

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



“Desarrollo de una metodología analítica para determinar Cotinina y trans-3’-Hidroxicotinina en orina mediante la microextracción por sorción con disco rotatorio (RDSE) y cuantificación en GC-MS”

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Química área de Especialización en Química Analítica y Memoria para optar al Título de Químico por:

Claudia Daniela Carrasco Farfán

Director de Tesis: Dr. Pablo Richter Duk.

Co Director: Muriel Alfaro
Lourdes Jachero

Santiago, Chile

2021

Handwritten signature of Pablo Richter on a horizontal line.

Firma Director Pablo Richter

Handwritten signature of Lourdes Jachero on a horizontal line.

Firma Co-Director Lourdes Jache

Handwritten signature of Muriel Alfaro on a horizontal line.

Firma Co-Director Muriel Alfaro

AGRADECIMIENTOS:

Agradecimientos al Proyecto FONDECYT N°1180742 por el financiamiento para realizarse este proyecto.

Primero que todo quiero agradecer a mi familia, mi apoyo incondicional, quienes desde pequeña me han guiado y apoyado en cada paso que he dado en mi vida. Mi pilar fundamental, mis padres, hemos crecido juntos y espero la vida me permita devolverles algo de todo lo que nos han entregado a mí y a mis hermanos. Mi abuelo y mi tía, mis hermanitos, cada uno a su forma me entrega su cariño, respeto y admiración, gracias por sacarme una sonrisa hasta en el día más difícil, para ustedes todo y más. Gracias también a mis abuelos, mis tíos, mis primos, que pese a no entender muy bien lo que estudie siempre tenían palabras de apoyo y siempre han confiado mucho en mí.

Quiero agradecerles a mis amigas de la vida, Cata, Carola, Pancha, Maciel, Kote, Clau, Javi, Isi y Naty, más de 12 años de amistad, nos hemos visto crecer, caer, levantarnos, cumpliendo metas, logrando sueños, disfrutando la vida y siempre estamos la una para la otra. Gracias por soportarme, mi carácter es difícil, lo sé, pero ustedes me han enseñado a ser una mejor persona y espero nos sigamos acompañando toda la vida. Mis amigos de crossfit, los más antiguos, Maca, Waro, Papa y Figa, gracias por tanto deporte, comida y chelas a la vez, claro que iremos por unas birras a celebrar, me han visto crecer y sufrir con mi carrera. Mis amigos de crossfit más actuales, ustedes han estado en el último año de carrera y para mí el año más difícil, tratar de retomar mi tesis una y otra vez, andar bajoneada porque no llegan reactivos, porque esto no sale o porque esto se echó a perder y luego llegar a entrenar y que en cosas de segundos me alegren, motiven y me tiren para arriba de verdad que se los agradezco. Han logrado despertar en mí nuevamente las ganas de hacer algo que me apasiona, retomar la vida luego de los años que llevamos de pandemia ha sido muy difícil, pero he conocido a personas que se han vuelto muy especiales para mí en mi querido box de crossfit Roots React, de esas personas que te dan una tranquilidad impagable, que no me han dejado bajar los brazos, que han estado en todas y se han tornado muy importantes, ¡¡¡gracias!!!

Gracias a todas las personas que conocí y me acompañaron durante mi carrera en la facultad de ciencias químicas y farmacéuticas, han sido varios y con muchos ya no tengo contacto, pero los recuerdo y muchos fueron super importantes para mí en su momento. Ahora me queda Palmita y la Dani, gracias por tanto aguante chiquillos, nos hemos acompañado en muchas desveladas de estudio, gracias por todos los almuerzos compartidos y por andarme acordando siempre de cada tarea, prueba, guía o cualquier cosa jajaja siempre ando haciendo muchas cosas en mi día a día y agradezco apañarme en todas.

No puedo olvidarme de mis compañeros de laboratorio, Ale, Dani, Inmaculada, gracias por ayudarme siempre, por enseñarme todo, por responder todas mis preguntas y tener siempre las mejores condiciones posibles para desarrollar mi tesis, soy una persona difícil de conocer, media fría y de pocas palabras como me decían jajaja pero de a poco nos fuimos soltando más y siempre estaré muy agradecida de todos ustedes. Gracias a Luis Honda, mi primer tutor en el laboratorio de química ambiental, fuiste mi mentor y mi modelo a seguir en el cómo a trabajar en el laboratorio, fuiste una persona muy leal conmigo, inclusive ya no estando en el laboratorio hasta el último día ayudando y consiguiendo materiales y reactivos para mi tesis, de verdad muchas gracias y agradezco a la vida por ponerte en mi camino, al igual como agradezco a Betsa, fuiste muchas veces la luz en mi camino oscuro y me siento infinitamente agradecida de todo lo que ayudaste y de cuánto te comprometiste con mi tesis, eres una gran persona y profesional y te recordare siempre como un hada madrina.

Gracias a mis amigos del ISP, Paolita, Pancho y Naty, ¡¡¡me acompañaron en una de las etapas más difíciles hasta ahora en mi vida y me enseñaron a salir a delante como nadie!!! Los llevo en mi corazón siempre.

Finalmente, gracias al profesor Pablo Richter y a la profesora Inés ahumada por recibirme en el laboratorio, por creer en mí y por transmitirme siempre todos sus conocimientos. También agradezco a Muriel y Lourdes por su constante apoyo pese a las condiciones difíciles en las que nos tuvimos que desenvolver. A todas estas personas y a todos los que quizás olvide mencionar muchas muchas gracias.

ÍNDICE.

I. INTRODUCCIÓN.....	10
II. HIPÓTESIS.....	23
III.OBJETIVOS	24
3.1. Objetivo General.	
3.2. Objetivos Específicos.	
IV. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	25
V. METODOLOGÍA.....	27
5.1. Identificación de los analitos mediante GC-MS.	27
5.2. Condiciones Cromatográficas.	27
5.3. Derivatización de los analitos.	28
5.4. Optimizaciones de las variables químicas e hidrodinámicas.	28
5.5. “Clean up”.	31
5.6. Validación del método analítico.	31
5.7. Curva de calibración.....	32
5.8. Aplicación del método validado a muestras reales de orina para estimar los niveles de los metabolitos de la Nicotina estudiados.....	32
5.9. Eco-escala analítica.....	33
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
6.1. Optimización del método de derivatización.	35
6.2. Optimización de variables químicas e hidrodinámicas.....	36
6.3. “Clean up”.	52
6.4. Validación del método.	53
6.5. Curva de calibración.....	54
6.6. Muestras reales.....	57

6.7. Comparación teórica con otras metodologías de extracción y/o cuantificación de los analitos.....	63
6.8. Eco-Escala analítica.....	64
VII. CONCLUSIONES.....	66
VIII. REFERENCIAS.....	67

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Nicotina y sus Metabolitos.....	17
Figura 2. Estructura química Cotinina e Hidroxicotinina	18
Figura 3. Disco plano	21
Figura 4. Disco con cavidad central.....	21
Figura 5. Diagrama GC-MS.....	22
Figura 6. Estructura de distintas fases sorbentes	29
Figura 7. Cromatograma post derivatización de analitos.....	35
Figura 8. Área en función de la fase sorbente utilizada (MCX o HLB) para la extracción de COT e HC	37
Figura 9. Área en función de la cantidad de fase MCX (mg) para la extracción de COT	38
Figura 10. Área en función de la cantidad de fase MCX (mg) para la extracción de HC.	39
Figura 11. Área en función de la cantidad de fase MCX (mg) para la extracción de COT.....	40
Figura 12. Área en función de la cantidad de fase MCX (mg) para la extracción de HC.	41

Figura 13. Área en función de la solución de desorción para la extracción de COT.	43
Figura 14. Área en función de la solución de desorción para la extracción de HC.	43
Figura 15. Área en función del tiempo de extracción para COT	45
Figura 16. Área en función del tiempo de extracción para HC.....	46
Figura 17. Área en función de la velocidad de agitación (rpm) para la extracción de COT.....	47
Figura 18. Área en función de la velocidad de agitación (rpm) para la extracción de HC.	48
Figura 19. Área en función del tiempo de desorción (min) para la extracción de COT.	49
Figura 20. Área en función del tiempo de desorción (min) para la extracción de HC.	50
Figura 21. Área en función del volumen de muestra (ml) para la extracción de COT..	51
Figura 22. Área en función del volumen de muestra (ml) para la extracción de HC	51
Figura 23. Curva de calibración para COT	54
Figura 24. Curva de calibración para HC	56
Figura 25. Cromatograma curva de calibración 250ppb.....	57
Figura 26. Cromatograma correspondiente a muestra de fumador pasivo.....	61
Figura 27. Cromatograma correspondiente a muestra de fumador activo.....	62

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla I. Propiedades fisicoquímicas de la Cotinina.....	19
Tabla II. Tiempos y masas correspondientes a los compuestos sililados.....	35
Tabla III. Áreas de los analitos COT e HC en diferentes fases sorbentes... ..	37
Tabla IV. Áreas de los analitos COT e HC variando la cantidad de fase sorbente	39
Tabla V. Áreas de los analitos COT e HC variando la cantidad de fase sorbente MCX.....	42
Tabla VI. Áreas de los analitos COT e HC variando la solución de elución.....	44
Tabla VII. Áreas de los analitos COT e HC variando el tiempo de extracción	46
Tabla VIII. Áreas de los analitos COT e HC variando la velocidad de extracción.	49
Tabla IX . Áreas de los analitos COT e HC variando el tiempo de desorción.....	50
Tabla X. Áreas de los analitos COT e HC variando la cantidad de muestra de orina.	52
Tabla XI. Parámetros analíticos del método.	54
Tabla XII. Condiciones óptimas de la metodología.	57
Tabla XIII. Resultados muestras reales	58
Tabla XIV. Comparación teórica de los resultados.....	63
Tabla XV. Puntos de penalización de la metodología.....	65

RESUMEN:

Un contaminante emergente de gran renombre estos últimos años ha sido la Nicotina. La Nicotina es el componente principal del humo del tabaco, pero este a la vez se metaboliza en diversos otros compuestos químicos dañinos para la salud. La Cotinina es el metabolito que se genera en mayor concentración, y este a su vez, se convierte en trans-3'-Hidroxicotinina.

Se han reportado diversos estudios de efectos adversos para la salud el estar expuesto a estos metabolitos de forma prolongada, no solamente en fumadores activos, sino que también en fumadores pasivos, ya que estos últimos se encuentran expuestos silenciosamente sin tener un control del tiempo o concentraciones que se van acumulando.

La cuantificación de este tipo de analitos está dada principalmente en muestras biológicas como el plasma, el pelo, las uñas y la orina, siendo esta última la de interés en el presente estudio por su fácil recolección y de mayor acceso respecto a otras, pero a la vez puede ser un gran desafío debido a las bajas concentraciones que se pueden encontrar, necesiéndose rigurosos pasos de preparación de muestra antes de su determinación analítica.

En este trabajo se desarrolló una metodología analítica para la determinación de la Cotinina y la trans-3'-Hidroxicotinina desde muestras de orina, mediante la técnica de microextracción por sorción en disco rotatorio (RDSE), y su posterior detección y cuantificación mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

RDSE se seleccionó por ser una técnica económica, versátil y ecoeficiente (química verde), mientras que GC-MS ofrece una buena sensibilidad y límites de detección bajos para la investigación en muestras complejas.

Los analitos son retenidos y pre concentrados en la fase sorbente Oasis MCX, la cual se encuentra inmovilizada sobre un disco rotatorio con cavidad central. Las condiciones óptimas de extracción fueron: Una agitación de 2000 rpm por un tiempo de 60 minutos, volumen de muestra de 20 mL (2 mL de orina y 18 mL de solución acida de HCl 0.5), “clean up” post extracción con 10 mL de una solución metanol – agua (30:70) por 20 minutos, desorción de una etapa de 20 minutos con 10 mL de una solución amoniaco-metanol (20:80). Posteriormente el extracto se evaporó con nitrógeno hasta sequedad para seguir con la derivatización donde al eluato seco se le agregó 50 μL del derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) y 50 μL de piridina llevando esto a un ambiente de 70°C por 30 minutos. Una vez realizada la derivatización, se inyectó 2 μL de muestra en el GC-MS. Además, en el proceso se incorporó un estándar “surrogate” rac-Cotinine-D₃.

Los límites de detección y cuantificación del método fueron de 0.7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y 0,9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para tran-3'-Hidroxicotina respectivamente y de 21 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y 29 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para Cotina respectivamente. Las recuperaciones en muestras blanco de orina que fueron enriquecidas con 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de los analitos y fueron de un 56% para trans-3'-Hidroxicotina y de un 86% para Cotina.

El método descrito fue aplicado en 8 muestras reales provenientes tanto de mujeres como de hombres en un amplio rango de edad (4 a 84 años) correspondientes tanto a fumadores activos como a fumadores pasivos. La concentración de los analitos detectados se obtuvo en un intervalo de 475-1119 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para trans-3'-Hidroxicotina y de 113-1108 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para Cotina.

I.INTRODUCCIÓN:

La exposición a la contaminación ambiental es y seguirá siendo una fuente importante de riesgo para la salud humana a nivel mundial, aún más en países en vías de desarrollo donde la pobreza, la falta de inversión en tecnología moderna y la debilidad de la legislación ambiental se combinan para causar altos niveles de contaminación. [1].

Según datos de sociedades médico-científicas y de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la contaminación atmosférica causa unos 7 millones de muertes en todo el mundo cada año. De acuerdo con sus informes, la contaminación del aire causa el 24% de todas las muertes de adultos por cardiopatías, el 25% de las muertes por accidentes cerebrovasculares, el 22% de los fallecimientos por enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y el 29% de las muertes por cáncer de pulmón. De los tumores pulmonares generados en hombres un 90% es causado por la exposición al tabaco y un 80% en mujeres, dado que la población expuesta es considerablemente grande. El impacto de los factores medioambientales en la salud de la población infantil, según datos del informe “No contamines mi futuro” de la OMS, estima en más de una cuarta parte; 1,7 millones; las defunciones de niños menores de 5 años que son consecuencia de la contaminación ambiental, de éstas muertes, 570.000 (29%) son consecuencia de infecciones respiratorias, entre ellas la neumonía, además estos niños son mucho más propensos a desarrollar asma y enfermedades a nivel cerebral y cardiaco [1].

El impacto de las actividades humanas y los problemas de salud ambiental se hacen cada vez más global en escala y extensión, y es de suma urgencia la necesidad de reconocer y abordar los riesgos para la salud asociados con la contaminación ambiental. La acción efectiva de esto requiere una comprensión no solo de la magnitud del problema, sino también de sus causas y procesos, para que así la intervención pueda dirigirse a donde es más necesaria y por consecuencia tenga el mayor efecto.

En las últimas décadas se han estudiado con mayor detención los contaminantes emergentes, como lo son, por ejemplo: los contaminantes que están asociados con el tráfico por carreteras, el uso de productos químicos en el hogar, en los alimentos, en el tratamiento del agua, control de plagas y también los producidos por combustión simple, entre otros [2]

Estos contaminantes emergentes rara vez los encontraremos en grandes concentraciones, por el contrario, siempre estarán a niveles traza, por lo que sus efectos sobre la salud están lejos de ser inmediatos, y hasta que se comiencen a manifestar sus efectos (como irritación de los ojos, nariz, garganta, problemas respiratorios, entre otros.). Enfatizamos en que las personas están expuestas a tales contaminantes, esto es precisamente nuestra preocupación: “la exposición”, ya que esta implica riesgos para la salud humana, por tanto, es de interés en salud pública.

Los contaminantes se dividen en los de mayor concentración, como lo son los provenientes de fuentes industriales, es decir, se liberan en grandes cantidades, altas temperaturas, y se logran dispersar de mejor forma en el medio, y los de menor concentración o fuentes interiores, referente a contaminantes provenientes de vehículos, chimeneas, ingesta de tabaco, entre otros. Se liberan en menores cantidades, temperaturas más bajas y su contaminación, es más bien local.[3]

Uno de los contaminantes de menor concentración de especial interés en salud pública, ya que son dañinos para la salud es la Nicotina y sus derivados, los cuales se emanan al consumir tabaco.

El consumo de tabaco se ha ido incrementando con el paso de los años. El problema está, en que este hábito suele convertirse muy rápido en una adicción, es decir, que las personas dependen de este de manera psicológica e incluso fisiológica sin ser conscientes de lo perjudicial que es el tabaco para la salud humana[4].

La Organización Mundial de la Salud (OMS) aconsejó la sustitución del término adicción, por el concepto más preciso y con menos connotaciones negativas como lo es: “Dependencia”.

En la base de toda farmacodependencia coinciden siempre 3 constantes:

- 1.La existencia de un producto psicoactivo cuyos efectos se consideran merecedores de ser re experimentados.
- 2.La instauración de un condicionamiento de tipo operante en el que él fármaco actúa como elemento reforzador.
- 3.La existencia de diversos estímulos que se presentan simultáneamente a la administración de la sustancia y que quedan asociados por un condicionamiento clásico a ella o a sus efectos.[5]

Diversos estudios epidemiológicos revelan asociación entre el hábito de fumar y distintas enfermedades como son: cáncer de pulmón, déficit atencional, hiperactividad y autismo en niños, además de enfermedades respiratorias, problemas arteriales e incluso digestivos, entre otras, dada la exposición prolongada al humo de tabaco ambiental (ETS), la cual no se encuentra controlada. Esta asociación por lo demás, se hace extensiva a fumadores pasivos [6][7][8][9].

El acto de fumar involucra a un fumador activo (el que está fumando tabaco), y uno pasivo (el que está alrededor de quien fuma tabaco), y ambos se ven afectados por los efectos negativos del acto. Fumadores activos y pasivos están expuestos al ETS, el cual se compone de una mezcla de humo lateral y humo convencional siendo el humo que emerge directamente de los cigarrillos y el humo exhalado por los fumadores respectivamente.

El ETS está compuesto por más de 5000 componentes o sustancias químicas, 400 de ellas muy tóxicas, unas 50 cancerígenas y unos 12 gases tóxicos[4]. Los fumadores activos se exponen principalmente a Nicotina, sustancia responsable de la adicción y dependencia física, Monóxido de Carbono que es un gas toxico que disminuye la cantidad de oxígeno que necesita el cuerpo, Alquitrán, es el principal agente cancerígeno contenido en el humo del tabaco asociado directamente al cáncer de pulmón, y diferentes gases irritantes, los cuales son responsables de la tos, catarros y bronquitis habituales, estos gases alteran los mecanismos defensivos del pulmón favoreciendo las infecciones.

