multistandard solution of 5 ng mL⁻¹ of each analyte; S2: urine extract obtained using RDSE, which was enriched with 5 ng mL⁻¹ analytes just before injection; S3: extract obtained directly from a urine sample (blank); and S4: extract obtained from a urine sample enriched with 5 ng mL⁻¹ multistandard since the beginning of the extraction. Using these equations, the recovery value obtained was free of any matrix effects and vice versa.

2.6. Application to real urine samples: Determination of the free and total (enzymatic hydrolysis) concentrations of the analytes

Urine samples from five healthy volunteers were collected in sterile containers and stored at -20 °C. The samples were differentiated according to age and sex, including a woman during pregnancy (5 months), and the samples were taken from the first urine of the day. Prior to analysis, the urine samples were centrifuged at 3500 rpm for 10 min, and in this way, all crystals and solids present were separated. The samples were analyzed in triplicate, for the initial determination of the free form of the analytes.

The same real samples were also analyzed considering the previous step of enzymatic hydrolysis described above [47]. To 2 mL of urine sample in the extraction vial, 2 mL of 1 mol L⁻¹ sodium acetate/acetic acid buffer (pH 5.2) was added. The solution was homogenized by vortexing for 10 s, and then 20 µL (2000 U) of the enzyme β-glucuronidase was added and homogenized manually for a few seconds followed by incubation at 37 °C for 24 h. After this time, the optimized RDSE methodology was applied considering the same 10-fold dilution of the sample. The real samples were quantified by matrix-matched calibration using the urine of a child of 5 years old, which is practically free of endogenous hormones. The urine sample was spiked before the dilution involved in the method. All subjects were previously informed about the procedure and the nature of the analytical study. All subjects signed an informed consent form prior to any other action.

3. Results and discussion

3.1. Derivatization studies

Although the MSTFA/DTE/TMIS mixture has been used successfully for the derivatization of some sex hormones in solvents [30], different kinds of waters [48] and bovine serum [29], it has not been previously tested for derivatization in urine samples. This is a silylation reaction where the keto groups of Test and Prog are previously reduced to hydroxyl groups to later form the -Si(CH₃)₃ species at those positions. TMIS acts as a catalyst and promotes reaction. The hormone E2 and, in general, any hormone that does not have keto groups simply reacts with MSTFA without any structural alterations.

First, using experimental conditions suggested in the literature for the derivatization reagents (1000:2:5), an experimental design (2^k) was made to evaluate the effects of temperature, time and volume of this mixture on the derivatization. Similar to observations by other authors [30], we found that the temperature and time have no significance on the derivatization, verifying the strong derivatizing character of this mixture. In addition, we found that the volume of the derivatizing mixture had a significant effect on the reaction (see Fig. A1, Supplementary Information).

The amount of each reagent in the derivatization mixture was not studied since these reagents were previously optimized to the minimum expression. However, to save on the cost and ecoefficiency of the methodology, dilution of this mixture in different solvents was assessed. As seen in Fig. 1, the use of the derivatizing mixture without dilution (100%) is statistically equivalent to the result obtained when the mixture was diluted (50%) with solvents such as EtAcO, ACN and DCM. EtAcO was selected for dilution of the derivatizing mixture because of

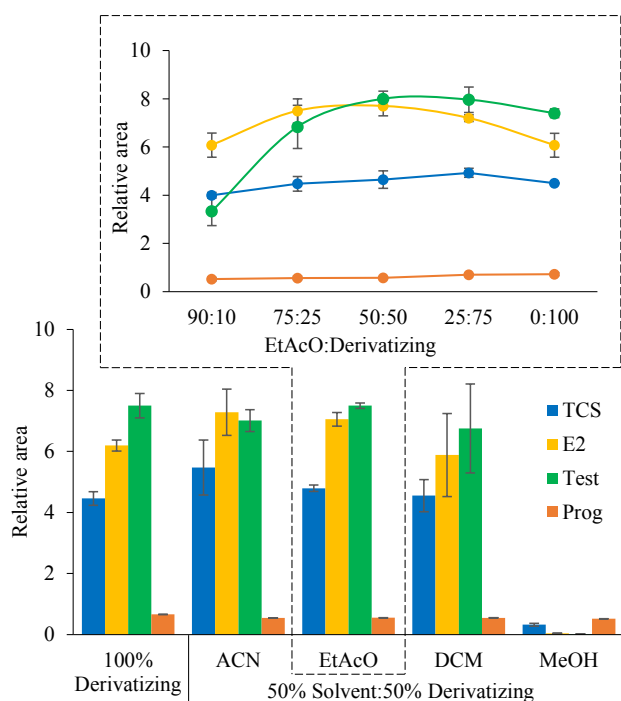


Fig. 1. Effect of the presence and volume of organic solvent on the derivatization of TCS, E2, Test and Prog.

its better compatibility with GC systems. DCM was discarded considering the higher dispersion of the results, and MeOH was also discarded because it reacts with the derivatizing mixture. On the other hand, some tests were carried out at different proportions of the derivatizing mixture and EtAcO as the solvent, starting with 10:90 through 100:0 (Fig. 1, top). Fifty microliters of the derivatizing mixture and 50 μL of EtAcO represent the best relationship between high chromatographic response and low volume of derivatizing mixture. Consequently, the final conditions selected for derivatization were 50 μL of MSTFA/DTE/TMIS and 50 μL of EtAcO at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 5 min in a vortex. The derivatization reaction was evaluated in the concentration range of 1–500 ng mL^{-1} , obtaining a linear relationship with an R^2 value of > 0.995 . The RSD ($n = 6$) was lower than 5% for the total analytes in the study. Our proposed method represents a significant improvement with respect to other studies reported in the literature due to the reduction of the consumption of the derivatizing mixture used by 50% [30,48] as well as the time and temperature used [29].

