

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***“MICROEXTRACCIÓN DE HORMONAS DESDE ORINA Y SU
DETERMINACIÓN POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA
ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS”***

**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:**

NATALIE CAROL AGUILERA MARABOLÍ

Director de Tesis: Dr. Pablo Richter Duk.

Santiago, Chile

Mayo 2016

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata:

NATALIE CAROL AGUILERA MARABOLÍ

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química, Área de Especialización: Química Analítica y Título de Químico, en el examen público rendido el día:

Director de Tesis:

Dr. Pablo Richter D. _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Loreto Ascar (Presidente). _____

Dra. María Carolina Zúñiga. _____

Dr. Adolfo Marican. _____

"No creo que haya alguna emoción más intensa para un inventor que ver alguna de sus creaciones funcionando. Esa emoción hace que uno se olvide de comer, de dormir, de todo".

Nikola Tesla.

"Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa".

Mahatma Gandhi.

"No te rindas que la vida es eso, continuar el viaje, perseguir tus sueños, destrabar el tiempo, correr los escombros y destapar el cielo. No te rindas, por favor no cedas, aunque el frío queme, aunque el miedo muerda, aunque el sol se esconda y se calle el viento".

Mario Benedetti.

AGRADECIMIENTOS

Hoy que comienza el fin de una de las etapas más importantes en mi vida, sólo me queda agradecer a cada una de las personas que hicieron posible este maravilloso viaje, lleno de alegrías, esfuerzo y, por sobre todo, dedicación.

En primer lugar agradecer a mi “pequeña familia”, constituida por mi madre Natalia y mi hermano Claudio. Mamá, creo que me faltarían páginas para agradecerte el apoyo incondicional que me haz brindado durante todos estos años de carrera. Siempre dispuesta a entregar lo mejor de ti para vernos felices. Gracias por ser la persona que me regala un abrazo siempre que lo necesito, a la que día a día me apoya y me dice: “hija, tu puedes”, por darme la seguridad de que soy buena en lo que hago y por sobre toda las cosas amarme como nadie más lo puede hacer. Sé que muchas veces ha sido difícil estar sola con dos hijos, pero como siempre te he dicho: “no te arrepientas de nada”. Si hoy me estoy titulando, es gracias a ti y a todo los esfuerzos que hiciste durante todos estos años. Te amo mamá.

A mi hermano Claudio, el hombre más importante en mi vida. Hermano, el amor que te tengo es imposible de describir. Gracias por confiar en mí durante todos estos años, por ser uno de mis mayores apoyos, por decirme: “nunca te rindas”, por mostrarme que todo lo malo tiene un lado positivo y por ser la paz que muchas veces necesité. Parte de este título también es tuyo. Te amo.

A mi amiga Kamila, mi otra mitad. Kami, nunca pensé encontrar alguien que fuera tan parecida a mí. Gracias por siempre apoyarme, por creer en mí cuando ni siquiera yo lo hacia, por ser mi barra, mi luz al final del túnel y por la infinitas risas que hicieron que muchos momentos fueran más amenos. Amiga, siempre le agradeceré a la vida por haberte conocido. Si volví a sonreír en la universidad,

fue gracias a tí. Te quiero mucho y pese a que se termina una etapa, comienza una nueva, más unidas que nunca.

A la familia Barrera Avalos, por ser mi segundo hogar. Gracias por el cariño incondicional que me han brindando, por ser una familia maravillosa donde siempre me he sentido parte de ustedes. De manera especial, al pequeño “querubín de azúcar”, Martín, por llenar mi corazón con su ternura, amor y enseñarme a tener paciencia. Además de hacer posible la realización de la mayor parte de esta tesis.

Agradezco a mis compañeros del Laboratorio de Química Ambiental, por todos los momentos vividos y por la buena disposición para ayudarme siempre que lo necesité. En especial a mis queridos amigos: Yanina, Luis, Vanty, Mercedes, Valentina, Catalina, Marcela y Montserrat, por su constante apoyo y cariño. Siempre estarán en mi corazón.