Los fumadores pasivos, están expuestos a un 75% del humo total, correspondiente a la corriente lateral que emana del cigarrillo, estas sustancias son más dañinas que las sustancias a las que se exponen los fumadores activos ya que proceden de una combustión incompleta, como son: Amoniaco, Dióxido de Carbono, Azufre, entre otras. Todas sustancias irritantes de las mucosas (ojos y vías respiratorias), sustancias químicas cancerígenas orgánicas como: Hidrocarburos Aromáticos policíclicos y Benceno e inorgánicas como son: Arsénico, Cromo, Cadmio, etc. Y a sustancias radiactivas como el Polonio[10].

Según la OMS en la actualidad el consumo de tabaco es la principal causa de mortalidad evitable en el mundo. Se reportan alrededor de 4,9 millones de defunciones anuales relacionadas al tabaco. El 21 de mayo de 2003 la 56ª Asamblea Mundial de la Salud adoptó por unanimidad el Convenio Marco de la OMS para el Control del Tabaco. Corresponde al primer instrumento jurídico diseñado para reducir las defunciones y enfermedades asociadas con el tabaco en todo el mundo [11].

Este tratado contiene principios y obligaciones para los Estados, dando mayor enfoque a la protección contra la exposición al humo del tabaco, la reglamentación del contenido y la divulgación de la información sobre los productos del tabaco, el empaquetado y etiquetado, publicidad, promoción y patrocinio. Además compromete a los Estados a promover y fortalecer la concientización del público a través de programas integrales de educación, de capacitación en medidas de control para diferentes profesionales entre muchas otras medidas [12].

Chile, desde 2003 ha participado activamente del proceso de elaboración, negociación y adopción del Convenio Marco, poniendo como prioridad proteger la salud pública. Nuestro país expone datos preocupantes, el 43% de la población de entre 12 y 64 años está consumiendo tabaco, el 70% de los niños de 15 años ya ha consumido tabaco, y un 13% de ellos ya lo había hecho antes de los 7 años, el 42% de los escolares consume tabaco, la mitad de ellos lo hace diariamente, y se estima que la edad de inicio es alrededor de los 13 años.

Se estima que durante el año 1999 alrededor de 13.000 personas murieron en nuestro país a consecuencia de las enfermedades asociadas al consumo de tabaco (16% de las muertes ocurridas ese año)[12]. En la actualidad, las principales causas de muerte en Chile son : cardiopatías coronarias, neumonías, cáncer de estómago y cirrosis, estando la gran mayoría, asociadas a la exposición de tabaco, o que el tabaco puede ser un factor de riesgo [13].

En Octubre de 1995 fue publicada la Ley N°19.419, Ley antitabaco de Chile que regula y restringe el consumo, venta y publicidad de productos hechos con tabaco en Chile. Así se insertó la obligatoriedad de insertar por ejemplo la frase:” ADVERTENCIA: El tabaco es dañino para la salud. Ministerio de Salud” al final de anuncios televisivos, radiales y en publicaciones impresas. También se tomaron medidas como establecer que la edad mínima para el consumo del tabaco es de 18 años, además de prohibir la venta de cigarrillos a menos de 100 metros de distancia de establecimientos escolares, entre otras medidas[14].

En Mayo de 2006 se promulgó La Ley N°20.105, la cual modifica la Ley N°19.419, en materias relativas a la publicidad y el consumo del tabaco[15]. La presente Ley, permite el consumo de tabaco en lugares públicos, como son: bares, restaurantes, pubs, discotecas, casinos de juegos, cabarets, entre otros, bajo ciertas restricciones según superficie de local y tipo de patente. Respecto a la exposición laboral a ETS en los lugares públicos, el Decreto Supremo N°594 “ Reglamento sobre Condiciones Sanitarias y Ambientales Básicas en los Lugares de Trabajo en Chile”, no hace referencia al ETS como contaminante y, por lo tanto, no existe regulación respecto a esta exposición en trabajadores que muchas veces están expuestos de forma involuntaria al ETS, correspondiendo así a fumadores pasivos.[15]

En marzo de 2013 se promulga “La nueva Ley del Tabaco”, la Ley N°20.660, la cual aumenta las restricciones al consumo, venta y publicidad del cigarrillo, además de establecer una nueva regulación en materia de ambientes libres de humo de tabaco. Esta ley prohíbe el consumo en lugares cerrados accesibles al público o de uso comercial colectivo, terrazas y en recintos deportivos, estadios o gimnasio incluyendo actividades artísticas o musicales.

En cuanto a la venta y publicidad de tabaco, la ley prohíbe la venta de cigarrillos a menos de 100 metros de distancia de colegios, la venta o entrega gratuita de cigarrillos en unidades o sueltos, todo tipos de publicidad del tabaco, fumar en programas de televisión en vivo los cuales son emitidos en horarios de menores, la publicidad de tabaco en páginas de internet con dominio en terminación “punto cl”, y por último prohíbe las cajetillas de cigarros que contengan términos tales como: light, suave, ligero o bajos en alquitrán, nicotina o similares. Uno de los objetivos principales de esta nueva ley es proteger a los fumadores pasivos [16].

Con la implementación de nuevas leyes antitabaco, Chile se ajusta paulatinamente a los parámetros que exige el convenio Marco de la OMS, estableciendo políticas públicas orientadas a la disminución del consumo, similares a países como Uruguay, EE.UU, España y Escocia, los cuales implementaron la prohibición total de fumar en lugares públicos abiertos o cerrados, restricción para el consumo de cigarrillo en plazas o lugares públicos frecuentados por menores de edad, además de eliminar la publicidad asociada al consumo de tabaco[17].

Una encuesta transversal realizada en Canadá el año 2010, con representatividad a nivel nacional, evidencia que las personas de todos los grupos de edad se ven afectadas por el ETS, pero particularmente los niños y adolescentes, ya que nada privatiza a los adultos de consumir tabaco al interior de sus hogares, donde comparten el espacio con todo el grupo familiar [18].

En Chile la realidad no es distinta. Así lo demostró la Encuesta Nacional de Salud (ENS) realizada en el año 2009, esta da cuenta que las consecuencias para la salud derivadas del hábito de fumar han alcanzado niveles que lo definen como un problema de carácter epidémico, es decir, se han desarrollado enfermedades a causa de este hábito las cuales se han propagado de forma rápida y activa, aunque aún se mantiene en un área geográfica concreta. Esta epidemia está afectando a personas de todas la edades y condición social, y los efectos más dañinos están afectando no sólo a los fumadores activos, sino que también a todas las personas que están expuestas al humo del tabaco.

La Sociedad Chilena de enfermedades respiratorias considera que es deber ineludible del Estado otorgar prioridad al control del tabaquismo en el país, ya que la magnitud del problema, su gravedad y sus repercusiones de esta forma se podrían ver bajo control[19].

Las vías o procesos de exposición son variados, estas pueden ser en mayor grado por vía respiratoria (inhalación de un contaminante al interior o exterior de algún lugar), o por ingesta de diversos alimentos que estén contaminados [20].

Un biomarcador es una herramienta de información para la evaluación de factores de riesgos asociados a la exposición a agentes ambientales. Un biomarcador se produce en un sistema biológico y se interpreta como indicador del estado de salud, de la esperanza de vida o del riesgo de enfermedad. Suelen clasificarse en biomarcadores de: exposición, efecto y de susceptibilidad, enfocándonos nosotros en los biomarcadores de exposición. [21]

Los biomarcadores de exposición se pueden determinar en diversas matrices biológicas (pelo, uñas, sangre, saliva, orina, entre otras). Se puede evaluar la molécula u átomo original o su metabolito, es decir, una sustancia que el cuerpo metaboliza en el organismos, como son: digestión de alimentos, medicamentos o sustancias químicas o incluso su propio tejido (grasa o tejido muscular)[22].

Las características de un biomarcador ideal son: a) sensibilidad, es decir, respuesta del instrumento a un cambio en la concentración de analito, por lo tanto mientras mayor es la respuesta del instrumento frente una modificación de la concentración del biomarcador, mayor es la sensibilidad del procedimiento [23], b) especificidad, da cuenta de cuan exclusiva es una señal para un componente particular, más específico será un método si tenemos una señal exclusiva por componente y no una señal que hable de los otros componentes en la muestra [23] y c) una vida media biológica utilizable, es el tiempo requerido para que la cantidad de una sustancia específica presente en las muestra sea reducida a la mitad de su valor mediante procesos biológicos, en nuestro caso será útil trabajar con una sustancia de vida media biológica larga, ya que tienden a acumularse en el cuerpo y contamos con un tiempo suficiente para detectarlo [24]-[4].

Durante muchos años el biomarcador más utilizado para medir la exposición al ETS ha sido la Nicotina, en diversas matrices: pelo, uñas, saliva y orina principalmente. La Nicotina es la sustancia responsable de la dependencia que ocasiona el tabaco, y se habla además que posee propiedades reforzadoras como aumento del placer, euforia, disminución de la irritabilidad, estrés, también puede alterar el apetito y suprimir el aumento de peso.[5]

Si bien la Nicotina es un excelente biomarcador, ya que se suele encontrar en alta concentración en las muestras de estudio, últimamente se ha comenzado a trabajar con los metabolitos de la Nicotina dado que se han encontrado mejores resultados por su mayor vida media. En la figura 1 se muestra un esquema de la Nicotina y sus metabolitos.

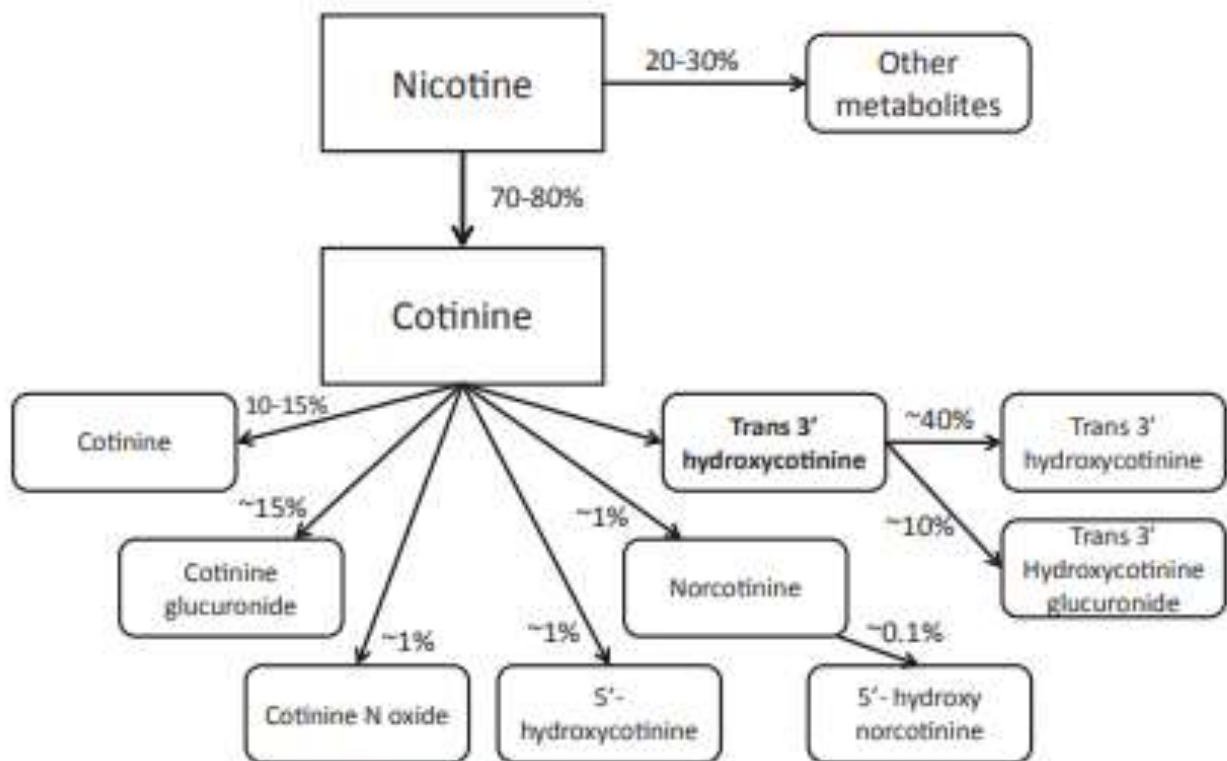


Figura1. Nicotina y sus Metabolitos.

La Nicotina se metaboliza a Cotinina (COT) y luego a trans-3'-hidroxicotinina (HC) principalmente por la enzima CYP2A6. En la figura 2, se muestran las estructuras de la Cotinina y la trans-3'-Hidroxicotinina, de nombre químico 1-metil-2-(3-piridinil)-2-pirrolidina y 1-metil-3-hidroxi-5-(3-piridil)-2-pirrolidinona, respectivamente.

El interés de estudiar los metabolitos de la Nicotina por sobre la Nicotina es por una de las características de un buen biomarcador, esta característica es la vida media del analito. Por ejemplo, La COT tiene una vida media a 15 a 20 horas en comparación con la Nicotina que tiene una vida media de 0.5 a 3 horas, por lo que al trabajar con la COT estaríamos frente a un mejor marcador de exposición.[25]

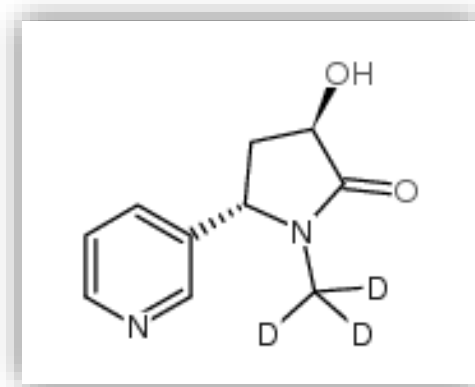
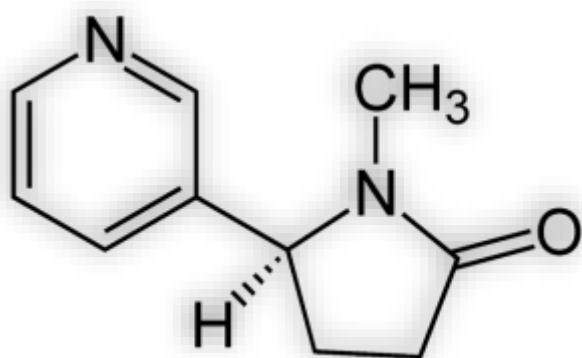


Figura 2. Estructura química Cotinina y trans-3'-Hidroxicotinina.

Dado lo anterior, es que la COT se considera un biomarcador específico para evaluar la exposición al ETS, además al encontrarse en fluidos biológicos es idéntica a la Nicotina y se encuentra en concentraciones más altas. La COT con propiedades fisicoquímicas mostradas en la Tabla I se hidroxila para dar paso a la HC que se elimina en gran parte como fármaco inalterado, por lo que, al encontrar este metabolito en muestras de orina, por ejemplo, estaríamos si o si frente a un consumidor activo de tabaco o a un consumidor pasivo del tabaco.

Tabla I. Propiedades fisicoquímicas de la Cotinina.

Peso Molecular	176,21 g/mol	Log Kow	0.07
Punto de Ebullición	210 °C	Constante de Henry	$3,3 \times 10^{-12} \text{ atm} \cdot \text{m}^3/\text{mol}$
Solubilidad en agua	$1.0 \times 10^6 \text{ mg/L}$	Pka	4.79

Ambos metabolitos son persistentes en matrices biológicas por su escasa solubilidad en lípidos, y se pueden medir en muestras de orina, muestra de fácil recolección, de la cual se pueden obtener volúmenes adecuadas para trabajar, universal y por lo tanto menos invasiva que otras muestras de trabajo como por ejemplo el plasma. [26] [18]

A lo largo de los años son variadas las metodologías analíticas que se han utilizado para cuantificar nuestros analitos de estudio en muestras de orina, siendo una parte fundamental la preparación de la muestra para mejorar la sensibilidad y selectividad del análisis cromatográfico dado que el o los analitos de interés se encuentran en cantidades traza dentro de una matriz compleja (orina), llena de diferentes potenciales interferentes. Lo mencionado anteriormente se ha logrado a través de extracción líquido-líquido (LLE) [27][28][29]o extracción en fase sólida (SPE) [30]–[33].

El principio básico de LLE implica la transferencia y preconcentración del analito desde una fase líquida, donde generalmente es una muestra acuosa a otra fase líquida, orgánica e inmiscible. En general el procedimiento completo de esta metodología analítica consta de 4 a 5 pasos: extracción, sonicación, centrifugación, evaporación y reconstitución, los cuales son lentos y tediosos siendo esto una desventaja de esta metodología además del uso de grandes volúmenes de solvente, lo que se torna problemático por la relación consumo/eliminación de reactivos.

Para solucionar los problemas que presenta LLE se desarrolló la SPE, la extracción en fase sólida, esta ofrece una extracción más eficiente, apuntando a conseguir una química verde, se logra una mejora en la eficiencia de la extracción de muestras, además de reducir la posibilidad de contaminación de la muestra. Posteriormente se desarrolló la micro-extracción en fase sólida (SPME), en donde el dispositivo de extracción consiste un capilar tubular de sílice fundida, que contiene una micro fase de extracción.

En el año 2009 se desarrolló la micro extracción por sorción en disco rotatorio (rotating disk sorptive extraction) (RDSE), basándose en la tecnología de biorreactores rotatorios [34] y siendo una alternativa a la micro-extracción en fase sólida (SPME).

RDSE es una técnica ecoeficiente o verde, el dispositivo principal es de bajo costo y versátil con respecto a la fase que requiere ser inmovilizada, teniendo como ventaja por sobre las técnicas precedentes, que la fase posee nulo contacto con las paredes del recipiente que contiene la muestra, lo que evita que, a altas velocidades de rotación, se dañe la fase, debido al continuo roce durante la extracción. Otra ventaja es que el dispositivo de RSDE posee una mayor relación área/volumen de la fase, ya que toda la fase está en contacto con la solución.