3.2. Gas chromatography-mass spectrometry studies

The chromatographic analysis shows separation of the analytes under study in just 15 min. Table 2 shows the retention times and m/z ions used in SIM mode for each analyte by GC–MS.

Fig. 2 shows the elution chromatogram of the compounds attributed to the following products in order of elution: TCS-mono-TMS, E2-di-

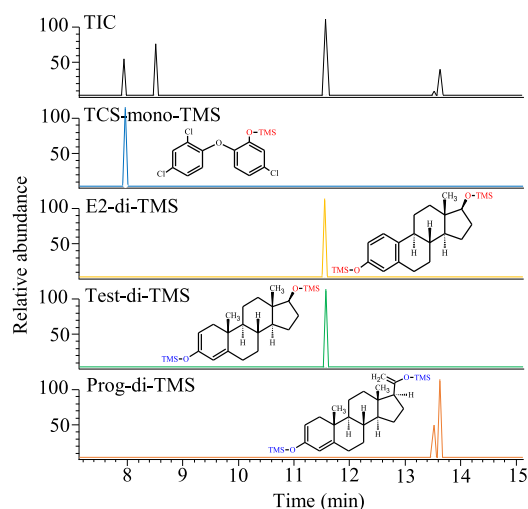


Fig. 2. GC–MS chromatograms of the derivatized analytes in TIC mode (top) and SIM mode for each analyte (m/z 345, 416, 432 and 458 for TCS, E2, Test and Prog, respectively).

TMS, Test-di-TMS and Prog-di-TMS. The O-TMS species in the figure highlighted in red came from a hydroxyl group, while those marked in blue were originally ketone groups. Likewise, due to possible double bonds formation after enolization of the ketone group in Prog, two products were formed by performing derivatization with MSTFA/DTE/TMIS as observed previously [30]. Since it is not possible to favor one product with respect to the other, under the same derivation protocol, the same relation of the derived compounds was achieved at concentrations between 1 and 500 ng mL^{-1} ; therefore, for quantification, the sum of the areas of all compounds was considered. Surrogate standards TCS- D_3 and Test- $^{13}\text{C}_3$ elute at the same retention times as their homologs TCS and Test.

3.3. Rotating-disk sorptive extraction: Extraction, clean-up, and elution studies

3.3.1. Sorbent phase and pH

RDSE is considered a versatile technique that has been applied to a large number of analytes in different kinds of samples, mainly due to its extraction device allowing the use of sorptive phases with different polarities [24,41,49]. Considering the range of polarity of the analytes under study ($\log K_{o/w}$ between 3.32 and 4.76) and their capability to form hydrogen bonds, the lipophilic-hydrophilic Oasis[®] HLB sorptive phase was selected. Recently, Oasis[®] HLB PRiME SPE has emerged as a commercial sorptive phase for SPE, which, according to the manufacturer, has the advantages of the absence of conditioning stages as well as improvement in the extractions through a decrease in the matrix effect. Taking this into account, both phases (Oasis[®] HLB and HLB PRiME) were compared for the extraction of E2, Test, Prog and TCS through RDSE from urine samples, also considering the presence and absence of preconditioning stages. Despite these expectations, the Oasis[®] HLB phase resulted in better results for this set of analytes, and independent of the sorbent phase used, preconditioning of the phase was mandatory (see Fig. A2, Supplementary Information). Consequently, Oasis[®] HLB was selected for use in this RDSE application.

A pH study was carried out considering the acid-base properties of both the phase and analytes of interest. The best analytical responses were found at pH values between 6 and 8 (see Fig. A3, Supplementary Information), which is consistent with similar studies done previously for this sorbent phase [42].

3.3.2. Dilution of the sample

The analysis of complex matrices such as urine requires a detailed

Table 2
GC–MS data.

Analyte	Retention time (min)	Target ion m/z value	Qualifier ion m/z values
TCS	7.94	345	347, 360
TCS- D_3	7.94	350	365
E2	11.66	416	285
Test	11.69	432	433
Test- $^{13}\text{C}_3$	11.69	435	436
Prog	13.52–13.64	458	443

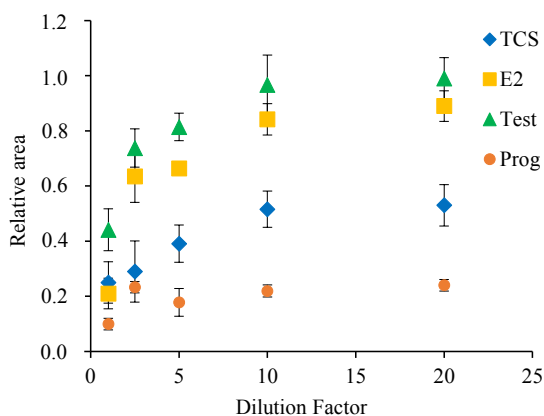


Fig. 3. Effects of the dilution of the urine sample (before RDSE) on the relative response of the analytes.

study of all experimental conditions. Therefore, a complete study of all the sample preparation steps, such as dilution, extraction, clean-up and desorption, was necessary. First, several authors have suggested that dilution of the urine sample up to 20-fold could improve selectivity in different extraction techniques [46,50,51]. The effect of the dilution factor on the response of the present method is shown in Fig. 3. A positive effect was observed for the responses with increasing dilution of the sample. The effects were no longer significant between dilutions of 10 and 20-fold. Consequently, a 10-fold dilution was considered for the extraction process for a higher preconcentration factor.