A Betsabet, por ser una amiga para mí, por todas esas conversaciones donde me escuchabas y me dabas tus consejos. Por los momentos de risas que nos hacían salir un poco de la rutina. Siempre estaré eternamente agradecida por todo el cariño y apoyo que me brindaste durante este tiempo. Te quiero mucho Betsa.

A mi amiga Yanina, a la que siempre agradeceré todo lo que hace por mí. Por dejarme entrar en su corazón, sacarme risas en momentos de estrés y por quererme tal como soy. Amiga, pese a que hoy nos encontramos separadas físicamente, esto nunca ha sido impedimento para seguir construyendo nuestra linda amistad. Eres una persona muy importante para mí.

A mi amigo Ignacio, por toda la ayuda que siempre me brindó, por el apoyo, por la paz y por todos los momentos de risas que hicieron que muchas veces me olvidara de los problemas que pudiera tener. Te quiero mucho y te deseo el mejor de los éxitos en tu camino como investigador.

A Diego, por ser un constante apoyo durante todo este tiempo, por tu preocupación, por sacarme una sonrisa cuando más lo necesitaba y por todo los momentos que hemos vivido. Gracias por quererme como soy y creer en mí. Te quiero mucho.

También agradecer a mi Director de Tesis Dr. Pablo Richter, por darme la oportunidad de desarrollar este trabajo con usted y confiar en mí para la realización de ayudantías y apoyo técnico del proyecto. Gracias Profesor por las palabras de aliento que me dió cuando muchas veces tenía inseguridades, por la buena disposición para resolver mis dudas y los momentos de risas.

De manera muy especial a la profesora MSc. Inés Ahumada, por su constante apoyo, cariño y confianza en mí. También a la profesor Dra. Loreto Ascar, por su buena disposición, apoyo y alegría, y al profesor Dr. Claudio Olea por sus consejos, conversaciones y palabras de aliento cuando más lo necesité.

A la Dra. María Carolina Zuñiga, Dra. Loreto Ascar y Dr. Adolfo Marican, miembros de la comisión examinadora de mi tesis. Les doy las gracias por su buena disposición y ayuda para finalizar esta etapa de buena manera.

A mi lado farmacéutico: Maca, Pancho, Cristobal, Alex, Max, Yipssia y Romina, por darme tanto cariño y siempre estar cuando los necesito. Siempre estaré agradecida por haberme brindando su amistad.

A Natalia Robledo, por su constante apoyo y preocupación. Amiga, infinitas gracias por todo lo entregado durante estos años. Por escucharme, guiarme y contenerme. Por siempre creer en mí y también por todo el material brindando en los años de estudios. Como siempre te lo dije: “eran mi cábala para eximirme”.

A mis amigos químicos: Ian, Pato, Pablo, Cata, Vale, Andrea, Camilo y Alejandro por todos estos años de amistad, apoyo y momentos de alegría vividos.

Por último, agradezco al **proyecto FONDECYT 1140716**, por brindarme el financiamiento para el desarrollo de mi tesis.

RESUMEN

Los estrógenos son hormonas de gran importancia que están asociadas al sistema reproductor femenino y al mantenimiento de las características sexuales secundarias. Éstas se pueden clasificar dentro de dos grupos: (a) las naturales como la estrona (E1), el estradiol (E2) y el estriol (E3), junto con sus metabolitos, y (b) las sintéticas como el 17 α -etinilestradiol (EE2), que se utiliza en la formulación de anticonceptivos. La mayoría de los estrógenos naturales son excretados por vía renal en forma conjugada como sulfatos o glucurónidos, pero pueden cambiar a estrógeno libre.

La cuantificación de este tipo de analitos en muestras biológicas como la orina, puede ser un gran desafío debido a las bajas concentraciones que se pueden encontrar, necesitándose rigurosos pasos de preparación de muestra antes de su determinación analítica.