Existen dos conformaciones para el disco rotatorio, dependiendo de la fase utilizada; disco plano, para fases laminares y disco con cavidad central, para fases en polvo, Figura 3 y 4 respectivamente. Para el disco plano se han utilizado sorbentes en lámina como C18, polidimetilsiloxano (PDMS) o corcho, permitiendo la extracción de compuestos apolares y semi polares. En el caso del disco con cavidad central se pueden acomodar sorbentes en polvo como C18 y Oasis HLB, permitiendo este último la extracción de compuestos de distinta polaridad al ser un copolímero con balance hidrofílico-lipofílico. Esto nos permite poder utilizar la fase sorbente más adecuada según el analito en estudio [35][36], [37].

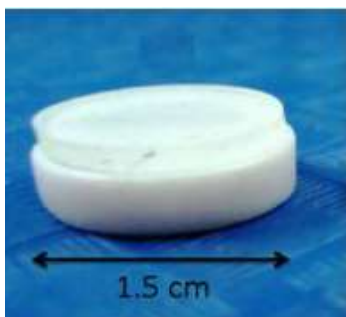


Figura 3. Disco rotatorio Plano.



Figura 4. Disco rotatorio con cavidad central.

La determinación analítica se realiza mediante cromatografía, la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) fue la pionera para la determinación de estos analitos, la cual implica la separación de los componentes de una mezcla cuantificando a la vez la cantidad de cada componente en la muestra.

El principio básico de la cromatografía líquida consta de un solvente líquido que se pasa a través de una columna adsorbente, lo que lleva a que cada componente de la mezcla fluya a distintas velocidades según la afinidad con el solvente. HPLC funciona bastante bien para determinar cotinina en orina en niveles de 1-5000 microgramos / litro ($\mu\text{g/L}$) [18].

Alternativamente se pueden utilizar otras técnicas de cuantificación, en busca de rangos más sensibles de determinación y selectividad. La cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) utiliza un gas como disolvente para eluir los diferentes componentes de una mezcla, este gas a menudo es nitrógeno o helio, luego el flujo se analiza utilizando un espectrómetro de masas que ioniza los compuestos químicos para generar moléculas cargadas las cuales son evaluadas, esto se representa en la Figura 5, GC-MS ha logrado determinaciones de incluso $0.2 \mu\text{g/L}$ para los analitos en estudio [22].

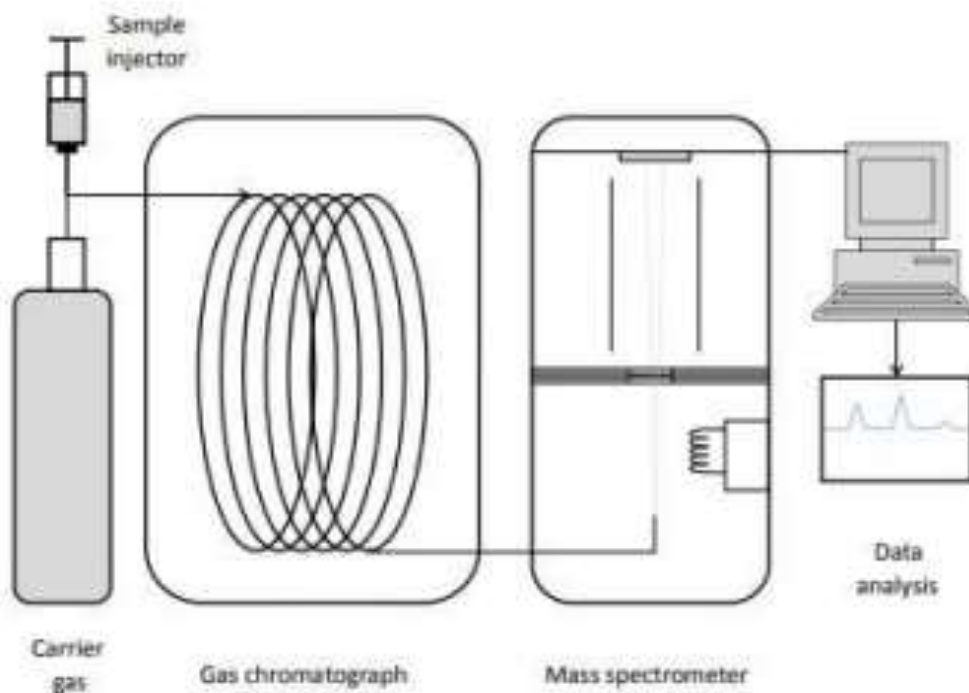


Figura 5. Diagrama GC-MS.

Cabe mencionar, que para la utilización de GC-MS como metodología de cuantificación se deben derivatizar los analitos ya que permite mayor volatilidad y estabilidad térmica, pero una mayor demanda de tiempo ya que la medición no es directa como el caso de la cuantificación por HPLC. Pero estamos mejorando las propiedades de espectrometría de masas mediante la producción de patrones de fragmentación más favorables. La derivatización se puede llevar a cabo usando diferentes reactivos como N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) o N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA), también con la finalidad de mejorar la derivatización, se utilizan catalizadores, tales como la dimetilformamida o piridina [38], [39].

El propósito de esta investigación es el desarrollo de una metodología analítica que permita de determinación de COT e HC en muestras de Orina. Para el desarrollo de la metodología se realizará una micro extracción por sorción con disco rotatorio (RDSE), derivatización y su posterior medición por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Pudiendo así dimensionar la exposición de diferentes poblaciones a los metabolitos de la Nicotina.

II. HIPÓTESIS:

“El uso de RDSE, con un dispositivo con cavidad central con la fase sorbente Oasis MCX permitirá la extracción de cotinina y trans-3'-Hidroxicotinina desde muestras de orina con una precisión y exactitud comparables a otras metodologías utilizadas, pero con mayor ecoeficiencia.

III. OBJETIVOS:

3.1 Objetivo General:

Desarrollar un método analítico para la determinación de cotinina y trans-3'-Hidroxicotinina en muestras de orina, mediante RDSE para la preparación de muestra, optimizando el proceso de extracción para su posterior cuantificación mediante GC-MS.

3.2 Objetivos Específicos:

1. Estudiar la derivatización de trans-3'-hidroxicotinina para su posterior determinación por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).
2. Identificar la cotinina y trans-3'-hidroxicotinina derivatizados en modalidad full scan, a través de estándares mediante GC-MS.
3. Desarrollar un método cromatográfico para determinar los analitos, mediante el monitoreo selectivo de iones (SIM).
4. Optimizar las variables que afectan en el proceso de extracción de los analitos en estudio mediante RDSE.
5. Determinar las propiedades analíticas del método de extracción, incluyendo su ecoeficiencia.
6. Aplicar el método analítico desarrollado para la determinación de los analitos en muestras reales.
7. Analizar e interpretar resultados.
8. Comparar los resultados obtenidos con otra metodología de extracción analítica, SPE.

IV. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS:

4.1 Reactivos:

- Metanol grado HPLC, Fisher Chemical (Canadá).
- Ácido clorhídrico fumante(37%), Merck (Darmstadt, Germany).
- Amonio Hidróxido, Chemix .
- Agua ultrapura (Milli-Q).
- Agente derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA), Merck (Darmstadt, Germany).
- Piridina, Merck (Darmstadt, Germany).
- Fase OASIS HLB, Water.
- Fase OASIS MCX, Water.
- Nitrógeno extrapuro $\geq 99,995\%$, Linde (Santiago, Chile).
- Helio extrapuro $\geq 99,9999\%$, Linde (Santiago, Chile).
- PSA (Primary Secondary Amine)

4.2 Estándares:

- Cotinina (-) $\geq 98\%$, Sigma Aldrich.
- Trans-3'-Hidroxicotinina $\geq 98\%$, Sigma Aldrich.
- Estandar Surrogate, rac-Cotinina-D₃ $\geq 99.26\%$, Logical.

4.3 Materiales:

- Discos de teflón con anillo y cavidad, 1,5 centímetros de diámetro con barra magnética.
- Material de vidrio, vasos precipitados, pipetas aforadas y matraces de aforo.
- Pipetas Pasteur Hirshman.
- Sacabocado de golpe 12 mm de diámetro, Boehm.
- Viales de vidrio 1.8, 12 y 20 mL con tapa con liner de teflón, SAGU.
- Filtro de fibra de vidrio, diámetro 12 mm, tamaño de poro 0,38 μm , Rilab.

4.4 Instrumentos y Equipos:

- Cromatógrafo de gases Thermo Fisher modelo Trace 1300, el cual cuenta con un detector de espectrometría de masas con analizador cuadrupolo simple, ISQ e inyector SSL. El modo de ionización del equipo es por impacto electrónico (EI), y como gas portador se utilizó helio de 99,9999 % pureza con un flujo de 1 mL/min, la columna capilar del equipo es de marca Restek RTX-5MS 30 m, 0,32 mm ID, 0,25 μm , con un máximo de temperatura de 350°C.
- Balanza analítica Precisa 125A, Swiss Quality, Suiza.
- Placa agitador magnético multipunto MS-52M, Jeio Tech, Korea.
- Agitador vortex, Mundo Lab.
- Micropipeta Brand, 1-5 mL, 20-200 μL , 10-100 μL , 100- 1000 μL .
- Turbo Vap LV, Biotage.
- Placa Térmica, VWR.

V. METODOLOGÍA:

5.1 Identificación de los analitos mediante GC-MS

Para la identificación de los analitos por GC-MS se utilizaron estándares de 10 ppm y de 1ppm de cada uno. Se realizó un ensayo en barrido completo de masas (modalidad FULL SCAN) en un rango de 40-300 m/z, se seleccionó un ion cuantificador en orden de abundancia y un ion cualificador para cada analito. El ion cuantificador o target ion, corresponde al ion de mayor abundancia y el ion cualificador o qualifer ion que confirma la presencia del analito. Luego se realizó el monitoreo selectivo de dichos iones (modalidad SIM), se utiliza como parámetro de confirmación de la presencia del analito en la muestra: el tiempo de retención y la razón de áreas de ambos iones (área cuantificador/área cualificador), la cual debe corresponder al mismo valor que se ha determinado en la medición de un estándar (+- 20%).

5.2 Condiciones Cromatográficas

El programa de temperaturas del horno inicia en 70°C por 2 min, luego alcanza los 210°C a una razón de 30°C/min manteniéndose por 0 min, finalmente llega a una temperatura de 290°C a 25°C/min por 2 min, con un solvent delay de 6 min. La temperatura del inyector es de 300°C en modalidad splitless, la línea de transferencia a 300 °C, la fuente de ionización a 250°C, y el flujo del gas portador helio es de 1 mL/min. La duración total del programa cromatográfico es de 12 minutos.

5.3 Derivatización de los analitos

Previo a la inyección de la muestra, se lleva a cabo la derivatización. Para ello, el eluato (se evaporó a sequedad con gas nitrógeno. Luego, se agregaron 50 μL de derivatizante N-Metil-Ntrimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA), 50 μL de piridina y se agitó en vortex 5 minutos. Posteriormente, la reacción de derivatización se realizó en la placa térmica a 70°C durante 30 minutos. Una vez completada la reacción, se espera que se enfríen los viales a temperatura ambiente y se lleva a medición al equipo GC-MS 100 μL de muestra, de los cuales se inyectan 2 μL .

5.4 Optimización de las variables químicas e hidrodinámicas:

Las variables que podrían afectar la extracción de los analitos en estudio son: fase sorbente, tiempo de extracción, velocidad de rotación del disco, tiempo de extracción, volumen de muestra y tiempo de desorción.

Cabe mencionar que cada optimización se trabajó a 10 ppb de cada analito. Como blanco para el estudio se utiliza orina de un pre púber (niño de 6 años), en donde las concentraciones de los analitos en estudio son mínimas o nulas [40].

5.4.1 Variables químicas

a) Fase sorbente.

Se evalúa la fase Oasis HLB y la fase Oasis MCX. Correspondiendo a un copolímero de divinilbenceno-N-vinilpirrolidona (Oasis HLB) y a una fase sorbente Oasis HLB pero modificada químicamente con grupos sulfónicos (Oasis MCX). A continuación, en la Figura 6 se muestran las estructuras de las fases estudiadas.

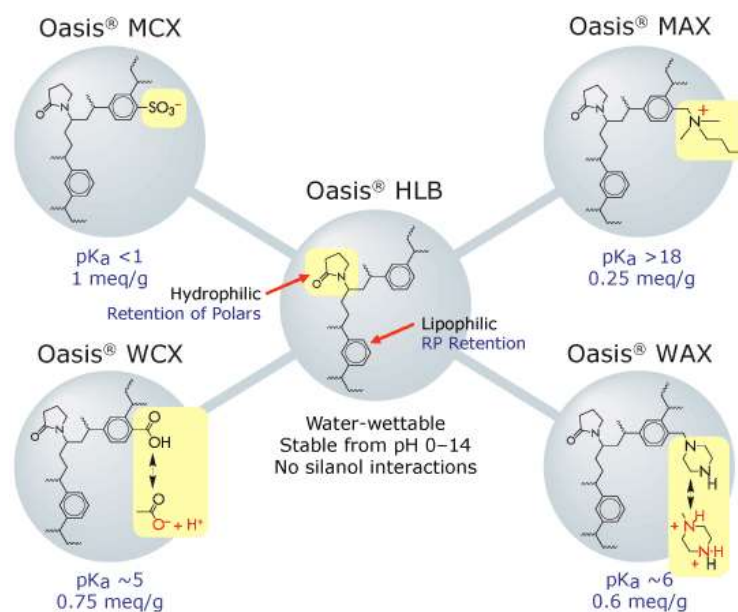


Figura 6. Estructura de distintas fases sorbentes.

b) Cantidad de fase Oasis MCX en disco:

Se evalúa la cantidad de fase sorbente cargada en el disco. Se utiliza 20,40,50, 60, 70 y 80 mg de fase sorbente por duplicado. Podría existir diferencia en la recuperación de analito debido a las diferentes áreas de sorbente.

c) Desorción.

La desorción se evalúa con 5 mezclas, las cuales pueden ser: 100%MeOH, 100%NH₃, 80% MeOH- 20% NH₃, 50%MeOH – 50% NH₃, 20% MeOH- 80% NH₃. Cada posible solución de desorción fue estudiada por duplicado.

5.4.2 Variables hidrodinámicas:

a) Tiempo de Extracción.

Se estudian 5 tiempos diferentes de extracción: 15, 30, 45, 60 y 120 minutos para 20 ml de solución ácida de 50% HCl 0.5M y 50% agua ultrapura.

Cabe mencionar que este parámetro se estudia en agua, para eliminar la interferencia de nuestra matriz. Se realiza el perfil para escoger el tiempo en que se extrae la mayor cantidad de cotinina y trans-3'-hidroxicotinina juntos.

b) Velocidad de Extracción.

Para establecer la dependencia de la agitación en el proceso de extracción, se realiza un perfil de velocidad de extracción del disco rotatorio comenzando por 250 rpm, seguido de 500, 1000, 1500 y 2000 rpm. Cada velocidad de agitación se estudia por duplicado por un tiempo de extracción de 60 minutos.

c)Tiempo de Desorción.

Una vez elegida la mejor solución para desorber los analitos, se estudia la variable hidrodinámica de tiempo de desorción en 10, 20 y 30 minutos por duplicado.

d) Volumen de muestra.

Se evalúa el volumen de muestra adecuado para extraer la mayor cantidad de analitos en estudio. Previo a la utilización de orina, se utiliza una solución ácida de 50% agua ultrapura y 50% de HCl, esta solución fue mantenida al comenzar a trabajar con orina, ya que el medio ácido favorece la extracción de los analitos en estudio.

El volumen de muestra se estudia con 18 ml de orina en 2 ml de solución ácida, 10 ml de orina en 10 ml de solución ácida, 5 ml de orina en 15 ml de solución ácida, 2 ml de orina en 18 ml de solución ácida y, por último, 1 ml de orina en 19 ml de solución ácida.

5.5 Clean up.

La orina es una matriz compleja y en ella encontramos un interferente de particular interés en nuestro estudio, este es la urobilina, el cual otorga el particular color amarillo a la orina y es importante descartar previo al análisis cromatográfico, ya que nos aseguramos de estar inyectando una muestra limpia de otros compuestos otorgando mayor vida útil al equipo.

El proceso de clean up fue estudiado de 2 formas, las cuales se mencionan a continuación:

- a) Se realiza una extracción de la urobilina con PSA (Primary Secondary Amine) de manera simultánea al proceso de extracción de los analitos de interés, para esto se utilizan 300 mg de PSA siguiendo el procedimiento descrito en este estudio [41].
- b) Se realiza un clean up posterior al proceso de extracción y antes del proceso de elución. Este clean up se llevó a cabo utilizando 10 ml una solución 1:9 de MeOH- H₂O y se agito por 20 minutos a 2000 rpm. Se evalúan distintas proporciones de solución de clean up, estudiando 0.5:95, 10:90, 30:70 y 50:50 de MeOH-H₂O respectivamente. Se utilizaron 10 ml de esta solución por 20 minutos a 2000 rpm.

5.6 Validación del método analítico.

5.6.1 Precisión.

Para evaluar la precisión a nivel de replicabilidad, se utiliza una muestra de orina de pre púber enriquecida con una concentración final de 250µg·L⁻¹ de cada analito, aplicando el método propuesto a 6 muestras de la misma orina utilizando diferentes discos rotatorios en las mismas condiciones. La precisión es expresada como la desviación estándar relativa (%RSD) de las mediciones.

5.6.2 Exactitud.

La exactitud del método fue determinada a partir de la recuperación, para esto se aplicó el método de extracción a 6 muestras de orina de un pre púber enriquecidas a una concentración final de $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de los analitos y $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de estándar surrogate.

5.6.3 Límites de detección del método.

Se obtiene mediante la relación entre el área analítica de la señal del analito en una matriz de orina de pre púber y el ruido de fondo. El valor obtenido de la concentración que correspondería al ruido de fondo fue luego multiplicado por 3 para obtener el valor del límite de detección.

5.6.4 Límites de cuantificación del método.

Se obtiene de la misma manera que el límite de detección, pero en este caso la concentración correspondiente al ruido fue multiplicado por el factor 10 para obtener el límite de cuantificación.

5.7 Curva de calibración.

La curva de calibración se realizó en matriz y fue obtenida a partir del área cromatográfica de las soluciones a diferentes niveles de concentración ($50 - 1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) de los analitos en estudio, además de una concentración conocida de estándar surrogate. Se grafica la concentración de cada analito en función del área, para luego mediante regresión lineal, obtener la ecuación de la recta.

5.8 Aplicación del método validado a muestras reales de orina para estimar los niveles de los metabolitos de la Nicotina estudiados.