3.3.3. Washing step

It should be stressed that even after diluting the urine sample, the method provided low recovery and high matrix effects (approximately 20% and 70%, respectively), mainly due to interferences present in the intense yellow color observed in the final extract. Consequently, the application of a clean-up stage was evaluated to avoid interference from the pigments present in urine, such as urobilin, which are coextracted together with the analytes by HLB on RDSE. Urobilin shows similar behavior to the analytes under study; its molecular mass does not exceed 600 g mol^{-1} , which allows it to easily cross the boundary layer in RDSE, and its high polarity ($\log K_{o/w}$ 1.36) allows easy sorption onto the hydrophilic part of the sorbent phase. The use of diluted MeOH (between 20 and 40% in water) has been reported previously [52,53] for clean-up of the extracts in the determination of estrogens from urine because this polar mixture only provides desorption of the pigments. In this study, the use of between 5 and 40% MeOH was studied to desorb interferences from the sorptive phase in the disk prior to desorption of the analytes. Fig. 4 shows that the use of 5 and 10% MeOH improves the response associated with each analyte with respect to extraction without clean-up. In addition, considering that this washing step removed part of the sorbed interferences, the final extract became almost colorless. At higher concentrations of MeOH (over 20%), the signals begin to decay due to concomitant desorption of the analytes. Extraction with 10% MeOH for 5 min at 2000 rpm was selected as the clean-up stage.

3.3.4. Selective elution

After the clean-up with 10% MeOH, part of the pigments remained sorbed onto the disk together with the analytes; consequently, to obtain clean extracts, the selected desorption sorbent should remove only the analytes without desorption of the remaining pigments on the disk. Desorption of the analytes was studied using different solvents: DCM, MeOH, ACN and EtAcO. Using EtAcO as the desorption solvent, a higher response of all analytes (see Fig. A4, Supplementary Information) was obtained. In addition, it was noted that after this, an intense yellow color remained in the filter on the disk, and the final

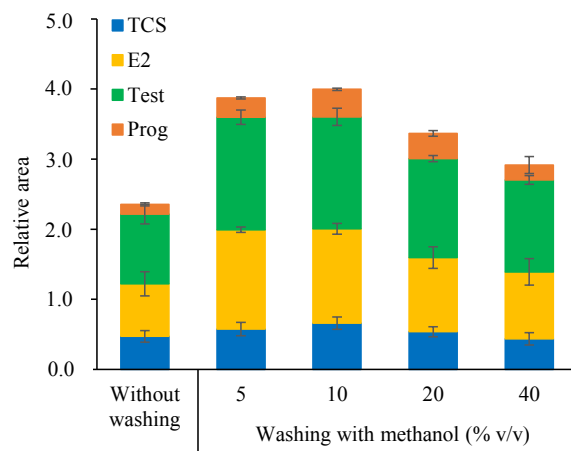


Fig. 4. Effect of the concentration of MeOH used in the clean-up stage (after RDSE) on the relative response of analytes.

extract became colorless. EtAcO has the lowest polarity of the solvents tested (dielectric constant (ϵ) of 6.2), which allowed it to more selectively desorb the analytes without interacting with the polar interferences remaining on the phase, obtaining colorless extracts.

Fig. 5-A (left side) shows the comparative results for absolute recovery and matrix effects regarding the three optimized steps: sample dilution, washing with diluted methanol and elution solvent. The first section (C0) reflects the results obtained by applying the RDSE technique without considering sample clean-up or sample dilution and using MeOH as the desorption solvent, as is typical in other RDSE applications [24,41,42]. Under these conditions, it is only possible to extract a maximum of 8% of the analytes; in addition there is a highly negative matrix effect of approximately 90%. By including the different stages studied (C1, C2 and C3), it can be observed that in parallel, the recoveries increase and the matrix effects of each analyte decrease. In the last step (C3), absolute recoveries reach between 46 and 57% and negative matrix effects are between 15 and 22%. In the top of Fig. 5-A, it can be observed how the color intensity in the final extract decreases as the different clean-up stages are applied, starting with a deep orange to a light yellow, almost colorless. Dirty extracts in GC-MS complex matrices can suppress ionization of the analytes [54] or affect the injection process of the sample [55].

Steps C2 and C3 only vary in the solvent used for elution. A comparison between the use of MeOH (C2) and EtAcO (C3) was followed by obtaining the infrared (IR) spectrum of the surface of the disk (Fig. 5-B or right side). In the surface of the disk eluted with EtAcO (IR spectrum in red), double signals at approximately 1634 and 1584 cm^{-1} , particular to $\text{C}=\text{O}$ and $\text{C}=\text{N}$ stretching, are observed in addition to the wide signal at approximately 3273 cm^{-1} that is particular to $\text{O}-\text{H}$ stretching. These signals coincide with those expected for urobilin. The absence of these signals on the surface of the disk eluted with MeOH (blue IR spectrum) is because urobilin was eluted together with analytes, transferring the yellow color to the final extract.

3.3.5. Hydrodynamic variables in RDSE

After optimizing all the clean-up steps, a study of the hydrodynamic variables associated with RDSE was necessary to find the optimal conditions of extraction. Through an experimental design based on a Doehlert [56], the matrix was constructed with coded and real values (see Table A1, Supplementary Information) to evaluate the effects of three factors simultaneously: volume of the diluted sample, rotation velocity of the disk, and extraction time. Fig. 6 shows the response surface diagram, which indicates the following optimal conditions: 2000 rpm, 60 min and 20 mL of diluted sample (2 mL of urine and 18 mL of water) for rotation velocity, extraction time and sample