En este trabajo se realizó una estrategia analítica para la determinación de las hormonas estrogénicas: E1, E2, E3, sus metabolitos, y la hormona sintética EE2 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 estireno-divinilbenceno (e-DVB), la cual se encuentra inmovilizada sobre un disco rotatorio plano. Las condiciones óptimas de extracción fueron una agitación a 3000 rpm

por un tiempo de 60 minutos y un volumen de muestra de 25 mL (2 mL de orina y 23 mL de agua ultra pura) a pH 7,0. Antes de la etapa de desorción se realizó un “clean up” post extracción con 5 mL de una solución metanol – agua (1:4) por 5 minutos. La desorción de los compuestos se realizó en 1 etapa de 15 minutos con 5 mL de metanol, posteriormente el extracto se evaporó con nitrógeno hasta sequedad. Al eluato seco se le agregó 50 μ L del derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) y 50 μ L de piridina. Posteriormente se sometió a un ambiente de temperatura a 90°C por 30 minutos. Una vez completada la derivatización se agregó 20 μ L de 3,3',4,4'-Tetraclorobifenil (PCB 77, estándar interno) y finalmente se inyectaron 2 μ L en el GC-MS. Además, en el proceso se incorporó un estándar “surrogate” ((20,21)-¹³C₂-EE2).

Con el objetivo de saber la cantidad total de estrógenos presente en las muestras (conjugado + libre) se realizó una hidrólisis enzimática. Para ello se utilizaron 2 mL de orina y 2 mL de un buffer de hidrólisis, que contiene la enzima β -glucuronidasa (encargada de la desconjugación). Los 4 mL se incubaron por 20 horas a 37°C, transcurrido este tiempo se procedió a realizar la extracción con las condiciones óptimas mencionadas anteriormente, pero esta vez diluyendo con 21 mL de agua ultra pura.

Los límites de detección y cuantificación del método variaron entre 0,057 a 0,71 μ g·L⁻¹ y 0,17 a 2,15 μ g·L⁻¹, respectivamente. Las recuperaciones relativas en muestras blanco de orina que fueron enriquecidas con 0,4 μ g·L⁻¹ de las hormonas, estuvieron en un intervalo de 67-98%.

El método descrito fue aplicado en 9 muestras reales provenientes tanto de mujeres como de hombres en un amplio intervalo de edad (26 a 59 años). La concentración de las 9 hormonas detectadas se obtuvo en un intervalo de 0,5 - 366 μ g·L⁻¹ y 1,1 - 709 μ g·L⁻¹ sin y con hidrólisis, respectivamente.

SUMMARY

Estrogens are hormones of great importance that are associated with the female reproductive system and with the maintenance of secondary sex characteristics. These can be classified into two groups: (a) natural hormones, such as estrone (E1), estradiol (E2) and estriol (E3), together with its metabolites, and (b) synthetic hormones as 17 α -ethinylestradiol (EE2), which is used in the formulation of contraceptive pills. Most natural estrogens are secreted by the kidney in their conjugated form as sulfates or glucuronides, but they can switch to the free estrogen.

The quantification of this type of analytes in biological samples such as urine, can be a great challenge due to the low concentrations that they can be found, needing rigorous sample preparation steps, prior to analytical determination.

In this work, an analytical strategy for determining estrogenic hormones: E1, E2, E3, its metabolites, and synthetic hormone EE2, from urine samples was developed based on the rotating disk sorptive extraction (RDSE) technique, and the subsequent detection and quantification by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS).

RDSE technique was selected due to its economic, versatile and eco-efficient (green chemistry) features, while GC-MS provides good sensitivity and low detection limits for to research in complex samples.

The analytes are retained and pre-concentrated in the styrene-divinylbenzene (e-DVB) sorbent phase, which is immobilized on a rotating disk. The optimum conditions for extraction of all analytes were a rotation velocity of 3000 rpm, for 60 min and a sample volume of 25 mL (2 mL of urine and 23 mL of ultrapure

water) at pH 7.0. Previous to the desorption step, a clean-up was performed after extraction with 5 mL of a methanol - water (1: 4) solution for 5 minutes. The desorption of the compounds was performed in one step of 15 minutes with 5 mL of methanol, then the extract was evaporated to dryness with nitrogen. An aliquot of 50 μL of derivatizing agent N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (MSTFA) and 50 μL of pyridine were added to the dry eluate. Subsequently, it was subjected to a temperature at 90°C for 30 minutes. Once derivatization was complete, 20 μL of PCB 77 was added as internal standard and finally a volume of 2 μL was injected into the GC-MS. Furthermore, in the process, a standard surrogate ((20,21) -¹³C₂-EE₂) was incorporated.