El método desarrollado fue aplicado a 8 muestras de orina provenientes tanto de mujeres como hombres en un amplio intervalo de edad (4 a 84 años), incluyendo fumadores activos y fumadores pasivos.

Las muestras se obtuvieron de la primera orina de la mañana, ya que es la orina más concentrada en un volumen entre 100 – 300 ml. Éstas fueron almacenadas en el refrigerador, protegidas de la luz para así evitar alguna degradación de los analitos.

Para el análisis, el primer paso es la preparación de los discos, se proceden a lavar y secar para luego rellenarlos con la fase sorbente. Teniendo listos los discos viene la etapa de acondicionamiento de discos, esta consiste en poner cada disco en un vial con 10 ml de metanol y agitar por 5 minutos a 2000 rpm, terminado esto se procede a hacer el mismo lavado, pero esta vez con agua ultrapura. Ya con los discos acondicionados, se agrega en los viales para llevar a cabo la extracción: el disco, 18 ml de solución ácida y 2 ml de muestra de orina, luego esta solución se dopa con 50 µL de estándar surrogate a 250ppb.

5.9 Eco-escala analítica.

La eco-escala del método desarrollado se determinó siguiendo el análisis propuesto por Galuszka en 2012 [42] . Esta escala asume que una metodología verde ideal tiene un valor de 100, y para cada paso del procedimiento analítico, se asignan puntos de penalización.

Para cada parámetro del procedimiento analítico (cantidad de reactivo, peligro, energía y desechos) se asignan puntos de penalización según a cuanto se separa de un análisis verde ideal. Debido a que la influencia de las sustancias peligrosas depende de su cantidad, los puntos de penalización totales deben calcularse multiplicando el subtotal de puntos de penalización por el volumen de reactivo utilizado y el peligro. Para evaluar la peligrosidad de los reactivos se usó como base el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (GHS). Existen dos palabras de advertencia, “warning” y “danger” a los cuales se les asigna 1 y 2 punto de penalización respectivamente, además cada reactivo se puede caracterizar por uno o más de los nueve pictogramas, asignando un punto de penalización por cada uno de ellos.

La eco-escala se calcula de la siguiente manera:

$$\text{Eco-escala analítica} = 100 - \text{Total de puntos de penalización}$$

Los resultados se interpretan de acuerdo con las siguientes puntuaciones:

- > 75 excelente metodología verde.
- > 50 metodología verde aceptable.
- < 50 metodología verde inadecuada.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Optimización del método de derivatización

La derivatización de los analitos se lleva a cabo mediante la utilización de 50 μL de MSTFA y 50 μL de piridina a una temperatura de 70°C por 30 minutos. Con esto se logra la derivatización de los 2 metabolitos de la Nicotina. Los tiempos de retención y los fragmentos de las moléculas del espectro de masa obtenido de cada analito se muestran en la tabla II, los cuales fueron útiles para corroborar la presencia del analito en los análisis de optimización y muestra real.

Tabla II. Tiempos y masas correspondientes a los compuestos siliados.

Analitos	Tiempo de retención en matriz (min)	Ion de cuantificación m/z	Ion de identificación m/z
Cotina	8.3	98	176
Hidroxicotina	8.8	249	144
Estándar Surrogate	8.3	101	179

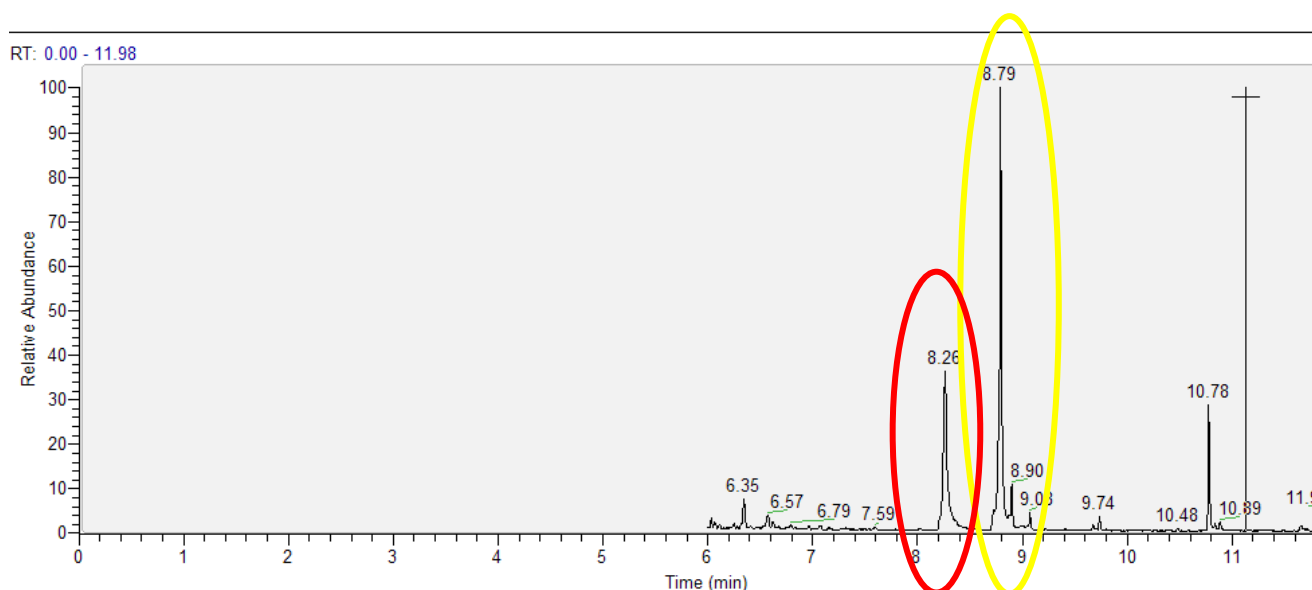


Figura 7. Cromatograma TIC de una solución estándar de los analitos derivatizados a una concentración de 1 $\mu\text{g/L}$.

6.2 Optimización de variables químicas e hidrodinámicas

6.2.1 Variables químicas

a) Fase sorbente

Para realizar esta prueba se utilizó la fase sorbente Oasis HLB y la fase sorbente Oasis MCX.

La primera fase sorbente en estudio corresponde a Oasis HLB, la cual es un polímero macroporoso obtenido a partir de los monómeros divinilbenceno (DVB) de carácter lipofílico y N-vinilpirrolidona (VP) de carácter hidrofílico, generándose un balance hidrofílico-lipofílico adecuado para la retención de compuestos orgánicos polares y no polares en muestras acuosas. Sin embargo, la universalidad de HLB también la ha convertido en una fase sorbente menos selectiva[43].

La segunda fase sorbente en estudio corresponde a Oasis MCX, la cual es una fase que está construida sobre un copolímero de HLB pero con presencia adicional de grupos sulfónicos, lo cual la convierte en un fuerte intercambiador de cationes, por lo cual podría superar las deficiencias que presenta HLB [44].

En la figura 8 se presentan las áreas relativas obtenidas utilizando las fases sorbente MCX y HLB al realizar un proceso de extracción para COT e HC en muestras acuosas.

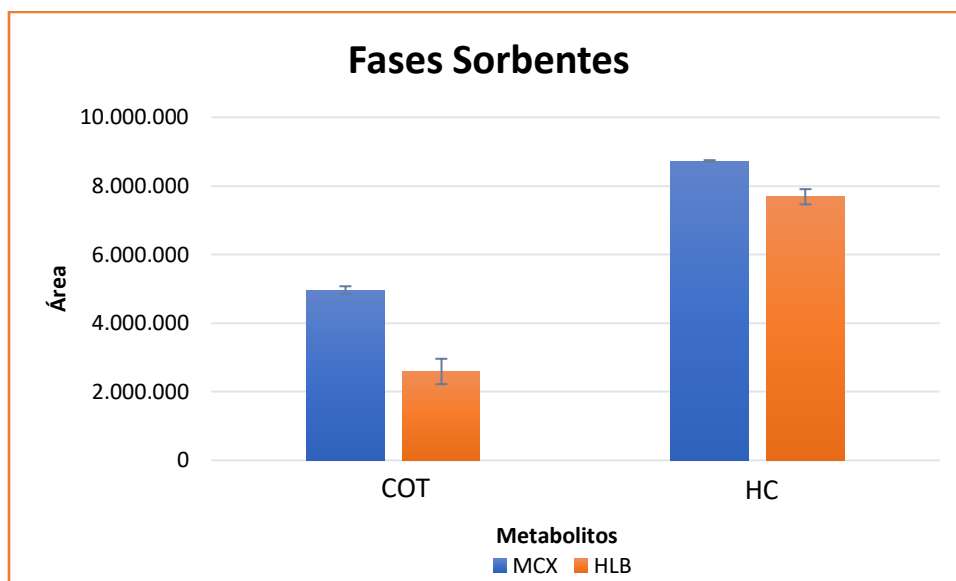


Figura 8. Área en función de la fase sorbente utilizada MCX y HLB, para la extracción de COT e HC.

Se observa que para el caso de la fase Oasis HLB se alcanzan los valores más bajos de áreas relativas, tanto para la COT con un valor de 2.589.941 unidades de área como para la HC alcanzando un valor de área relativa de 7.683.874 unidades de área.

Al ser MCX una fase sorbente de modo mixto, ya que combina las interacciones hidrofóbicas y de intercambio catiónico, es que se ve favorecida el área obtenida para COT, ya que las posibilidades de retención están aumentadas por sobre HLB que beneficia solo las interacciones hidrofóbicas. Para la HC, no se observa una diferencia de áreas relativa importante, dada su naturaleza polar, no es tanto más favorecida el área al utilizar MCX o HLB. En la tabla III se muestra un resumen de las áreas relativas obtenidas para ambos analitos con cada fase en estudio.

Tabla III. Áreas de los analitos COT e HC en diferentes fases sorbentes.

Analito	Fases sorbentes	
	HLB (área ± SD)	MCX (área ± SD)
COT	$(2,6 \pm 0,4) \cdot 10^6$	$(5,0 \pm 0,1) \cdot 10^6$
HC	$(7,7 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(8,73 \pm 0,03) \cdot 10^6$

De acuerdo con los resultados presentados, se confirma el uso de la fase Oasis MCX para el estudio de los analitos. Se comprueba que las interacciones de COT e HC con esta fase son mayores que con HLB, sobre todo en el caso de la COT, por lo tanto, la posibilidad de obtener mejores recuperaciones se ve incrementada.

b) Cantidad de fase MCX

Ya seleccionada la fase sorbente para llevar a cabo las extracciones, es importante evaluar la cantidad de fase que utilizaremos para concretar el estudio. Se trabaja con un disco con cavidad y como se mencionó anteriormente, este disco nos da la posibilidad de variar la cantidad de fase a utilizar y ver si esto favorece o no más aun nuestras extracciones. En la figura 9 y 10 se pueden observar los resultados obtenidos para cada analito en estudio.

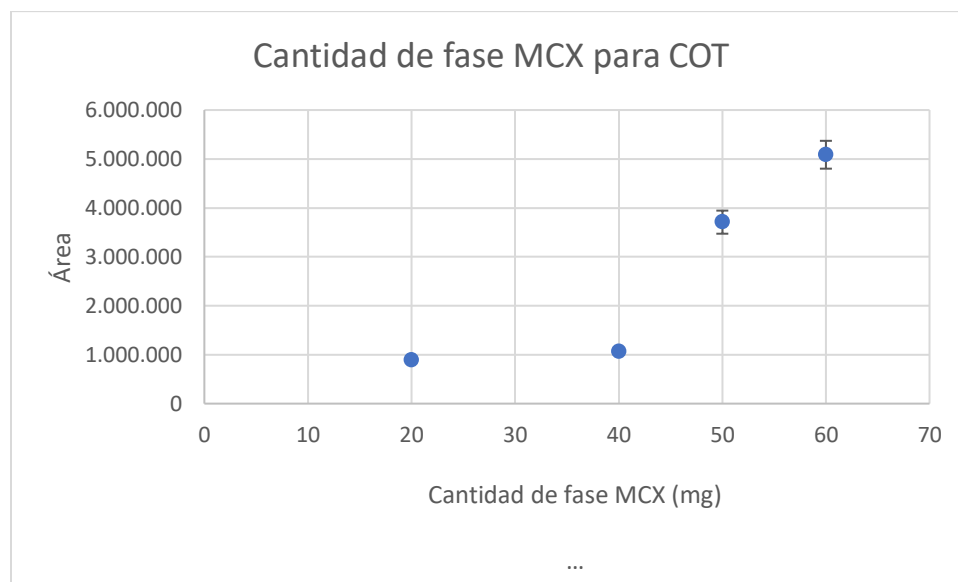


Figura 9. Área en función de cantidad de fase MCX (mg) para la extracción de COT.

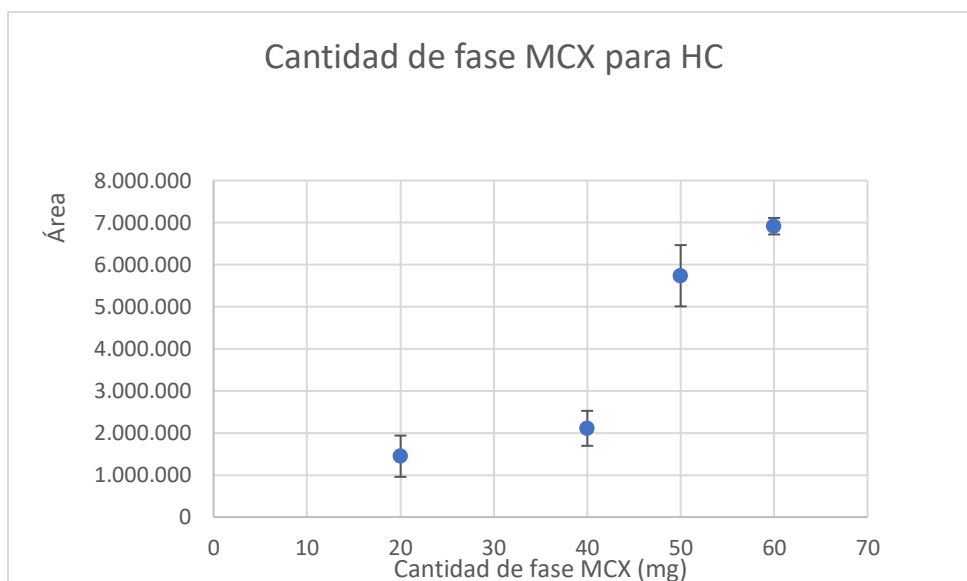


Figura 10. Área en función de cantidad de fase MCX (mg) para la extracción de HC.

Se puede observar en las figuras 8 y 9, que las áreas aumentan conforme aumenta la cantidad de fase introducida en el disco rotatorio, alcanzando la mayor área para ambos analitos al tener 60 mg en el disco. Se observa un aumento casi lineal a partir de los 40 mg de fase sorbente, por lo que sería interesante evaluar que pasa al inmovilizar más fase sorbente en el disco. En la tabla IV se resumen las áreas relativas obtenidas para ambos analitos.

Tabla IV. Áreas de los analitos COT e HC variando la cantidad de fase sorbente.

Analitos		
Cantidad de fase sorbente (mg)	COT (área ± SD)	HC (área ± SD)
20	$(8,9 \pm 0,02) \cdot 10^5$	$(1,5 \pm 0,5) \cdot 10^6$
40	$(1,06 \pm 0,04) \cdot 10^6$	$(2,1 \pm 0,4) \cdot 10^6$
50	$(3,7 \pm 0,2) \cdot 10^6$	$(5,7 \pm 0,7) \cdot 10^6$
60	$(5,1 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(6,9 \pm 0,2) \cdot 10^6$

c) Segunda prueba de cantidad de fase MCX

Dado que la prueba anterior no fue determinante al no encontrar una cantidad de fase que demuestre saturación, se volvió a hacer una prueba de cantidad de fase a inmovilizar en el disco rotatorio, pero esta vez se amplió el rango de trabajo. Los resultados se muestran a continuación.

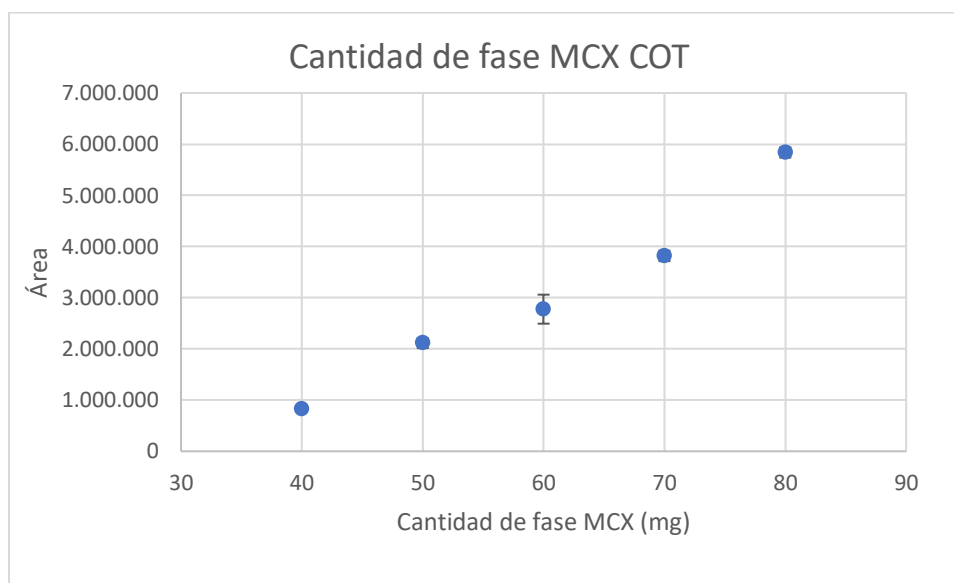


Figura 11. Área en función de cantidad de fase MCX (mg) para la extracción de COT.