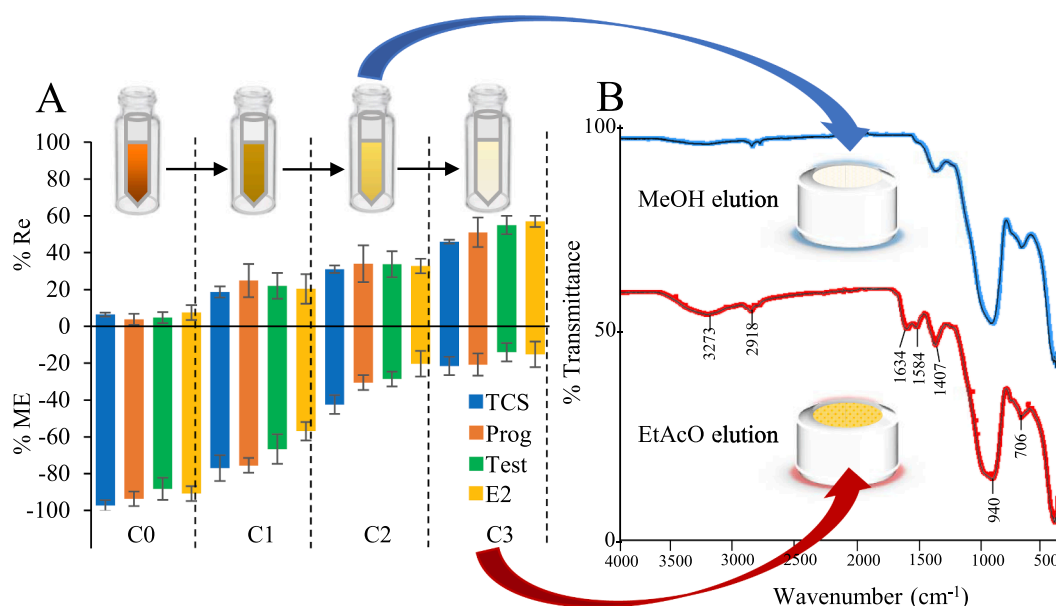


Fig. 5. A. Effect of clean-up stages on the recovery and matrix effects. [C0: Without dilution and without clean-up; C1: with urine dilution ($10 \times$) and without clean-up; C2: with urine dilution ($10 \times$) + MeOH (10%) for clean-up; and C3: with urine dilution ($10 \times$) + MeOH (10%) for clean-up + EtAcO elution. Note: C0, C1 and C2 were eluted with MeOH] B. Infrared spectra of the surface of the rotating disk after the desorption stage with MeOH (blue) and EtAcO (red).

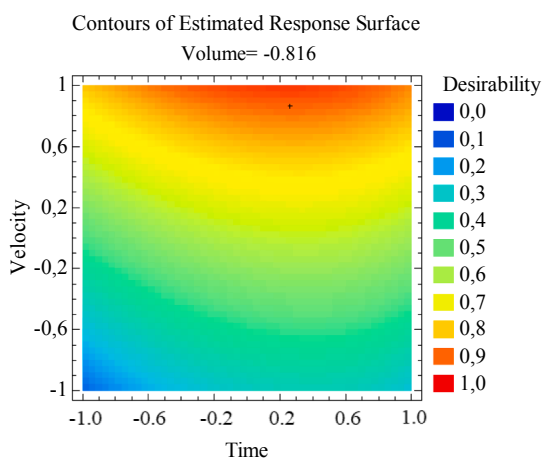


Fig. 6. Estimated response surface contours about the hydrodynamic variables (sample volume, rotation velocity and extraction time) for RDSE in urine samples.

volume, respectively. The overall desirability function for the total number of analytes was 0.8965.

3.4. Figures of merit of the method

Table 3 shows the figures of merit of the method. The accuracy is expressed as a function of the relative recovery (based on TCS-D₃ and Test-¹³C₃) and the precision according to the relative standard deviation (% RSD). RDSE is based on a partition equilibrium; therefore,

Table 3
Figures of merit of the method.

Analyte	Sensitivity (mL ng ⁻¹)	Linearity (R ²)	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)	% Re (relative)	% RSD (n = 6)	% ME
TCS	0.0152	0.993	0.04	0.14	111	9	-21
E2	0.0383	0.969	0.01	0.04	96	7	-15
Test	0.0456	0.979	0.004	0.01	99	11	-14
Prog	0.0044	0.959	0.54	1.77	89	14	-22

surrogate standards were used to show the efficiency of the method, obtaining relative recoveries between 89 and 111%. The linear equation for each analyte was built in the urine matrix, and the linearity (R²) was > 0.959, which is considered satisfactory according to the matrix under study. Except for Prog, the limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) showed consistent results, considering that these analytes are usually present in concentrations higher than these limit values. The negative matrix effect between -14 and -22% indicates that there is little suppression of the response of each analyte, and it could be ensured that this remnant found is more possibly due to inhibition of the ionization capacity of the analytes in the gas phase and not due to a possible blockage occurring at the injection port by the sample.

Comparison with previously reported methods by SBSE applied to sex hormones in urine samples denoted that the proposed method is more rapid with an extraction time of 60 min compared with 2–4 h to reach equilibrium in SBSE [40], which mainly occurred because the stir bar does not exceed 750 rpm. Regarding detection limits, the lowest reported limits were 0.03 [39], 0.18 and 0.12 ng mL⁻¹ [57] for E2, Test and Prog, respectively, which are higher than those reported in this work (except for Prog). The recoveries previously found by SBSE were 11.1 [40], 21.2 and 49.5% [57] for E2, Test and Prog, respectively, which were considerably lower than those reported in this method. The lower recoveries reported in these studies are since only dilution of the sample was considered to decrease the complexity of the matrix.

In the case of extraction of TCS from urine by SBSE, the reported extraction time was 90 min [58]. The lowest detection limit previously reported was 0.05 ng mL⁻¹, which is slightly higher than that reported in this study. In this same work, as in our case, they found a high ratio of conjugation for TCS metabolites in urine samples, from 86.8 to 96.4% [59].

Table 4
Concentrations (\pm standard deviation) of analytes in the different urine samples studied (ng mL^{-1}).