To know the total amount of estrogen present in the samples (conjugated + free) an enzymatic hydrolysis was performed, by treating a volume of 2 mL of urine with 2 mL of a buffer hydrolysis, containing the enzyme β -glucuronidase (responsible for deconjugation). This mixture of 4 mL was incubated for 20 hours at 37°C. After this time, the mixture was diluted to 25 mL with water and the extraction was carried out under the optimal conditions mentioned above.

The detection and quantification limits of the method were between 0.057 to 0.71 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and 0.17 to 2.15 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Relative recoveries of blank urine samples that were spiked with 0.4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of hormones were within a range of 67-98%.

The described method was applied in 9 real samples from both women and men, in a wide age range (26-59 years). The concentration of the 9 hormone detected were obtained in a range of 0.5 to 366 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and 1.1 to 709 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, without and with hydrolysis, respectively.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Preparación de muestra.	4
1.2. Determinación y cuantificación analítica.....	8
1.3. Hidrólisis enzimática.....	10
1.4. Analitos en estudio.	11
II. HIPÓTESIS	12
III. OBJETIVOS	13
3.1. Objetivo General.	13
3.2. Objetivos Específicos.	13
IV. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	14
V. METODOLOGÍA	17
5.1. Identificación de los analitos mediante GC-MS.	17
5.2. Condiciones Cromatográficas.	17
5.3. Derivatización de los analitos.	17
5.4. Optimización de las variables químicas e hidrodinámicas del proceso de extracción.	18
5.5. “Clean up”.....	21
5.6. Reutilización de la fase.....	22
5.7. Validación del método analítico.....	22
5.8. Optimización de la hidrólisis enzimática.	23
5.9. Eco-escala analítica.	24
5.10. Aplicación del método validado a muestras reales de orina para estimar los niveles de las hormonas estudiadas.	24

5.11. Comparación con otras metodologías.....	25
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
6.1. Optimización del método de derivatización.	26
6.2. Optimización de variables las químicas e hidrodinámicas del proceso de extracción.	30
6.3. “Clean up”.....	46
6.4. Reutilización de la fase.....	51
6.5. Validación del método.	53
6.6. Optimización de la hidrólisis enzimática.	54
6.7. Eco-escala analítica.	55
6.8. Muestra real.	58
6.9. Comparación con otras metodologías.....	66
VII. CONCLUSIONES.....	70
VIII. REFERENCIAS.....	72
IX. ANEXO.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Hormonas estrogénicas naturales a) E1, b) E2 y c) E3.	2
Figura 2. Hormona sintética EE2	2
Figura 3. 2-Hidroxiestradiol y 4-Hidroxiestradiol.....	4
Figura 4. Proceso de extracción y elución de los analitos en SPE.....	5
Figura 5. Esquema del dispositivo comercial de SPME	6
Figura 6. Esquema de SBSE convencional	7
Figura 7. Disco Rotatorio Plano (a) y con cavidad central (b).....	8
Figura 8. Estructura de los derivatizantes MSTFA y BSTFA.....	9
Figura 9. Estrona-3-glucurónido.....	10
Figura 10. Cromatograma del full scan de un estándar de 5 mg·L ⁻¹ de las 9 hormonas derivatizadas.....	27
Figura 11. Estructuras de las 9 hormonas derivatizadas con MSTFA y piridina	27
Figura 12. Estructuras de los productos obtenidos en la derivatización de EE2 con MSTFA y sin piridina	28
Figura 13. Pruebas de derivatización a diferentes tiempos y temperaturas.....	29
Figura 14. Especies de E1 en intervalo de pH (1 a 14).....	31
Figura 15. Estudio de recuperación de los analitos en las fases en polvo a pH 7	32
Figura 16. Estudio de recuperación de los analitos en las fases en lámina a pH 7	33
Figura 17. Estructura de la urubilina (producto de degradación de la bilirrubina)	36
Figura 18. Disco a pH 3 (a) y 7 (b).	36
Figura 19. Estudio de pH para la extracción de E1, 2-OHE1, 2-OHE2, 4-OHE2 y EE2, en disco con lámina de e-DVB.	37