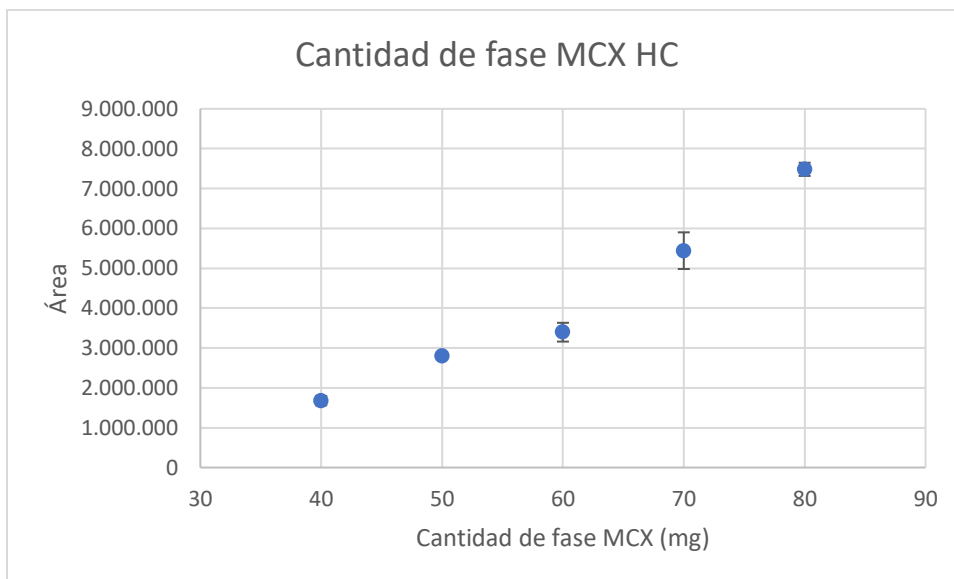


Figura 12. Área en función de cantidad de fase MCX (mg) para la extracción de HC.

Como se observa en la figura 11 y 12, las áreas para ambos analitos en estudio siguieron con el comportamiento antes descrito. Conforme aumentamos la cantidad de fase MCX inmovilizada en el disco rotatorio, obtenemos mejores áreas para nuestros analitos, dado que mientras más fase logramos inmovilizar en la cavidad del disco, la recuperación aumenta concomitantemente, ya que aumentos los sitios de intercambio catiónico. La limitante en este caso estará dada por factores físicos. El disco rotatorio permite como máximo colocar 80 mg de fase en la cavidad, considerando la ubicación del filtro y el anillo del disco para poder sellarlo de forma correcta.

En la tabla V se muestra un resumen de las áreas obtenidas y, según los resultados mostrados, se decidió trabajar con 60 mg de fase Oasis MCX para los siguientes estudios, ya que igual se obtienen buenas áreas y no llegamos a la saturación del disco rotatorio.

Tabla V. Áreas de los analitos COT e HC variando la cantidad de fase sorbente MCX.

Analitos		
Cantidad de fase sorbente (mg)	COT(área ± SD)	HC(área ± SD)
40	$(8,3 \pm 0,02) * 10^5$	$(1,7 \pm 0,1) * 10^6$
50	$(2,11 \pm 0,09) * 10^6$	$(2,80 \pm 0,04) * 10^6$
60	$(2,8 \pm 0,3) * 10^6$	$(3,4 \pm 0,2) * 10^6$
70	$(3,8 \pm 0,1) * 10^6$	$(5,4 \pm 0,4) * 10^6$
80	$(5,84 \pm 0,1) * 10^6$	$(7,5 \pm 0,1) * 10^6$

d) Desorción

Una vez retenidos los analitos en la fase sorbente, es necesario desorber con el mejor solvente a fin, en lo posible con el menor volumen posible, de manera rápida y cuantitativa. A continuación, en la figura 13 y 14 se muestran los resultados del estudio realizado para escoger la mejor solución de desorción tanto para la COT como para la HC, respectivamente.

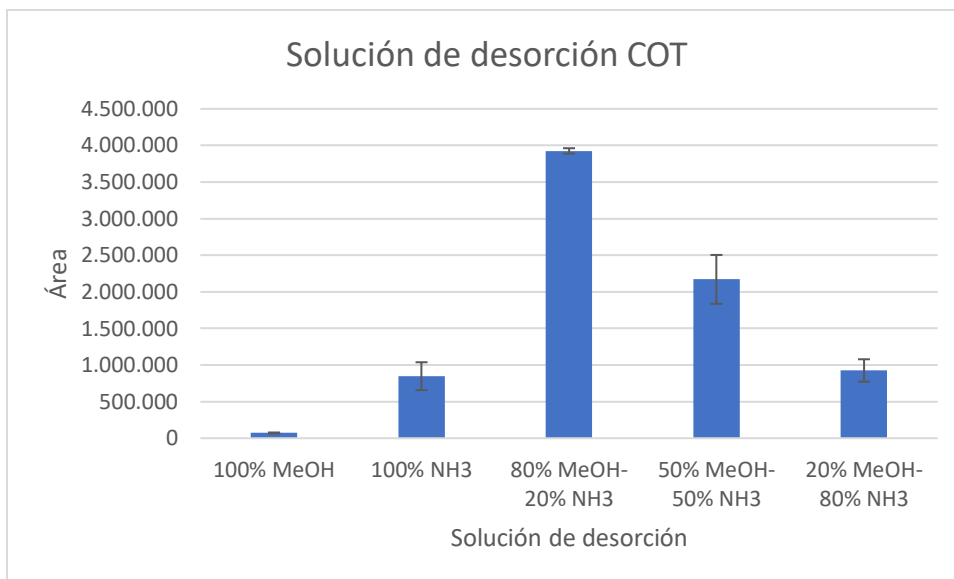


Figura 13. Área en función de la solución de desorción para la extracción de COT.

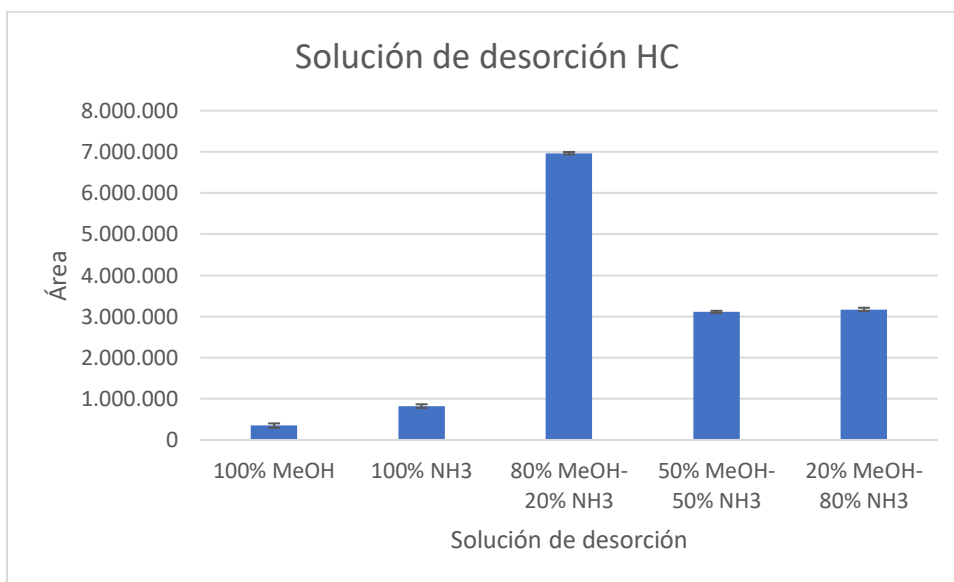


Figura 14. Área en función de la solución de desorción para la extracción de HC.

En la figura 13 y 14 se observa una muy buena área para ambos analitos en estudio al utilizar como solvente de desorción una mezcla 80:20 de MeOH-NH₃ por sobre las otras soluciones (ojo que 100% MeOH no es mezcla y tampoco 100%NH₃) estudiadas.

Tanto la COT como la HC son solubles en metanol, solvente conocido por su alto poder de elución, ya que en un periodo corto de tiempo logra vencer las fuerzas intermoleculares que mantienen unido al analito con la fase por su característica de ser un disolvente polar prótico, el cual posee la habilidad de formar puentes de hidrogeno con los compuestos a desorber [45], por lo tanto al desorberlos en metanol, si o si vamos a estar sacando una gran parte de analitos retenidos en la fase sorbente, pero esta vez mas que el metanol quien hace la diferencia es el amonio, quien otorga un medio básico a la solución de elución pudiendo así eluir nuestros analitos que están cargados positivamente gracias a la solución ácida en la que fueron extraídos y retenidos mediante un intercambio catiónico con nuestra fase sorbente.

Por lo tanto, la solución de desorción escogida para seguir con nuestro estudio fue 80:20 de MeOH-NH₃. A continuación, en la tabla número VI se muestra un resumen de las áreas obtenidas.

Tabla VI. Áreas de los analitos COT e HC variando la solución de Desorción.

Analitos		
Solución de Desorción	COT(área ± SD)	HC(área ± SD)
MeOH	(7,2 ± 0,007) *10 ⁴	(3,5±0,05) *10 ⁵
NH ₃	(8,0 ± 0,1) *10 ⁵	(8,2 ± 0,04) *10 ⁵
80:20 (MeOH-NH ₃)	(3,92 ± 0,04) *10 ⁶	(6,9 ± 0,03) *10 ⁶
50:50 (MeOH-NH ₃)	(2,2 ± 0,3) *10 ⁶	(3,11 ± 0,03) *10 ⁶
20:80 (MeOH-NH ₃)	(9,0 ± 0,1) *10 ⁵	(3,17 ± 0,04) *10 ⁶

6.2.2 Variables Hidrodinámicas

a) Tiempo de extracción

El perfil de extracción se realizó en un intervalo de tiempo de 15 a 120 minutos, en muestras acuosas acidificadas dopadas con los analitos en estudio.

Como se puede observar en las Figuras 15 y 16, se alcanzan las mayores áreas para ambos analitos en 60 minutos de extracción, para luego decrecer sus áreas hasta los 120 minutos. El fenómeno que ocurre en este caso es una desorción de los analitos, al otorgar mayor tiempo de extracción, se favorece mayor tiempo para que se genere la unión analito con la fase sorbente, una vez ocurrida esta unión y continuando con el proceso de extracción generamos que los analitos se desorban y por consecuencia que disminuyan las recuperaciones. Es por esto que hay que encontrar el equilibrio justo de mayor recuperación sin desorber nuestros analitos.

Por lo tanto, Se fija como tiempo total de extracción 60 minutos, ya que en este tiempo se logra que la mayoría de los analitos en estudio lleguen y completen todos los sitios de unión disponibles en la fase sorbente sin alcanzar la desorción de estos mismos. Se muestra un resumen de las áreas obtenidas en la tabla número VII.

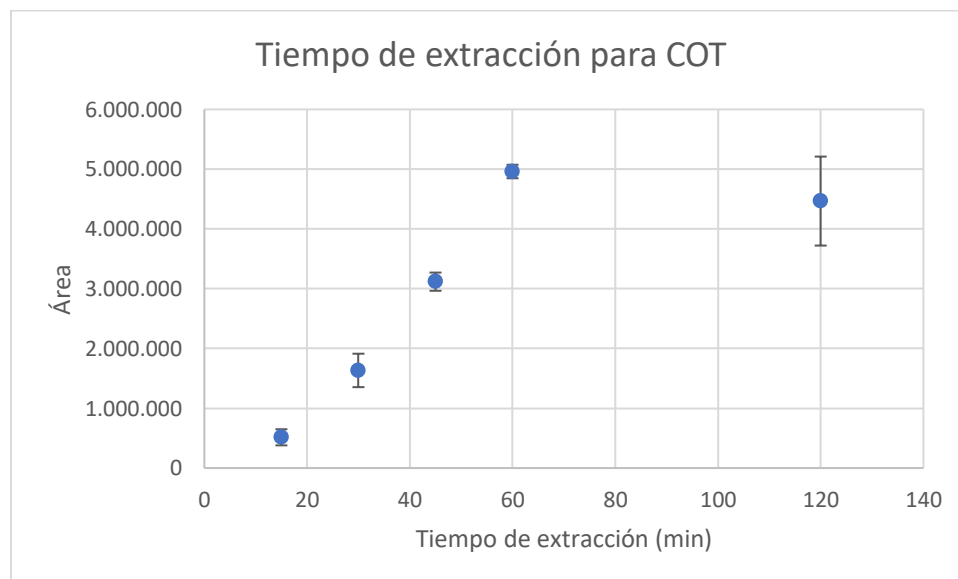


Figura 15. Área en función del tiempo de extracción (min) para COT.

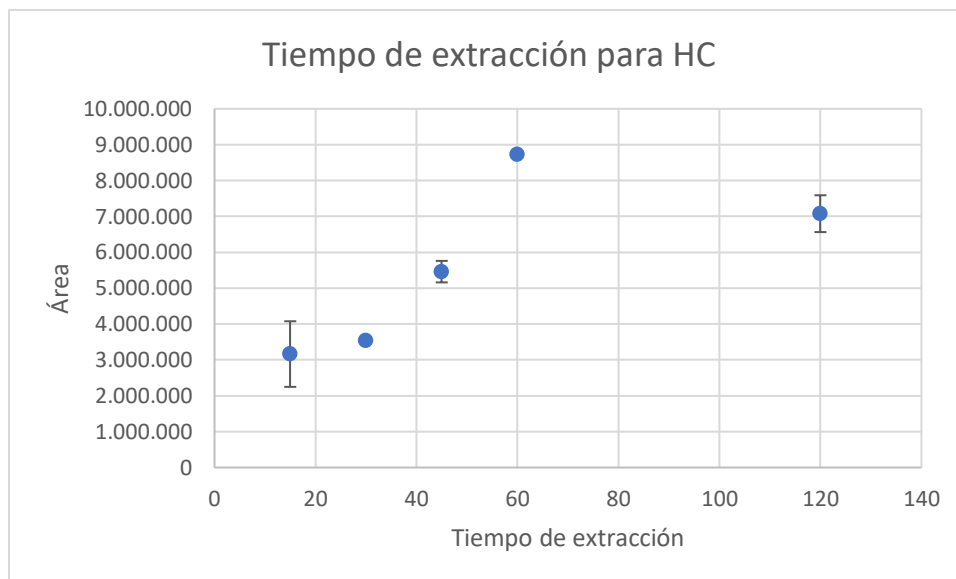


Figura 16. Área en función del tiempo de extracción (min) para HC.

Tabla VII. Áreas de los analitos COT e HC variando el tiempo de extracción.

Analitos		
Tiempo de Extracción (min)	COT(área ± SD)	HC(área ± SD)
15	$(5 \pm (,1) * 10^5)$	$(3,2 \pm 0,9) * 10^6$
30	$(1,6 \pm 0,2) * 10^6$	$(3,55 \pm 0,09) * 10^6$
45	$(3,1 \pm 0,1) * 10^6$	$(5,5 \pm 0,3) * 10^6$
60	$(5,0 \pm 0,1) * 10^6$	$(8,73 \pm 0,02) * 10^6$
120	$(4,5 \pm 0,7) * 10^6$	$(7,1 \pm 0,5) * 10^6$

b) Velocidad de agitación

La velocidad de extracción de nuestro disco rotatorio es una variable muy importante en nuestro estudio, ya que, sin agitación, el proceso solo dependerá de la difusión del analito en la solución de extracción y esto puede tomar mucho tiempo.

A mayor velocidad de agitación, más rápido es alcanzado el equilibrio de partición, dado que estamos aumentando la velocidad de transferencia del analito hacia la fase sorbente. Se estudiaron velocidades de agitación en un rango de 250 a 2000 revoluciones por minuto (rpm). Los resultados obtenidos se presentan en la figura 17 y 18.

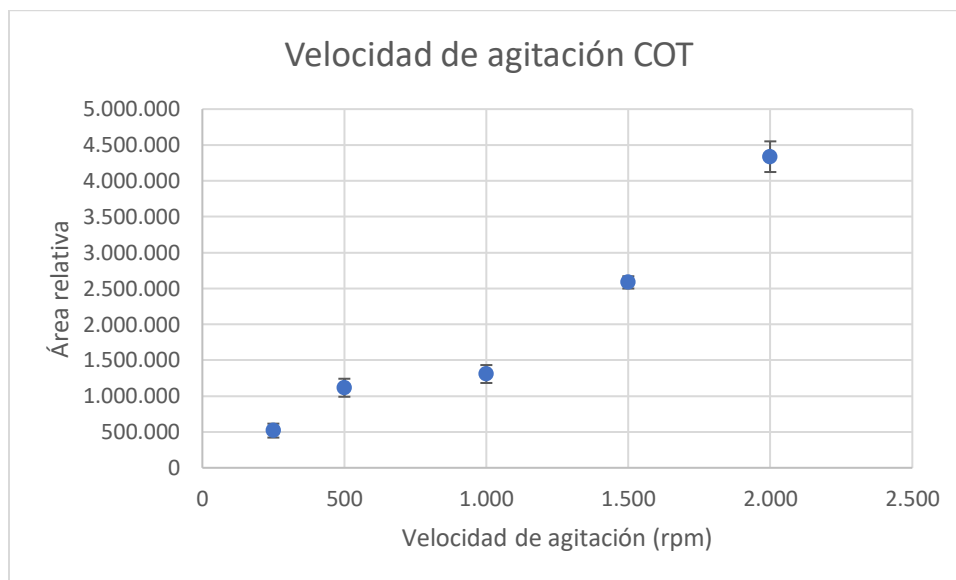


Figura 17. Área en función de la velocidad de agitación (rpm) para la extracción de COT.

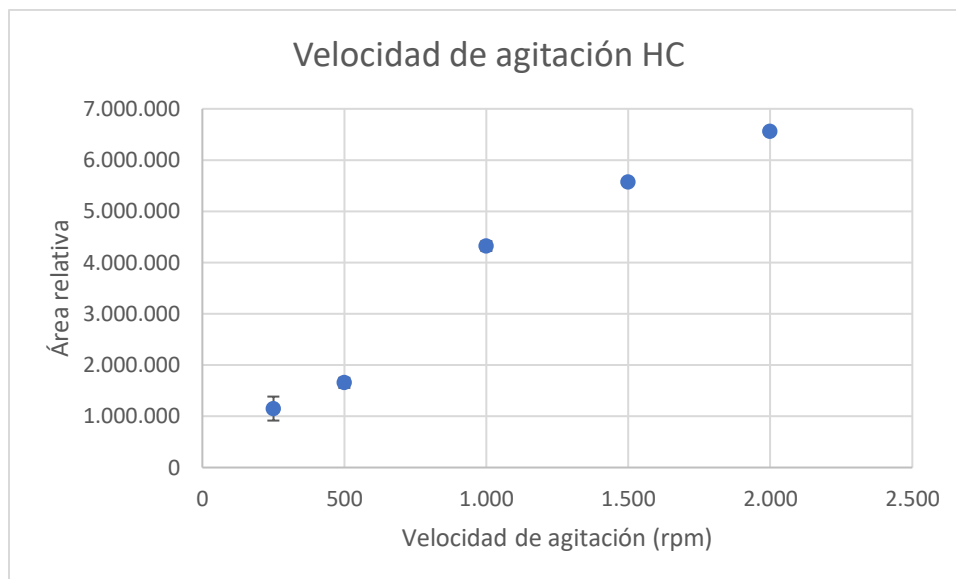


Figura 18. Área en función de la velocidad de agitación (rpm) para la extracción de HC.