Analyte	Man < 35	Woman < 35	Man > 50	Woman > 50	Pregnant woman
Without enzymatic hydrolysis					
TCS	< LOD	< LOD	0.23 \pm 0.09	< LOD	< LOD
E2	< LOD	0.74 \pm 0.18	< LOD	0.11 \pm 0.01	0.43 \pm 0.11
Test	0.57 \pm 0.14	0.20 \pm 0.07	0.45 \pm 0.28	< LOD	< LOD
Prog	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	4.82 \pm 1.48
With enzymatic hydrolysis					
TCS	< LOQ	0.44 \pm 0.15	2.32 \pm 0.20	0.63 \pm 0.03	< LOD
E2	2.77 \pm 0.64	8.89 \pm 1.02	1.34 \pm 0.72	2.10 \pm 0.07	10.45 \pm 2.07
Test	21.23 \pm 3.54	2.62 \pm 1.32	17.67 \pm 1.83	0.44 \pm 0.16	2.70 \pm 0.43
Prog	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	11.92 \pm 2.03

(Standard deviations were calculated considering a triplicate of each sample).

3.5. Real sample analysis

To assess the applications of the methodology, urine samples from healthy persons of different ages and sexes, including a woman during pregnancy, were analyzed. In addition, enzymatic hydrolysis was alternatively applied to quantify the free and total concentrations of the analytes. Without enzymatic hydrolysis, it was only possible to quantify TCS in the man > 50 years of age, E2 in the women samples, Test in the men samples and in woman < 35 years of age, and Prog in the woman who was pregnant. The use of enzymatic hydrolysis considerably increased the concentration of the analytes in the urine, which is consistent with the fact that these compounds are generally excreted in the urine in the form of their more polar metabolites. This expected result for sex hormones was also found for TCS (an O-glucuronide metabolite), which was similar to that previously found for methylparaben using the same route for enzymatic deconjugation [47]. For the man > 50 years of age, the ratio of the conjugate of TCS in human urine samples was 90%. E2 and Test were found to be approximately 5- and 40-fold more concentrated in their total form, respectively. Normally, Prog increases to levels up to 100 times in women during pregnancy; therefore, Prog could be quantified in this sample, which could not be done in the samples from the other individuals in the study due to the lower sensitivity found for this hormone in the proposed methodology (Table 4).

Saliva testing is other noninvasive alternative for the determination of hormones. Consequently, we will investigate the application of RDSE in the preparation of this kind of sample.

4. Conclusions

The proposed method allowed the determination of sex hormones and TCS in urine samples using RDSE with integrated clean-up, derivatization, and GC-MS quantitation. Regarding derivatization, the experimental conditions were significantly improved by reducing the consumption of the derivatizing mixture by 50% and avoiding the typical use of timer-controlled heating systems, thus achieving a more ecoefficient method than those already proposed according to the premises of green chemistry. The clean-up strategy integrated with RDSE included dilution of the sample (10-fold), washing of the disk with 10% methanolic solution after extraction and desorption of the analytes with ethyl acetate. This improved method considerably reduces the matrix effects exerted by the presence of pigments such as urobilin in urine

Total TCS was successfully quantified in almost all urine samples in the range of 0.44–2.32 ng mL^{-1} , which continues to be a warning signal for the Chilean population considering that this compound has suggested characteristics as an endocrine-disrupting chemical. Furthermore, the ability of this compound to be secreted in urine as a

metabolite has been demonstrated; therefore, many of the already reported concentrations of contaminants in biological fluids could be higher.

E2 and Test were quantified with high sensitivity using the proposed technique at concentrations between 0.11 and 10.45 and between 0.20 and 21.23 ng mL^{-1} , respectively. However, determination of progesterone by this route is not entirely satisfactory due to the low sensitivity obtained by GC-MS. Progesterone was only quantified in a woman during pregnancy (4.82 and 11.92 ng mL^{-1} in free and total form, respectively).

It is recommended to apply this method elsewhere to study the effects of triclosan exposure on the relative concentration level of sex hormones.

CRedit authorship contribution statement

Daniel Arismendi: Conceptualization, Supervision, Formal analysis, Validation, Investigation, Writing - original draft. **Karolina Díaz:** Formal analysis, Validation, Investigation. **Natalie Aguilera-Marabolí:** Formal analysis, Validation, Investigation. **Betsabet Sepúlveda:** Conceptualization, Methodology, Resources. **Pablo Richter:** Project administration, Funding acquisition, Conceptualization, Supervision, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors would like to thank FONDECYT, Chile (Regular Project 1180742) and ANID, Chile (National PhD scholarship 21180429) for financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105149>.

References

- [1] D. Ackermann, M. Groessl, M. Pruijm, B. Ponte, G. Escher, C. d'Uscio, I. Guessous, G. Ehret, A. Pechère-Bertschi, P.Y. Martin, M. Burnier, B. Dick, B. Vogt, M. Bochud, V. Rousson, N.A. Dhayat, Reference intervals for the urinary steroid metabolome: The impact of sex, age, day and night time on human adult steroidogenesis, *PLoS One* 14 (2019) 1–19, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214549>.
- [2] J.E. Michaud, K.L. Billups, A.W. Partin, Testosterone and prostate cancer: An

- evidence-based review of pathogenesis and oncologic risk, *Ther. Adv. Urol.* 7 (2015) 378–387, <https://doi.org/10.1177/1756287215597633>.
- [3] A.L. Hirschberg, Sex hormones, appetite and eating behaviour in women, *Maturitas* 71 (2012) 248–256, <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2011.12.016>.
- [4] S. Naessén, K. Carlström, L. Garoff, R. Glant, A. Hirschberg, Polycystic ovary syndrome in bulimic women: An evaluation based on the new diagnostic criteria, *Gynecol. Endocrinol.* 22 (2006) 388–394, <https://doi.org/10.1080/09513590600847421>.
- [5] K.N. Bachmann, S. Huang, H. Lee, L.E. Dichtel, D.K. Gupta, J.C. Burnett, K.K. Miller, T.J. Wang, J.S. Finkelstein, Effect of testosterone on natriuretic peptide levels, *J. Am. Coll. Cardiol.* 73 (2019) 1288–1296, <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.12.062>.
- [6] S. La Vignera, R.A. Condorelli, G.I. Russo, G. Morgia, A.E. Calogero, Endocrine control of benign prostatic hyperplasia, *Andrology* 4 (2016) 404–411, <https://doi.org/10.1111/andr.12186>.
- [7] C. Wang, E. Nieschlag, R. Swerdloff, H.M. Behre, W.J. Hellstrom, L.J. Gooren, J.M. Kaufman, J.J. Legros, B. Lunenfeld, A. Morales, J.E. Morley, C. Schulman, I.M. Thompson, W. Weidner, F.C.W. Wu, Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males, *Eur. J. Endocrinol.* 159 (2008) 507–514, <https://doi.org/10.1530/EJE-08-0601>.
- [8] T.V. Clendenen, W. Ge, K.L. Koenig, Y. Afanasyeva, C. Agnoli, L.A. Brinton, F. Darvishian, J.F. Dorgan, A.H. Eliassen, R.T. Falk, G. Hallmans, S.E. Hankinson, J. Hoffman-Bolton, T.J. Key, V. Krogh, H.B. Nichols, D.P. Sandler, M.J. Schoemaker, P.M. Sluss, M. Sund, A.J. Swerdlow, K. Visvanathan, A. Zeleniuch-Jacquotte, M. Liu, Breast cancer risk prediction in women aged 35–50 years: impact of including sex hormone concentrations in the Gail model, *Breast Cancer Res.* 21 (2019) 1–12, <https://doi.org/10.1186/s13058-019-1126-z>.
- [9] E. Folkert, M. Dowsett, Sex hormones and breast cancer risk and prognosis, *Breast* 22 (2013) S38–S43, <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.07.007>.
- [10] K.H. Kensler, A.H. Eliassen, B.A. Rosner, S.E. Hankinson, M. Brown, R.M. Tamimi, Pre-diagnostic sex hormone levels and survival among breast cancer patients, *Breast Cancer Res. Treat.* 174 (2019) 749–758, <https://doi.org/10.1007/s10549-018-05121-8>.
- [11] N.C. Onland-Moret, R. Kaaks, P.A.H. van Noord, S. Rinaldi, T. Key, D.E. Grobbee, P.H.M. Peeters, Urinary endogenous sex hormone levels and the risk of postmenopausal breast cancer, *Br. J. Cancer* 88 (2003) 1394–1399, <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600890>.
- [12] A. Atef, M.A. El-Rashidy, S. Elzayat, A.M. Kabel, The prognostic value of sex hormone receptors expression in laryngeal carcinoma, *Tissue Cell* 57 (2019) 84–89, <https://doi.org/10.1016/j.tice.2019.02.007>.
- [13] E. García-Cruz, M. Piqueras, J. Huguet, L. Peri, L. Izquierdo, M. Musquera, A. Franco, R. Alvarez-Vijande, M.J. Ribal, A. Alcaraz, Low testosterone levels are related to poor prognosis factors in men with prostate cancer prior to treatment, *B.J.U. Int.* (2012) 1–6, <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2012.11232.x>.
- [14] M.A.A. Elshafie, A.A.A. Ewies, Transdermal natural progesterone cream for postmenopausal women: inconsistent data and complex pharmacokinetics, *J. Obstet. Gynaecol.* 27 (2007) 655–659, <https://doi.org/10.1080/01443610701582727>.
- [15] J. Kovács, W. Bronder, V. Kirchlechner, T. Arif, F. Waldhauser, Measurement of urinary melatonin: a useful tool for monitoring serum melatonin after its oral, *J. Clin. Endocrinol. Metabolism* 85 (2000) 666–670, <https://doi.org/10.1210/jcem.85.2.6349>.
- [16] T. Hirohata, N. Saito, K. Takano, S. Yamada, J. Son, S.M. Yamada, H. Nakaguchi, K. Hoya, M. Murakami, A. Mizutani, H. Okinaga, A. Matsuno, Urinary growth hormone level and insulin-like growth factor-1 standard deviation score (IGF-SDS) can discriminate adult patients with severe growth hormone deficiency, *Endocrine* J. 60 (2013) 369–373, <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ12-0196>.
- [17] B. Tienpont, F. David, K. Desmet, P. Sandra, Stir bar sorptive extraction-thermal desorption-capillary GC-MS applied to biological fluids, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 46–55, <https://doi.org/10.1007/s00216-002-1260-8>.
- [18] P. Van Renterghem, P. Van Eenoo, H. Geyer, W. Schänzer, F.T. Delbeke, Reference ranges for urinary concentrations and ratios of endogenous steroids, which can be used as markers for steroid misuse, in a Caucasian population of athletes, *Steroids* 75 (2010) 154–163, <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2009.11.008>.
- [19] D.L. Li, Y.J. Huang, S. Gao, L.Q. Chen, M.L. Zhang, Z.Y. Du, Sex-specific alterations of lipid metabolism in zebrafish exposed to polychlorinated biphenyls, *Chemosphere* 221 (2019) 768–777, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.094>.
- [20] W. Zheng, N. Feng, Y. Wang, L. Noll, S. Xu, X. Liu, Effects of zearalenone and its derivatives on the synthesis and secretion of mammalian sex steroid hormones: a review, *Food Chem. Toxicol.* 126 (2019) 262–276, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.02.031>.
- [21] L.E. Johns, K.K. Ferguson, O.P. Soldin, D.E. Cantonwine, L.O. Rivera-González, L.V. Anzalota Del Toro, A.M. Calafat, X. Ye, A.N. Alshawabkeh, J.F. Cordero, J.D. Meeker, Urinary phthalate metabolites in relation to maternal serum thyroid and sex hormone levels during pregnancy: a longitudinal analysis, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 13 (2015) 1–12, <https://doi.org/10.1186/1477-7827-13-4>.
- [22] C. Nagata, K. Konishi, K. Wada, T. Tamura, Y. Goto, S. Koda, F. Mizuta, S. Nishizawa, E. Sukigara, K. Ando, Associations of acrylamide intake with urinary sex hormone levels among preschool-age Japanese children, *Am. J. Epidemiol.* 187 (2018) 75–81, <https://doi.org/10.1093/aje/kwx197>.
- [23] A.M. Aker, K.K. Ferguson, Z.Y. Rosario, B. Mukherjee, A.N. Alshawabkeh, A.M. Calafat, J.F. Cordero, J.D. Meeker, A repeated measures study of phenol, paraben and Triclocarban urinary biomarkers and circulating maternal hormones during gestation in the Puerto Rico PROTECT cohort, *Environ. Heal. A Glob. Access Sci. Source* 18 (2019) 1–13, <https://doi.org/10.1186/s12940-019-0459-5>.