Se observa de la figura 17 y 18 que para ambos analitos se alcanza una mejor área conforme aumentamos la velocidad de agitación, siendo así la velocidad óptima de agitación a 2000 rpm y la escogida en la optimización del método. A esta velocidad, se logra un flujo de agitación más turbulento, por lo que la movilidad de los analitos en solución esta aumentada y a su vez disminuimos el espesor de la capa estacionaria, por consecuencia entonces se aumenta la extracción y la recuperación de los analitos de interés En la tabla número VIII se muestra un resumen de las áreas obtenidas.

Tabla VIII. Áreas de los analitos COT e HC variando la velocidad de extracción.

Analitos		
Velocidad de Extracción (rpm)	COT(área ± SD)	HC(área ± SD)
250	$(5,2 \pm 0,1) * 10^5$	$(1,1 \pm 0,2) * 10^6$
500	$(1,1 \pm 0,1) * 10^6$	$(1,65 \pm 0,09) * 10^6$
1000	$(1,3 \pm 0,2) * 10^6$	$(4,32 \pm 0,09) * 10^6$
1500	$(2,58 \pm 0,08) * 10^6$	$(5,57 \pm 0,3) * 10^6$
2000	$(4,3 \pm 0,9) * 10^6$	$(6,5 \pm 0,04) * 10^6$

c) Tiempo de desorción

En la presente etapa, se necesita conocer en cuánto tiempo vamos a desorber los analitos. Es primordial considerar una metodología de trabajo verde, rápida y cuantitativa.

Se evaluaron 3 tiempos de desorción. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 19 y 20.

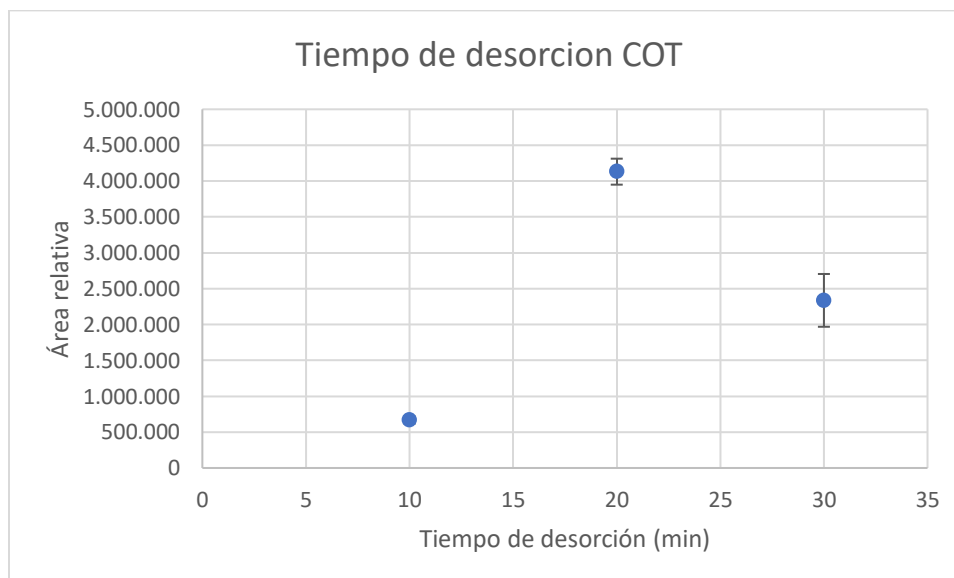


Figura 19. Área en función del tiempo de desorción (min) para la extracción de COT.

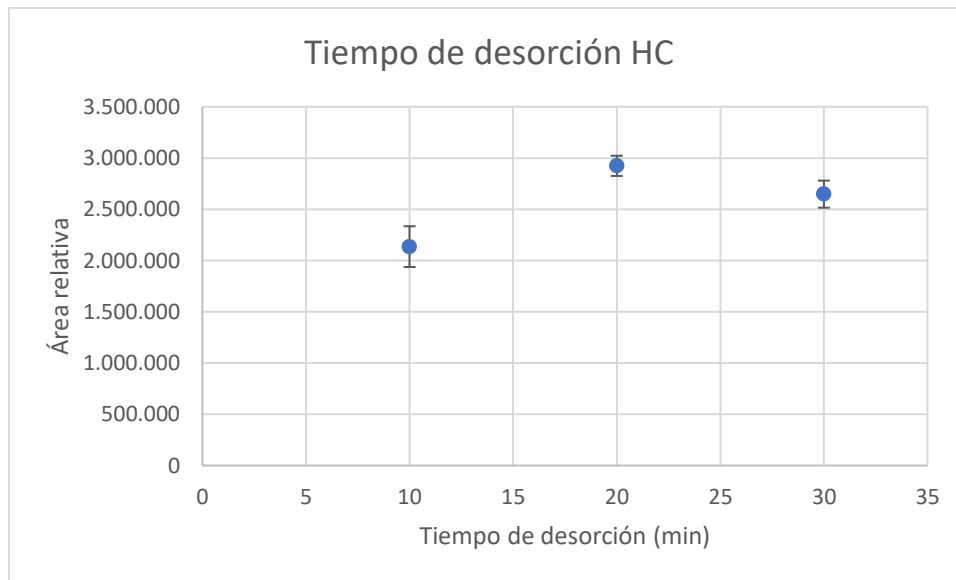


Figura 20. Área en función del tiempo de desorción (min) para la extracción de HC.

Se observa en ambas figuras 19 y 20, que se obtienen mayores áreas para los analitos de interés en un tiempo de 20 minutos, acá se logra el peak, es decir, encontramos el equilibrio de eluir lo más posible sin volver a retener los analitos por parte de la fase sorbente que es lo que ocurre al aumentar el tiempo de elución a 30 minutos, por ejemplo.

Se define entonces como tiempo óptimo de desorción 20 minutos. Se muestra en resumen de las áreas obtenidas variando el tiempo de desorción en la tabla IX.

Tabla IX. Áreas de los analitos COT e HC variando el tiempo de desorción.

Analitos		
Tiempo de desorción (min)	COT(área ± SD)	HC(área ± SD)
10	$(6,7 \pm 0,05) \cdot 10^5$	$(1,8 \pm 0,7) \cdot 10^6$
20	$(3,6 \pm 0,5) \cdot 10^6$	$(2,92 \pm 0,09) \cdot 10^6$
30	$(2,3 \pm 0,3) \cdot 10^6$	$(2,2 \pm 0,7) \cdot 10^6$

d) Volumen de muestra

Se evalúa como influye nuestra matriz en los resultados obtenidos en nuestro estudio. Los volúmenes de muestra estudiados fueron 1, 2, 5, 10 y 18 ml de orina. Las figuras 21 y 22 siguientes se presentan los resultados obtenidos:

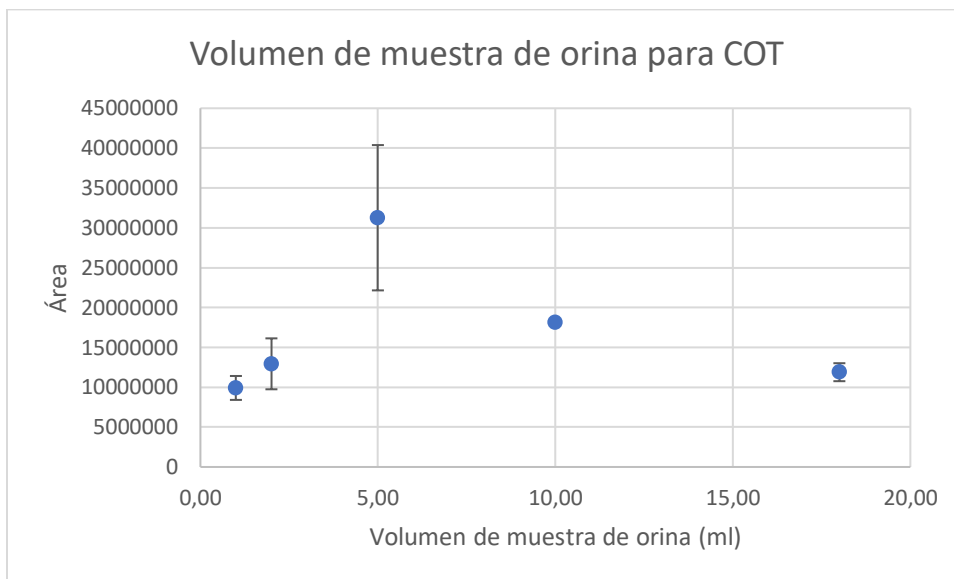


Figura 21. Área en función del volumen de muestra de orina (ml) para la extracción de COT.

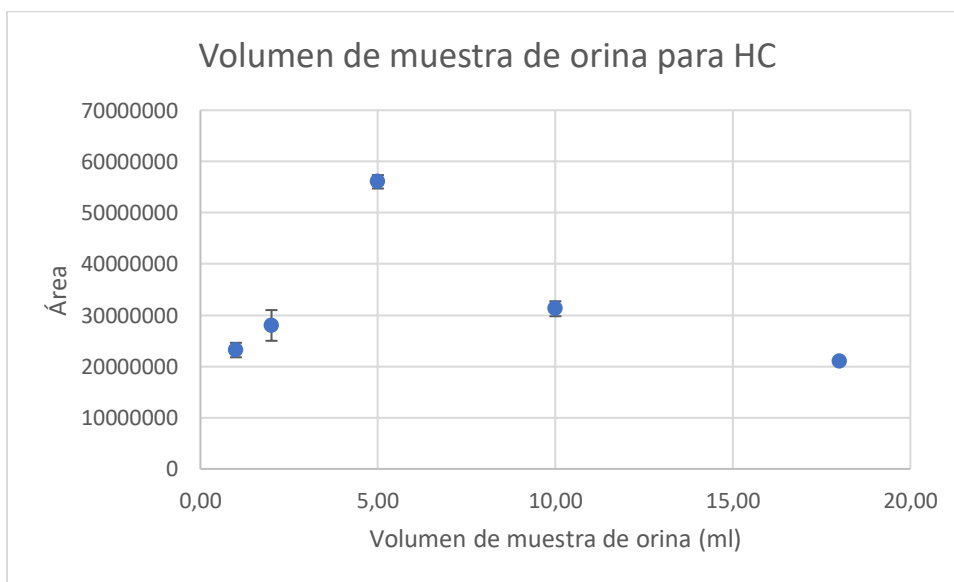


Figura 22. Área en función del volumen de muestra de orina (ml) para la extracción de HC.

Como se puede observar en las figuras 21 y 22, a medida que aumenta el volumen de muestra van aumentando las áreas obtenidas, hasta utilizar 5 ml de muestra de orina, utilizando mayores volúmenes de muestra de orina (10-18 ml), se observa una disminución en las áreas, es decir, el efecto de nuestra matriz se hace presente afectando considerablemente en las áreas obtenidas y por consecuencia, a las recuperaciones.

De acuerdo con los resultados presentados, 5 ml de muestra de orina debería ser nuestra elección, pero pese a que es la mejor área obtenida, el concentrado a inyectar en el equipo GC-MS presenta una coloración amarilla por lo que esto puede ser perjudicial por el equipo. Es por esta razón, que se decidió trabajar con 2 ml de muestra de orina. Se obtendrán recuperaciones más bajas, pero estaremos dando más vida útil al instrumento GC-MS.

En la tabla X se presentan las áreas obtenidas.

Tabla X. Áreas de los analitos COT e HC variando la cantidad de muestra de orina.

Analitos		
Volumen de orina (mL)	COT(área ± SD)	HC(área ± SD)
1	(10,0 ± 1) *10 ⁶	(23,0 ± 1) *10 ⁶
2	(13,0 ± 3) *10 ⁶	(28,0 ± 3) *10 ⁶
5	(31,0 ± 9) *10 ⁶	(56,0 ± 1) *10 ⁶
10	(18,1 ± 0,2) *10 ⁶	(31,0 ± 1) *10 ⁶
18	(12,0 ± 1) *10 ⁶	(21,0 ± 0,4) *10 ⁶

6.3 Clean up

A continuación, se detallan los resultados obtenidos de las 3 estrategias revisadas en la bibliografía para eliminar la interferente urobilina (pigmento amarillo) de las muestras, obteniendo los mejores resultados con el proceso de clean up previo al proceso de desorción y posterior al proceso de extracción.

De los resultados obtenidos se observan muy buenas áreas para la razón 5:95 de metanol- agua, pero lamentablemente estos resultados no corresponden a nuestros analitos de estudio, por lo nombrado en el inciso 5.1 donde mencionamos que para obtener información fidedigna sobre nuestros analitos en estudio debemos corroborar siempre el tiempo de retención y la razón de áreas de ambos iones (área cuantificador/área cualificador), la cual debe corresponder al mismo valor que se ha determinado en la medición de un estándar (+- 20%). Si ambos parámetros se cumplían, podemos confirmar la presencia de nuestro analito en la muestra.

Para la solución de clean up 5:95 de metanol-agua la razón de área de los analitos no corresponde a la del estándar, al igual que la relación 10:90, por lo que se concluye que a menor porcentaje de metanol se ve interferida la recuperación de nuestros analitos, hay muchos interferentes. Se seleccionó como solución de clean up la proporción 30:70 de metanol-agua, ya que, pese a obtener áreas menores, la razón de áreas de ambos iones si correspondía, además del tiempo de retención y en esta razón de solventes estamos eliminando en mayor parte la urobilina.

6.4 Validación del método analítico.

En la tabla XI, se observan los límites de detección, cuantificación, la precisión y la exactitud del método.

Los valores de exactitud del método fueron obtenidos a través de sus recuperaciones, usando un disco diferente para cada muestra (n=6), siendo de 56% para HC y de 86% para COT. Se determinó también la precisión mediante el uso de 6 discos (al mismo tiempo) para la extracción a una concentración de $250 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (n = 6). La RSD intradisco en estas condiciones fue de 1 y 2% para COT e HC respectivamente.

Tabla XI. Parámetros analíticos del método.

Metabolito	Linealidad (r)	Exactitud (%)	Precisión (% RSD)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
Cotina	0,9827	86	1	21	29
Hidroxicotina	0,9923	56	2	0.7	0.9

6.5 Curva de Calibración.

A continuación, se muestran las curvas de calibración obtenidas para ambos analitos en estudio. Esta fue determinada a partir de una razón del área obtenida para cada analito con el área del surrogate incorporado versus la concentración de cada analito.

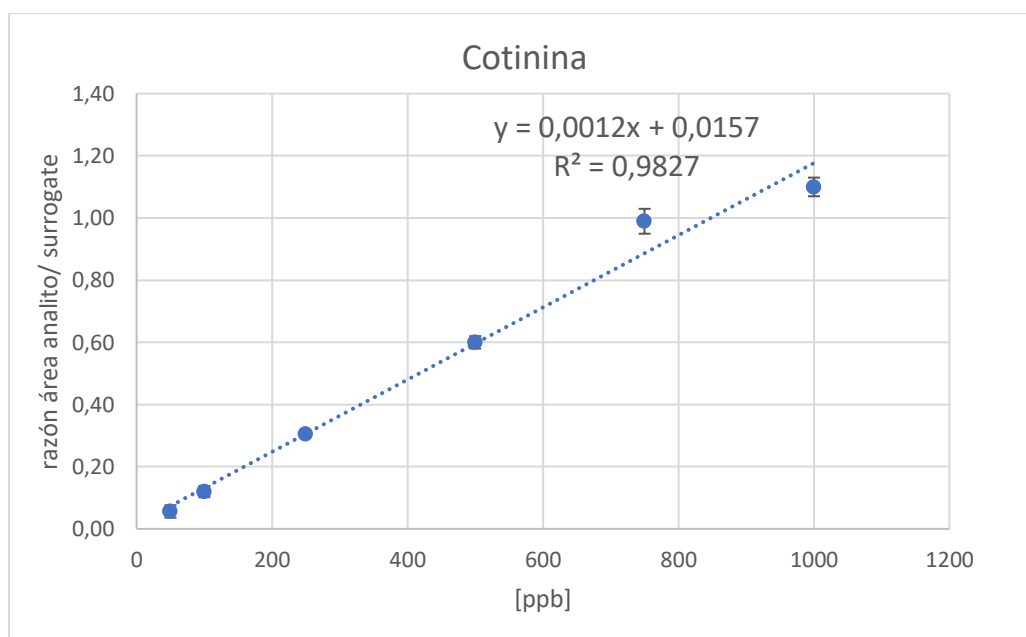


Figura 23. Curva de calibración para COT.

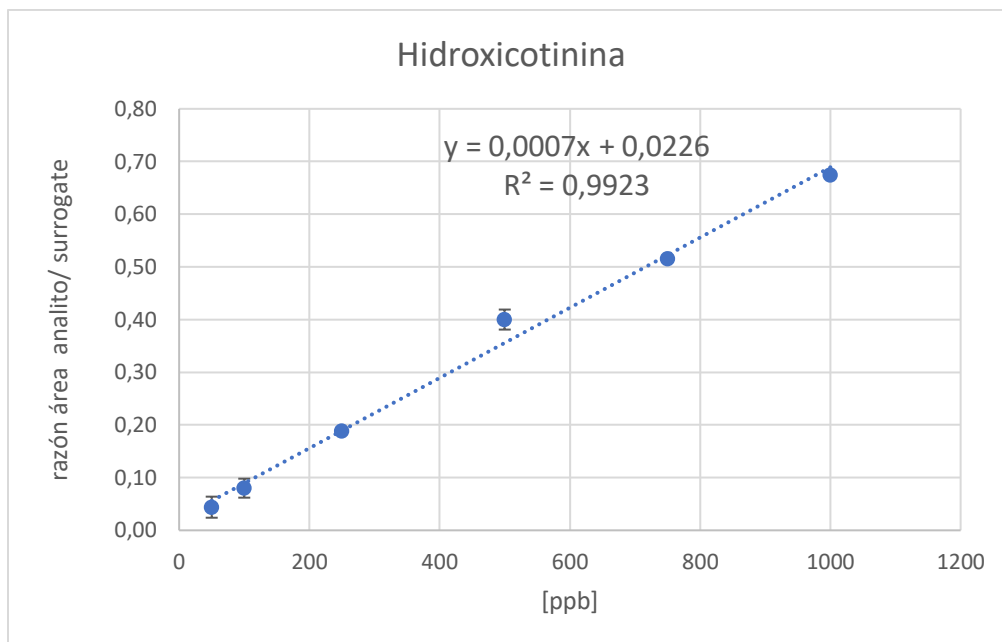


Figura 24. Curva de calibración para HC.