- [24] D. Arismendi, M. Becerra-Herrera, I. Cerrato, P. Richter, Simultaneous determination of multiresidue and multiclass emerging contaminants in waters by rotating-disk sorptive extraction-derivatization-gas chromatography/mass spectrometry, *Talanta* 201 (2019) 480–489, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.03.120>.
- [25] K.B. Michels, N. Binder, F. Courant, A.A. Franke, A. Osterhues, Urinary excretion of sex steroid hormone metabolites after consumption of cow milk: a randomized crossover intervention trial, *Am. J. Clin. Nutr.* 109 (2019) 402–410, <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqy279>.
- [26] P. Labadie, H. Budzinski, Determination of steroidal hormone profiles along the Jalle d'Eysines River (near Bordeaux, France), *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 5113–5120, <https://doi.org/10.1021/es048443g>.
- [27] M. Bodzek, M. Dudziak, Elimination of steroidal sex hormones by conventional water treatment and membrane processes, *Desalination* 198 (2006) 24–32, <https://doi.org/10.1016/j.desal.2006.09.005>.
- [28] K.M. Tripp, M. Dubois, P. Delahaut, J.P. Versteegen, Detection and identification of plasma progesterone metabolites in the female Florida manatee (*Trichechus manatus latirostris*) using GC/MS/MS, *Theriogenology* 72 (2009) 365–371, <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.03.004>.
- [29] M. Hansen, N.W. Jacobsen, F.K. Nielsen, E. Björklund, B. Styrisshave, B. Halling-Sorensen, Determination of steroid hormones in blood by GC-MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 3409–3417, <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5038-8>.
- [30] K. Fang, X. Pan, B. Huang, J. Liu, Y. Wang, J. Gao, Simultaneous derivatization of hydroxyl and ketone groups for the analysis of steroid hormones by GC-MS, *Chromatographia* 72 (2010) 949–956, <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1736-1>.
- [31] M.A.S. Marques, H.M.G. Pereira, M.C. Padilha, F.R. de Aquino Neto, Analysis of synthetic 19-norsteroids trenbolone, tetrahydrogestrinone and gestrinone by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1150 (2007) 215–225, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.08.032>.
- [32] D.T. Harwood, D.J. Handelsman, Development and validation of a sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay to simultaneously measure androgens and estrogens in serum without derivatization, *Clin. Chim. Acta* 409 (2009) 78–84, <https://doi.org/10.1016/j.cca.2009.09.003>.
- [33] Y. Wang, L. Tang, W. Yin, J. Chen, T. Leng, X. Zheng, W. Zhu, H. Zhang, P. Qiu, X. Yang, G. Yan, H. Hu, Simultaneous determination of seven neuroactive steroids associated with depression in rat plasma and brain by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal. Sci.* 32 (2016) 981–988, <https://doi.org/10.2116/analsci.32.981>.
- [34] M. Genangeli, G. Caprioli, M. Cortese, F. Laus, M. Matteucci, R. Pretelli, M. Ricciutelli, G. Sagratini, S. Sartoric, S. Vittori, Development and application of a UHPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 17 steroidal hormones in equine serum, *J. Mass Spectrom.* 52 (2017) 22–29, <https://doi.org/10.1002/jms.3896>.
- [35] L. Honda, M. Becerra-Herrera, P. Richter, Liquid chromatography-time-of-flight high-resolution mass spectrometry study and determination of the dandylated products of estrogens and their hydroxylated metabolites in water and wastewater, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 7909–7919, <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1412-0>.
- [36] A.M.M. Faqehi, D.F. Cobice, G. Naredo, T.C.S. Mak, R. Upreti, F.W. Gibb, G.J. Beckett, B.R. Walker, N.Z.M. Homer, R. Andrew, Derivatization of estrogens enhances specificity and sensitivity of analysis of human plasma and serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Talanta* 151 (2016) 148–156, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.12.062>.
- [37] A.A. Franke, L.J. Custer, Y. Morimoto, F.J. Nordt, G. Maskarinec, Analysis of urinary estrogens, their oxidized metabolites, and other endogenous steroids by benchtop orbitrap LCMS versus traditional quadrupole GCMS, *Anal. Bioanal. Chem.* 401 (2011) 1319–1330, <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5164-3>.
- [38] L.L. Qian, R.X. Li, H.T. Gao, C.M. Wang, L. Li, Q. Xu, J. Li, Determination of five sex hormones in urine samples for early evaluation of male reproductive toxicity induced by phthalate esters in rats, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 10588–10597, <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b03082>.
- [39] A. Stopforth, B.V. Burger, A.M. Crouch, P. Sandra, The analysis of estrone and 17 β -estradiol by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography/mass spectrometry: Application to urine samples after oral administration of conjugated equine estrogens, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 856 (2007) 156–164, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.05.025>.
- [40] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 1303–1311, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.02.037>.
- [41] V. Manzo, J. Goya-Pacheco, D. Arismendi, M. Becerra-Herrera, A. Castillo-Aguirre, R. Castillo-Felices, M. Rosero-Moreano, E. Carasek, P. Richter, Cork sheet as a sorptive phase to extract hormones from water by rotating-disk sorptive extraction (RDSE), *Analytica Chimica Acta* 1087 (2019) 1–10, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.08.069>.
- [42] V. Manzo, M. Becerra-herrera, D. Arismendi, A. Molina-Balmaceda, A. Caraballo, P. Richter, Rotating-disk sorptive extraction coupled to gas chromatography mass spectrometry for the determination of phthalates in bottled water, *Anal. Methods* 11 (2019) 6111–6118, <https://doi.org/10.1039/C9AY02076D>.
- [43] L. Jachero, C. Leiva, I. Ahumada, P. Richter, Released fraction of polychlorinated biphenyls from soil-biosolid system using a leaching procedure and its comparison with bioavailable fraction determined by wheat plant uptake, *Env. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 25092–25102, <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0176-y>.
- [44] A. Cañas, S. Valdebenito, P. Richter, A new rotating-disk sorptive extraction mode, with a copolymer of divinylbenzene and N-vinylpyrrolidone trapped in the cavity of

- the disk, used for determination of florfenicol residues in porcine plasma Microextraction Techniques, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 2205–2210, <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7628-8>.
- [45] V. Manzo, M. Miró, P. Richter, Programmable flow-based dynamic sorptive microextraction exploiting an octadecyl chemically modified rotating disk extraction system for the determination of acidic drugs in urine, *J. Chromatogr. A* 1368 (2014) 64–69, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.09.079>.
- [46] C. Vakh, M. Alaboud, S. Lebedinets, A. Bulatov, A rotating cotton - based disk packed with a cation-exchange resin: Separation of ofloxacin from biological fluids followed by chemiluminescence determination, *Talanta* 196 (2019) 117–123, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.12.024>.
- [47] P. Dwivedi, X. Zhou, T.G. Powell, A.M. Calafat, X. Ye, Impact of enzymatic hydrolysis on the quantification of total urinary concentrations of chemical biomarkers, *Chemosphere* (2018) 256–262, <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.177>.
- [48] R.A. Pérez, B. Albero, J.L. Tadeo, E. Molero, C. Sánchez-Brunete, Analysis of steroid hormones in water using palmitate-coated magnetite nanoparticles solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Chromatographia* 77 (2014) 837–843, <https://doi.org/10.1007/s10337-014-2688-7>.
- [49] L. Jachero, B. Sepúlveda, I. Ahumada, E. Fuentes, P. Richter, Rotating disk sorptive extraction of triclosan and methyl-triclosan from water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 7711–7716, <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6679-y>.
- [50] L. Wan, H. Zhu, Y. Guan, G. Huang, Nanocoating cellulose paper based microextraction combined with nanospray mass spectrometry for rapid and facile quantitation of ribonucleosides in human urine, *Talanta* 169 (2017) 209–215, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.03.085>.
- [51] J.M. Chu, C.B. Qi, Y.Q. Huang, H.P. Jiang, Y.H. Hao, B.F. Yuan, Y. Feng, Metal oxide-based selective enrichment combined with stable isotope labeling-mass spectrometry analysis for profiling of ribose conjugates, *Anal. Chem.* 87 (2015) 7364–7372, <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b01614>.
- [52] R. Todorovic, P. Devanesan, S. Higginbotham, J. Zhao, M.L. Gross, E.G. Rogan, E.L. Cavalieri, Analysis of potential biomarkers of estrogen-initiated cancer in the urine of Syrian golden hamsters treated with 4-hydroxyestradiol, *Carcinogenesis* 22 (2001) 905–911, <https://doi.org/10.1093/carcin/22.6.905>.
- [53] G.W. Lien, C.Y. Chen, G.S. Wang, Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for determining estrogenic chemicals in water by liquid chromatography tandem mass spectrometry with chemical derivatizations, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 956–966, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.12.023>.
- [54] P. Panuwet, R.E. Hunter Jr., P.E. D'Souza, X. Chen, S.A. Radford, J.R. Cohen, M.E. Marder, K. Kartavenka, P.B. Ryan, D.B. Barr, Biological matrix effects in quantitative tandem mass spectrometry-based analytical methods: advancing bio-monitoring, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 46 (2016) 93–105, <https://doi.org/10.1080/10408347.2014.980775>.
- [55] L. Silvestro, I. Tarcomnicu, S.R. Savu, Matrix effects in mass spectrometry combined with separation methods – Comparison HPLC, GC and Discussion on Methods to Control these Effects, Chapter 1, *Tandem Mass Spectrometry – Molecular Characterization* (2013) 1–37, <https://doi.org/10.5772/55982>.
- [56] T. Lundstedt, E. Seifert, L. Abramo, B. Thelin, A. Nyström, J. Pettersen, R. Bergman, Experimental design and optimization, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 42 (1998) 3–40, [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(98\)00065-3](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(98)00065-3).
- [57] X. Huang, D. Yuan, B. Huang, Determination of steroid sex hormones in urine matrix by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and liquid chromatography with diode array detection, *Talanta* 75 (2008) 172–177, <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2007.10.052>.
- [58] M.S. Chang, J.Y. Shen, S. Yang, G.J. Wu, Determination of three endocrine disrupting chemicals, triclosan, 4-n-nonylphenol, and di-n-butyl phthalate using stir bar sorptive extraction in samples of different matrices, *Toxicol. Environ. Chem.* 94 (2012) 1027–1033, <https://doi.org/10.1080/02772248.2012.684687>.
- [59] M. Kawaguchi, R. Ito, H. Honda, N. Endo, N. Okanouchi, K. Saito, Y. Seto, N. Hiroyuki, Determination of urinary triclosan by stir bar sorptive extraction and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 577–580, <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.10.008>.