RT: 8.07 - 10.06

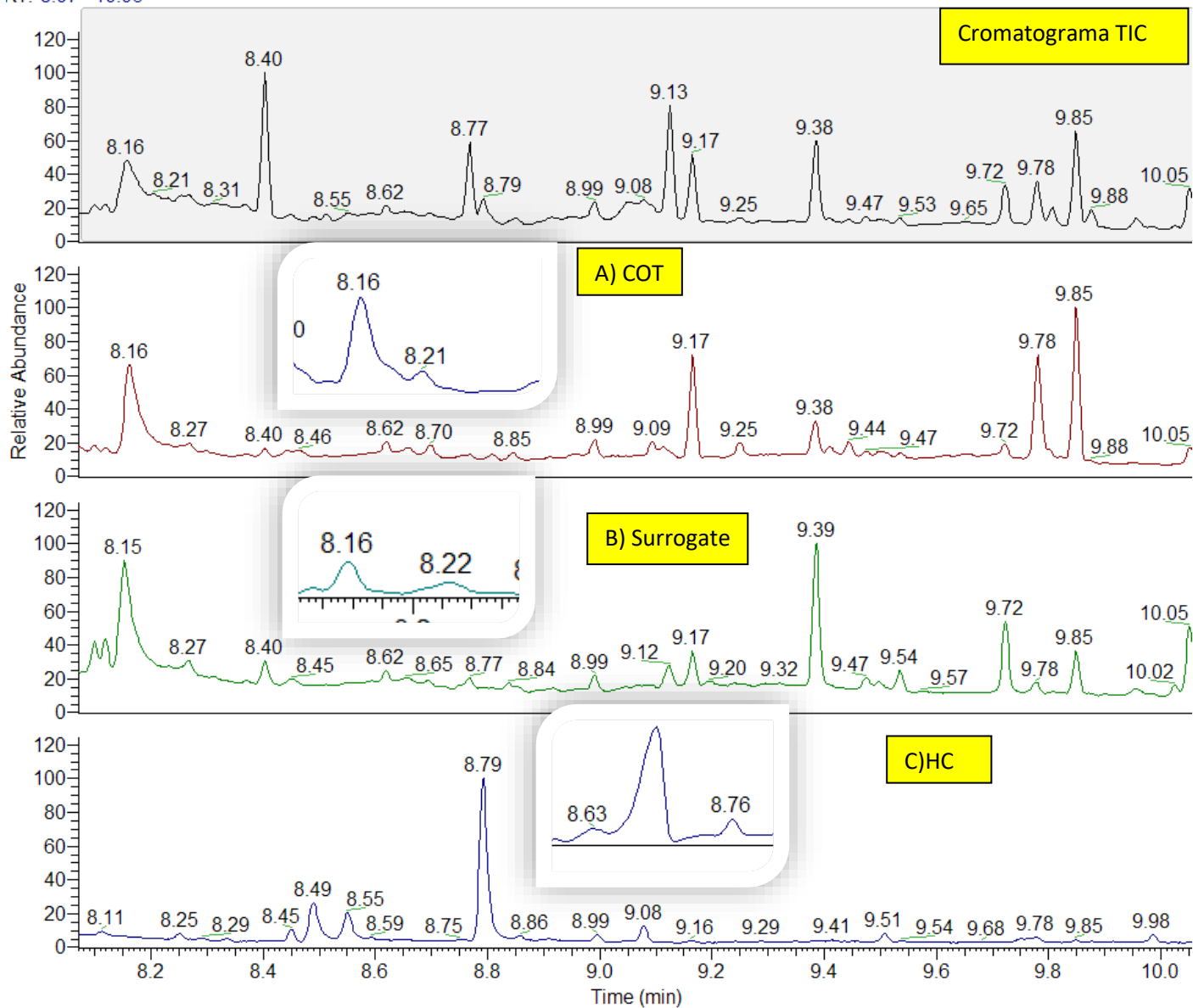


Figura 25. Cromatograma de los analitos y surrogate a una concentración de 250 ppb. Correspondiendo: A) COT con m/z de 98 y m/z de 176 en el inserto, B) Surrogate con m/z de 101 y m/z de 179 en el inserto y C) HC con m/z de 249 y m/z de 144 en el inserto.

6.6 Muestras Reales

Una vez optimizada y validada la metodología analítica, es necesario demostrar si con ella es posible encontrar uno de nuestros dos analitos en muestras de orina. Las muestras fueron sometidas al procedimiento de extracción, clean up, desorción, evaporación y derivatización usando las condiciones óptimas mostradas en la tabla número XII.

Tabla XII. Condiciones óptimas de la metodología.

Condiciones	
Fase	Oasis MCX
Cantidad de fase MCX en disco	70 mg
Volumen de acondicionamiento	10 ml de Metanol y luego 10 ml de Agua ultrapura
Volumen solución para extraer analitos	18 ml de solución 50:50 de HCl 0.5M y Agua ultrapura.
Volumen de muestra	2 ml
Tiempo de extracción	60 minutos
Velocidad de rotación	2000 rpm
Clean up post extracción	10 ml de solución 30:70 de Metanol y agua ultrapura.
Desorción	10 ml de solución 20:80 de Amoniaco y Metanol.

Las muestras fueron sometidas al proceso de extracción descrito, al igual que al proceso de derivatización para la posterior medición por GC-MS. Las concentraciones de los metabolitos de la Nicotina encontradas en las diferentes muestras se pueden observar en la tabla XIII.

XIII. Resultados muestras reales.

Muestra	Tipo de fumador	Cd [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	COT($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	HC($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
(A)	NI	7.5	431 \pm 24	734 \pm 17
(B)	NI	8.8	1108 \pm 17*	885 \pm 23
(C)	NI	2.3	796 \pm 30	996 \pm 24
(D)	NI	4.6	471 \pm 2	792 \pm 9
59años-masculino	Activo	NI	636 \pm 21	1043 \pm 34*
4años-femenino	Pasivo	NI	113 \pm 12	475 \pm 8
84años-femenino	Activo	NI	582 \pm 14	1119 \pm 23*
27años-femenino	Pasivo	NI	130 \pm 11	499 \pm 24
Orina sintética	NI	NI	< LD	< LD

(): Muestras interlaboratorio con diferentes concentraciones de Cadmio que muestran exposición a humo de tabaco.

NI: No Informada.

*: Muestras con extrapolación en curva.

< LD : menos al límite de detección.

De los datos obtenidos, fue posible detectar la presencia de ambos analitos en el total de las muestras analizadas, esto nos muestra que los metabolitos de la Nicotina como lo son la Cotinina y la trans-3'-Hidroxicotinina los podemos encontrar en fumadores activos y pasivos en diferentes concentraciones, pero su presencia es independiente del género, edad, estado de salud, dieta, entre otros.

Las muestras (B), (C), de la persona de 59 años y 84 años presentan las concentraciones más altas de COT e HC por sobre las otras muestras, correspondiendo 2 de estas muestras a las obtenidas de fumadores activos de tabaco y las otras 2 a las personas con mayor concentración de Cd en su cuerpo y por lo tanto los más propensos a estar muy expuestos al humo de tabaco.

Al tener una persona la costumbre de fumar, esperamos altas concentraciones de COT y por consecuencia una mayor concentración también de HC, ya que el cuerpo metaboliza una en otra y esta última se mantiene por mayor tiempo en nuestro cuerpo.

Destacamos la muestra (B) y (C), que son las que presentan mayor concentración de los analitos de las 4 muestras más altas, y justamente se encuentran marcadas porque son muestras de interlaboratorio que fueron facilitadas por el Instituto de Salud Pública, y pertenecen a un seguimiento de personas con posible contaminación por Cadmio y es conocido que para ciertas concentraciones de este metal pesado podemos hablar de ciertos niveles de exposición de las personas al humo del tabaco, es decir, fueron muestras medidas específicamente para probar la efectividad de la metodología implementada. Las personas con Cd urinario $>4 \mu\text{g/L}$ estarían mayormente expuestos al humo del tabaco, lo que se ve representado en los resultados obtenidos. [46]

Se nota en las muestras (A), (D), de la persona de 4 y 27 años una notable disminución de las concentraciones encontradas de COT e HC. (A) y (D) se ubican en un rango intermedio, por lo que tenemos dos opciones; la primera es estar ante un fumador activo, pero no con el hábito de “fumar” tan desarrollado; y la segunda opción es estar ante la presencia de un fumador pasivo, pero con gran exposición al humo del tabaco.

Las muestras F y H son las que recopilan las concentraciones más bajas de ambos analitos en estudio, sin duda estamos ante la presencia de dos fumadores pasivos, aun así, es preocupante la concentración de HC que se percibe en el cuerpo, destacando la muestra F, la cual corresponde a un niño de 4 años, quien pese a su corta edad alcanza un poco menos de la mitad de concentración de HC encontrada por ejemplo en la muestra G, pero esta última corresponde a una persona de 84 años.

Es importante destacar que la concentración urinaria de los analitos puede variar durante el transcurso del día, por lo que para un estudio más contundente se podría evaluar el uso de metodologías que compensen estas fluctuaciones de concentración como lo son la normalización por medio de la creatinina y la recolección de muestra por 24 horas que es ampliamente utilizado en las investigaciones clínicas y el diagnóstico o detección de algunas enfermedades.[47]

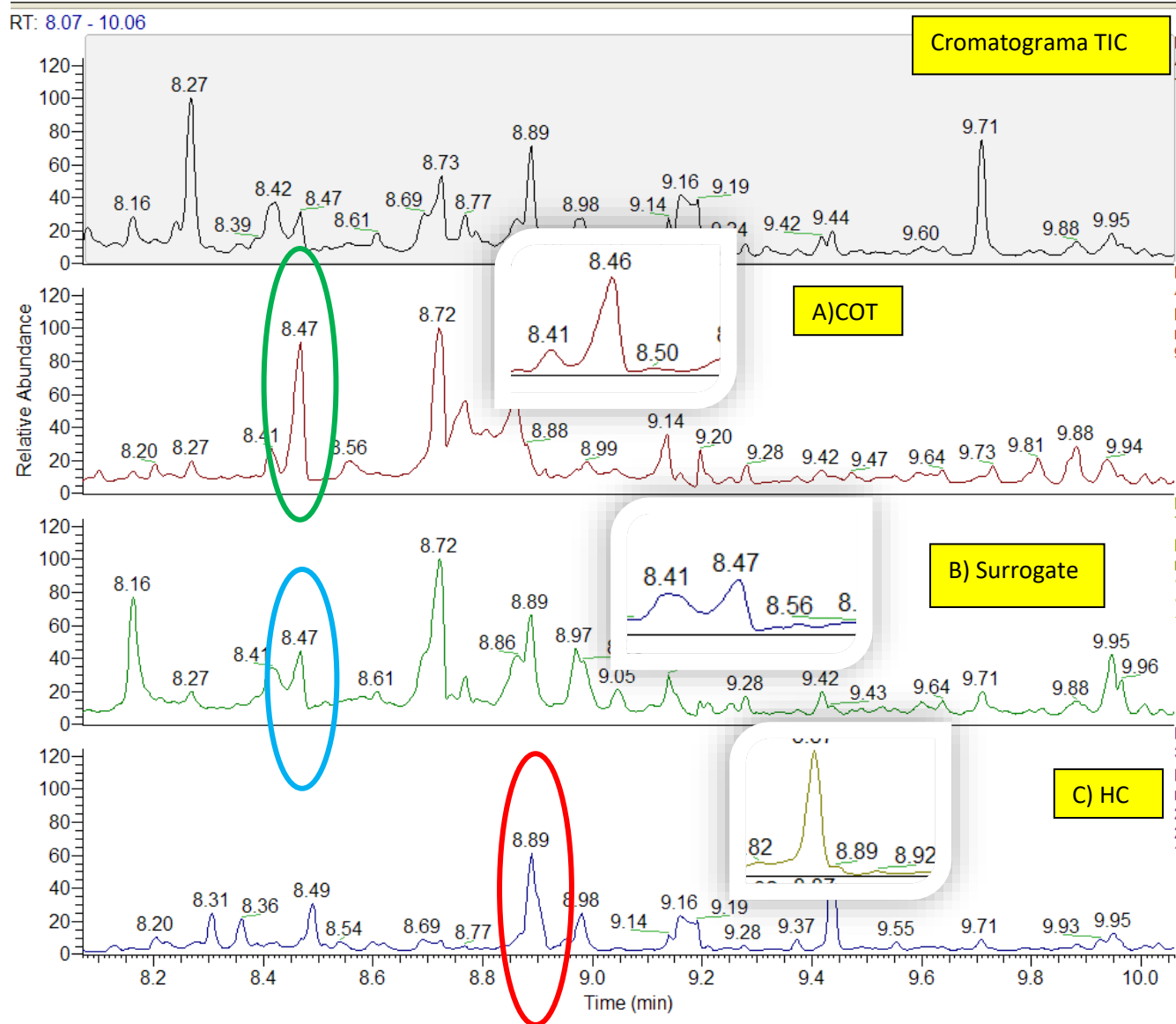


Figura 26. Cromatograma correspondiente a muestra de fumador pasivo. Siendo: A) COT con m/z de 98 y m/z de 176 en el inserto, B) Surrogate con m/z de 101 y m/z de 179 en el inserto y C) HC con m/z de 249 y m/z de 144 en el inserto.

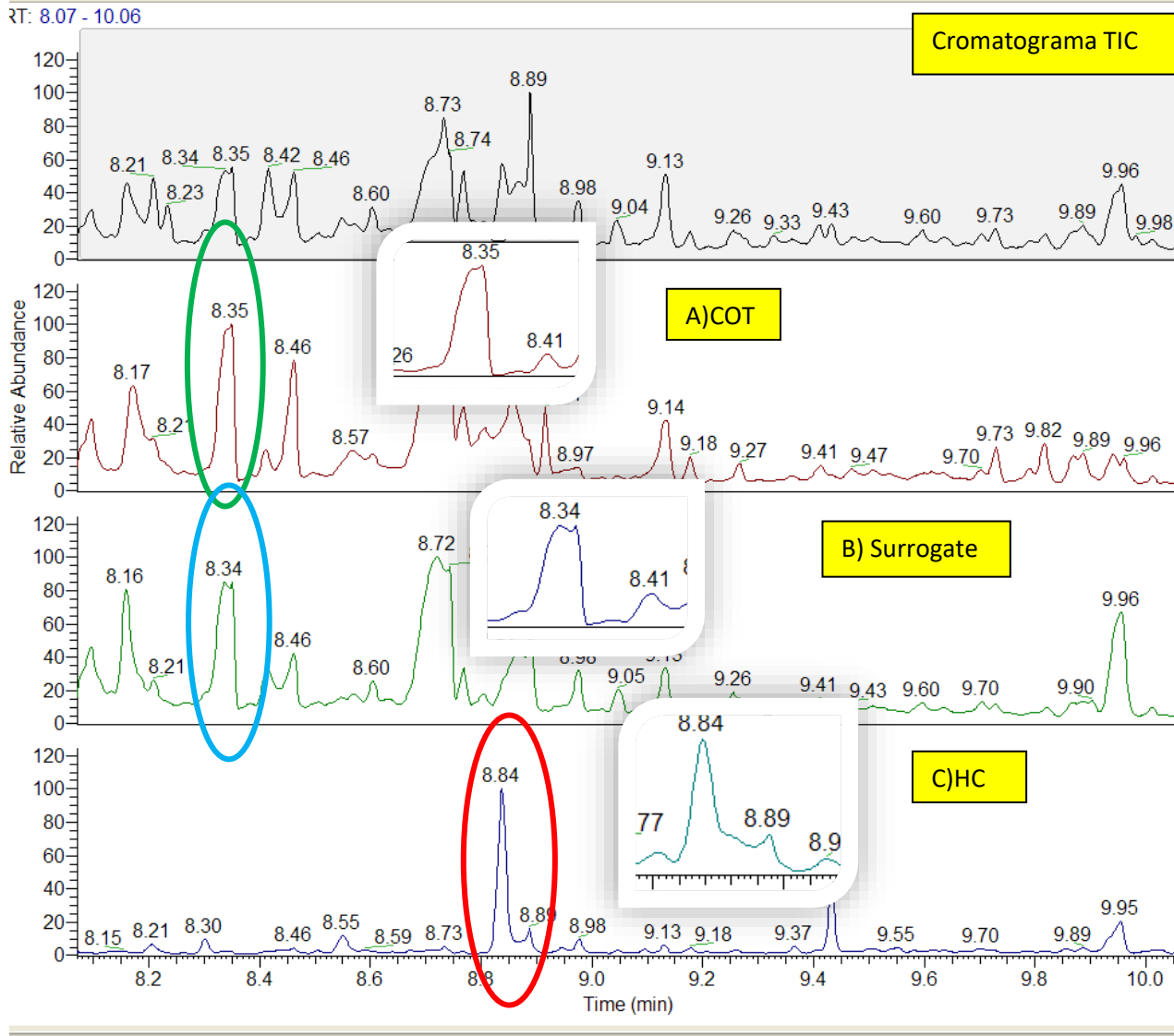


Figura 27. Cromatograma correspondiente a muestra de fumador activo. Siendo: A) COT con m/z de 98 y m/z de 176 en el inserto, B) Surrogate con m/z de 101 y m/z de 179 en el inserto y C) HC con m/z de 249 y m/z de 144 en el inserto.

6.7 Comparación teórica con otras metodologías de extracción y/o cuantificación de los analitos.

La tabla XIV compara los parámetros analíticos del método desarrollado para la determinación de los metabolitos de la Nicotina en orina con otros, basados en tecnologías alternativas de preparación de muestra y/o determinación según corresponda.

Cabe destacar que hay poca comparación, puesto que son pocos los estudios que han incluido ambos analitos. De los resultados obtenidos se destaca la precisión de nuestro método y la buena recuperación obtenida por sobre todo para COT con respecto a los otros estudios.

RDSE en comparación con las metodologías presentadas mostró ser una alternativa económica, con buenos parámetros analíticos, selectiva y amigable con el medio ambiente.

XIV. Comparación teórica de resultados.

Metodología /Determinación	Metabolito	Linealidad (r)	Exactitud (%)	Precisión (% RSD)	LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
RDSE/GC-MS	COT	0,9827	86	1	21	29
	HC	0,9923	56	2	0.7	0.9
SPE/GC-MS[26]	COT	0.997	78	9	0.06	10
	HC	0.999	75	7	0.02	10
HILIC-MS/MS[48]	COT	0.9979	62	12	----	----
	HC	0.9988	36	3	----	----
SPE/GC-MS-MS[49]	COT	0.9982	85	4	0.1	0.5
	HC	0.9964	89	4	0.2	0.3

6.8 Eco-escala analítica:

Para calcular la eco-escala en la metodología desarrollada en esta tesis, ésta se /*debe describir para ir asignando las penalidades (Tabla XV):

Acondicionamiento del disco: La fase Oasis MCX se acondiciona de manera secuencial con 10 mL de metanol y agua ultra pura por 5 minutos a 2000 rpm.

*Cabe señalar que todo el solvente utilizado en el acondicionamiento es reciclado.

Microextracción: El disco rotatorio con la fase seleccionada se inserta dentro del vial con 2 mL de orina y 18 mL de solución de extracción 50:50 HCl y agua ultra pura, se agita a 2000 rpm por 60 min a temperatura ambiente.

Clean up: Se realiza con 10 mL de una solución 30:70 de metanol-agua por 20 min a 2000 rpm.

Desorción: La desorción se realiza con una solución 20:80 de amoniaco y metanol por 20 minutos a 2000 rpm. Los extractos se evaporaron a sequedad con nitrógeno.

Derivatización: Para la derivatización de los analitos previo a la determinación por GC-MS, se utilizan 50 µL de piridina y 50 µL de N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) a 70°C por 30 min.

Tabla XV. Puntos de penalización de la metodología.

Reactivos, energía y desechos	Puntos de penalización
Metanol	4
MSTFA	2
Piridina	4
HCl	4
NH₃	6
GC-MS	2
Emisiones de vapores y gases al aire	3
Total	25

Eco-escala analítica = 75

El resultado final fue de 75 puntos, por lo que el método propuesto puede ser considerado como una metodología verde aceptable, lo que indica que la microextracción por sorción en disco rotatorio (RDSE) es una metodología ecológica de acuerdo con esta escala.

Sin embargo, la eco-escala que se propone necesita modificaciones, ya que no tiene en cuenta el uso de pequeños volúmenes de disolvente, que son ampliamente utilizados en las técnicas de microextracción. Por ejemplo, no se discriminan los puntos de penalización que se asignan a un método cuando se utilizan volúmenes de solventes en niveles de microlitros o mililitros, hasta 10 mL. Por lo tanto, una forma de minimizar los puntos de penalización obtenidos sería crear una nueva eco-escala analítica en el que se consideran este tipo de volúmenes (μL).

VII. Conclusiones:

La combinación de RDSE con GC-MS utilizando la fase sorbente MCX permitió desarrollar una metodología analítica para la determinación de dos de los metabolitos de la Nicotina desde muestras de orina, con propiedades analíticas similares a las reportadas previamente. Las concentraciones encontradas en muestras reales fueron en un intervalo de 113-1108 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para COT y 475-1119 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para HC.

La derivatización de la COT y la HC se logró con 50 μL de derivatizante MSTFA y 50 μL de piridina a una temperatura de 70°C por 30 min, sin la generación de subproductos y aumentando la sensibilidad de los metabolitos en el equipo.

Se optimizó el método de extracción, teniendo como condiciones óptimas la utilización de un disco con cavidad con 70 mg de la fase Oasis-MCX, un volumen de muestra de 2ml, el cual es muy accesible a conseguir, solución de extracción a pH ácido, una velocidad de rotación de 2000 rpm, clean up post extracción con 10 mL de una solución 30:70 metanol-agua por 20 minutos y una desorción con 10mL de una solución 20:80 de amoníaco-metanol por 20 min.

Los parámetros analíticos del método fueron: límite de detección de 0,7 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para HC y de 21 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para COT, el límite de cuantificación fue de 0.9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para HC y de 29 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para COT. Respecto a la recuperación esta fue de un 56% para HC y de un 86% para COT.

Se trabajó siempre pensando en una metodología ecoeficiente, priorizando el uso de bajos volúmenes de solvente, reutilizando algunos en medida de lo posible y buscando tiempos bajos de trabajo. Con la metodología implementada se pueden tratar varias muestras al mismo tiempo, obteniendo una gran ventaja por sobre otras metodologías ya implementadas. Esto quedó demostrado por lo demás al evaluar nuestra metodología, la cual pertenece a la categoría de metodología eco-analítica ecológica aceptable, con algunos criterios de penalidad llamados a perfeccionar.

VIII. Referencias:

- [1] A. EFE, "La contaminación causa siete millones de muertes anuales en el mundo | El Comercio," 26-Nov-2019. [Online]. Available: <https://www.elcomercio.com/tendencias/oms-contaminacion-muertes-anuales-mundo.html>. [Accessed: 01-Apr-2020].
- [2] D. Kim, Z. Chen, L.-F. Zhou, and S.-X. Huang, "Air pollutants and early origins of respiratory diseases," *Chronic Dis. Transl. Med.*, vol. 4, no. 2, pp. 75–94, 2018, doi: 10.1016/j.cdtm.2018.03.003.
- [3] D. Briggs, "Environmental pollution and the global burden of disease," *Br. Med. Bull.*, vol. 68, pp. 1–24, 2003, doi: 10.1093/bmb/ldg019.
- [4] A. N. Ramdzan, M. I. G. S. Almeida, M. J. McCullough, M. A. Segundo, and S. D. Kolev, "Determination of salivary cotinine as tobacco smoking biomarker," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 105, pp. 89–97, 2018, doi: 10.1016/j.trac.2018.04.015.
- [5] M. Otero and F. J. Ayesta, "El tabaquismo como trastorno adictivo," *Trastor. Adict.*, vol. 6, no. 2, pp. 78–88, 2004, doi: 10.1016/s1575-0973(04)70148-8.
- [6] K. M. Kim *et al.*, "Associations between urinary cotinine and symptoms of attention deficit/hyperactivity disorder and autism spectrum disorder," *Environ. Res.*, vol. 166, no. February, pp. 481–486, 2018, doi: 10.1016/j.envres.2018.06.018.
- [7] T. Winhusen, J. Theobald, D. C. Kaelber, and D. Lewis, "Regular cannabis use, with and without tobacco co-use, is associated with respiratory disease," *Drug Alcohol Depend.*, vol. 204, no. September, p. 107557, 2019, doi: 10.1016/j.drugalcdep.2019.107557.
- [8] E. Ness-Jensen and J. Lagergren, "Tobacco smoking, alcohol consumption and gastro-oesophageal reflux disease," *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, vol. 31, no. 5, pp. 501–508, 2017, doi:

10.1016/j.bpg.2017.09.004.

- [9] N. L. Ngu and M. McEvoy, "Environmental tobacco smoke and peripheral arterial disease: A review," *Atherosclerosis*, vol. 266, pp. 113–120, 2017, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2017.09.024.
- [10] Murcia Universidad, "Componentes del tabaco - Servicio de Atención a la Diversidad y Voluntariado." [Online]. Available: <https://www.um.es/web/adyv/diversidad/salud-comunitaria/tabaco/componentes>. [Accessed: 01-Apr-2020].
- [11] O. M. Salud, "OMS | Un tratado internacional para el control del tabaco," 2003. [Online]. Available: <https://www.who.int/features/2003/08/es/>. [Accessed: 18-May-2020].
- [12] M. Acuña A. and S. Bello S., "El Convenio Marco de la OMS para el Control del Tabaco: Un instrumento jurídico al servicio de la salud pública mundial," *Rev. Chil. enfermedades Respir.*, vol. 19, no. 3, pp. 143–145, 2003, doi: 10.4067/s0717-73482003000300001.
- [13] E. Medina L. and A. M. Kaempffer R., "Mortalidad del adulto en Chile," *Rev. Med. Chil.*, vol. 128, no. 10, pp. 1144–1149, Oct. 2000, doi: 10.4067/s0034-98872000001000011.
- [14] M. de Salud, "Ley-19419 09-OCT-1995 MINISTERIO DE SALUD - Ley Chile - Biblioteca del Congreso Nacional." [Online]. Available: <https://www.bcn.cl/leychile/navegar?idNorma=30786>. [Accessed: 23-Sep-2020].
- [15] P. Aceituno, V. Iglesias, M. Erazo, A. Droppelmann, C. Orellana, and A. Navas-Acién, "El ambiente laboral como fuente de exposición a humo de tabaco ambiental: Estudio en trabajadores de bares y restaurantes de Santiago, Chile," *Rev. Med. Chil.*, vol. 138, no. 12, pp. 1517–1523, 2010, doi: 10.4067/s0034-98872010001300007.
- [16] T. Norma, A. Ley, S. Bases, G. Del, and M. Ambiente, "Biblioteca del

Congreso Nacional de Chile - www.leychile.cl - documento generado el 04-Dic-2013,” pp. 6–8, 2013.

- [17] O. P. de la Salud, “OPS/OMS Chile - Chile: el país que más fuma en América.” [Online]. Available: https://www.paho.org/chi/index.php?option=com_content&view=article&id=325:chile-pais-que-mas-fuma-america&Itemid=215. [Accessed: 19-May-2020].
- [18] Y. P. S. Balhara and S. Sarkar, *Cotinine Urinalysis for Tobacco Use*, vol. 1. Elsevier Inc., 2016.
- [19] “Control of smoking in chile. statement of chilean society of respiratory diseases,” *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, vol. 27, no. 1. Sociedad Chilena de Enfermedades Respiratorias, pp. 41–42, 2011, doi: 10.4067/s0717-73482011000100007.
- [20] H. M. Shin, T. E. McKone, and D. H. Bennett, “Evaluating environmental modeling and sampling data with biomarker data to identify sources and routes of exposure,” *Atmos. Environ.*, vol. 69, pp. 148–155, 2013, doi: 10.1016/j.atmosenv.2012.12.027.
- [21] M. S. Ewer, “Cardiovascular issues,” *Adv. Cancer Surviv. Manag.*, pp. 325–334, 2015, doi: 10.1007/978-1-4939-0986-5_19.
- [22] I. N. del C. NIH, “Definición de metabolito - Diccionario de cáncer - National Cancer Institute.” [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/metabolito>. [Accessed: 01-Apr-2020].
- [23] E. Zagal and A. Sadzawka, “IMPLEMENTACIÓN DEL SISTEMA PARA LA VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS Y MEDICIONES DE LABORATORIO EN.”
- [24] OSMAN, “Vida media biológica.” [Online]. Available: <https://www.osman.es/diccionario/definicion.php?id=14309>. [Accessed: 18-May-2020].

- [25] Z. Verde *et al.*, "Effects of cigarette smoking and nicotine metabolite ratio on leukocyte telomere length.," *Environ. Res.*, vol. 140, pp. 488–494, 2015, doi: 10.1016/j.envres.2015.05.008.
- [26] F. Chiadmi and J. Schlatter, "Simultaneous determination of cotinine and trans-3-hydroxycotinine in urine by automated solid-phase extraction using gas chromatography-mass spectrometry," *Biomed. Chromatogr.*, vol. 28, no. 4, pp. 453–458, 2014, doi: 10.1002/bmc.3159.
- [27] D. A. Machacek and N. S. Jiang, "Quantification of cotinine in plasma and saliva by liquid chromatography," *Clin. Chem.*, vol. 32, no. 6, pp. 979–982, 1986, doi: 10.1093/clinchem/32.6.979.
- [28] R. Pérez-Ortuño, J. M. Martínez-Sánchez, E. Fernández, and J. A. Pascual, "High-throughput wide dynamic range procedure for the simultaneous quantification of nicotine and cotinine in multiple biological matrices using hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 407, no. 28, 2015, doi: 10.1007/s00216-015-8993-7.
- [29] P. J. Iii *et al.*, "Determination of the Nicotine Metabolites Cotinine and Trans-3'-Hydroxycotinine in Biologic fluids of Smokers and Non-Smokers using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry: Biomarkers for Tobacco Smoke Exposure and for Phenotyping Cytochrome P450 2A6 Activity," *J Chromatogr B Anal. Technol Biomed Life Sci*, vol. 879, no. 4, pp. 267–276, 2011, doi: 10.1016/j.jchromb.2010.12.012.
- [30] A. N. Ramdzan, L. Barreiros, M. I. G. S. Almeida, S. D. Kolev, and M. A. Segundo, "Determination of salivary cotinine through solid phase extraction using a bead-injection lab-on-valve approach hyphenated to hydrophilic interaction liquid chromatography," *J. Chromatogr. A*, vol. 1429, pp. 284–291, 2016, doi: 10.1016/j.chroma.2015.12.051.
- [31] G. D. Byrd, R. A. Davis, and M. W. Ogden, "A rapid LC-MS-MS method for the determination of nicotine and cotinine in serum and saliva samples from

smokers: Validation and comparison with a radioimmunoassay method,” *J. Chromatogr. Sci.*, vol. 43, no. 3, pp. 133–140, 2005, doi: 10.1093/chromsci/43.3.133.

- [32] M. Concheiro, T. R. Gray, D. M. Shakleya, and M. A. Huestis, “High-throughput simultaneous analysis of buprenorphine, methadone, cocaine, opiates, nicotine, and metabolites in oral fluid by liquid chromatography tandem mass spectrometry,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, no. 2, pp. 915–924, 2010, doi: 10.1007/s00216-010-3903-5.
- [33] H. Kataoka, R. Inoue, K. Yagi, and K. Saito, “Determination of nicotine, cotinine, and related alkaloids in human urine and saliva by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-mass spectrometry,” *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 49, no. 1, pp. 108–114, 2009, doi: 10.1016/j.jpba.2008.09.044.
- [34] H. A. Mottola, B. E. Simpson, and G. Gorin, “Absorptiometric Determination of Hydrogen Peroxide in Submicrogram Amounts with Leuco Crystal Violet and Peroxidase as Catalyst,” *Anal. Chem.*, vol. 42, no. 3, pp. 410–411, 1970, doi: 10.1021/ac60285a017.
- [35] P. Richter, A. Cañas, C. Muñoz, C. Leiva, and I. Ahumada, “Rotating disk sorbent extraction for pre-concentration of chromogenic organic compounds and direct determination by solid phase spectrophotometry,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 695, no. 1–2, pp. 73–76, 2011, doi: 10.1016/j.aca.2011.04.009.
- [36] L. Jachero, I. Ahumada, E. Fuentes, and P. Richter, “New biomimetic approach to determine the bioavailability of triclosan in soils and its validation with the wheat plant uptake bioassay,” *Chemosphere*, vol. 119, pp. 1062–1067, 2015, doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.09.030.
- [37] 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, doi: 10.1016/j.talanta.2014.06.003.

- [38] A. Shareef, M. J. Angove, and J. D. Wells, "Optimization of silylation using N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and N-(tert-butyltrimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17 α -ethinylestradiol," *J. Chromatogr. A*, vol. 1108, no. 1, pp. 121–128, 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2005.12.098.
- [39] K. Zhang and Y. Zuo, "Pitfalls and solution for simultaneous determination of estrone and 17 α -ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry after derivatization with N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide," *Anal. Chim. Acta*, vol. 554, no. 1–2, pp. 190–196, 2005, doi: 10.1016/j.aca.2005.08.045.
- [40] A. M. Andersson and N. E. Skakkebæk, "Exposure to exogenous estrogens in food: Possible impact on human development and health," *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 140, no. 6, pp. 477–485, 1999, doi: 10.1530/eje.0.1400477.
- [41] L. yerko koyashi honda Soto, "Desarrollo de estrategias analíticas de microextracción de compuestos estrogénicos desde matrices líquidas para ser evaluados por cromatografía líquida con analizador de tiempo de vuelo y detector de masas (LC-TOF/MS)," 2020.
- [42] A. Gałuszka, Z. M. Migaszewski, P. Konieczka, and J. Namieśnik, "Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 37, pp. 61–72, 2012, doi: 10.1016/j.trac.2012.03.013.
- [43] N. Gilart, F. Borrull, N. Fontanals, and R. M. Marcé, "Selective materials for solid-phase extraction in environmental analysis," *Trends Environ. Anal. Chem.*, vol. 1, 2014, doi: 10.1016/j.teac.2013.11.002.
- [44] N. Fontanals, R. M. Marcé, and F. Borrull, "Tendencias en sorbentes poliméricos para la extracción en fase sólida de compuestos polares.," *Cromatogr. y Técnicas Afines*, vol. 31, no. 1, pp. 3–27, 2010.
- [45] K. F. Ulisse Ulisse and P. Richter Duk, "Microextracción de fármacos antiinflamatorios no esteroideos desde matrices acuosas usando polímero

de impresión molecular inmovilizado en un sistema de disco rotatorio,” p. 64, 2014.

- [46] “Guía clínica exposición crónica al cadmio 2016,” 2016.
- [47] X. Y. Xiao and D. McCalley, “Quantitative analysis of estrogens in human urine using gas chromatography/negative chemical ionisation mass spectrometry,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 14, no. 21, pp. 1991–2001, 2000, doi: 10.1002/1097-0231(20001115)14:21<1991::AID-RCM125>3.0.CO;2-H.
- [48] P. Li, W. D. Beck, P. M. Callahan, A. V. Terry, and M. G. Bartlett, “Quantitation of cotinine and its metabolites in rat plasma and brain tissue by hydrophilic interaction chromatography tandem mass spectrometry (HILIC-MS/MS),” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 907, pp. 117–125, 2012, doi: 10.1016/j.jchromb.2012.09.018.
- [49] B. M. da Fonseca *et al.*, “Determination of biomarkers of tobacco smoke exposure in oral fluid using solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 889–890, pp. 116–122, 2012, doi: 10.1016/j.jchromb.2012.02.006.