Figura 20. Estudio de pH para la extracción de 16 α -OHE1, E2, 4-OHE1 Y E3, en disco con lámina de e-DVB.....	37
Figura 21. Desorción de las 9 hormonas en estudio con 10 mL de metanol en 1 etapa de 5, 10, 15, 20 y 30 minutos.....	38
Figura 22. Desorción de las 9 hormonas en estudio con 5 mL de metanol en 1 etapa de 5, 10 y 15 minutos.....	39
Figura 23. Desorción de las 9 hormonas en estudio con 5 mL de metanol en 2 etapa de 5, 10 y 15 minutos.....	40
Figura 24. Perfil de extracción a diferentes tiempo de E1, 2-OHE1, 2-OHE2, 4-OHE2 y EE2	41
Figura 25. Perfil de extracción a diferentes tiempo para 16 α -OHE1, E2, 4-OHE1 y E3.....	42
Figura 26. Disco con e-DVB antes y después de la extracción con un volumen de 25 mL de orina, respectivamente.....	43
Figura 27. Estudio de volumen de orina para las 9 hormonas	43
Figura 28. Proceso de extracción en RDSE a 3000 rpm.....	44
Figura 29. Estudio de velocidad de rotación del disco para la extracción de E1, 2-OHE1, 2-OHE2, 4-OHE2 y EE2.....	45
Figura 30. Estudio de velocidad de rotación del disco para la extracción de 16 α -OHE1, E2, 4-OHE1 y E3.	45
Figura 31. Comparación de turbidez cuando se realiza el “clean up” simultáneamente a la extracción con la fase aniónica en polvo frente a la modalidad post extracción con 1:4 de metanol-agua.....	48
Figura 32. Estudio de diferentes procesos de “clean up” para las 9 hormonas.48	
Figura 33. Estudio del porcentaje de metanol utilizado en el proceso de “Clean up” post extracción.....	49
Figura 34. Estudio de reutilización de la fase e-DVB para 2-OHE1, 2-OHE2, 4-OHE2 y EE2.	51

Figura 35. Estudio de reutilización de la fase e-DVB para E1, E2, E3, 4-OHE1 y 16 α -OHE1.....	52
Figura 36. Foto de 5 de las 9 muestras reales de orina.	64
Figura 37. Espectros de masas de las hormonas E1 (a) y E2 (b) , donde se observan los fragmentos más importantes para su determinación analítica.....	85
Figura 38. Espectros de masas de las hormonas 2-OHE1 (a) y EE2 (b), donde se observan los fragmentos más importantes para su determinación analítica.	86
Figura 39. Espectros de masas de las hormonas 16 α -OHE1 (a) y 2-OHE2 (b), donde se observan los fragmentos más importantes para su determinación analítica.	87
Figura 40. Espectros de masas de las hormonas 4-OHE1 (a) y 4-OHE2 (b), donde se observan los fragmentos más importantes para su determinación analítica.	88
Figura 41. Espectros de masas de las hormonas E3 (a) y surrogate (20,21)- ¹³ C ₂ -EE2 (b), donde se observan los fragmentos más importantes para su determinación analítica.	89
Figura 42. Espectro de masas del estándar interno PCB 77 , donde se observan los fragmentos más importantes para su determinación analítica.	90
Figura 43. Cromatogramas muestra real A (Mujer, 26 años) sin (a) y con (b) hidrólisis enzimática.	91
Figura 44. Cromatogramas muestra real C (Mujer, 50 años) sin (a) y con (b) hidrólisis enzimática.	92
Figura 45. Cromatogramas muestra real D (Mujer, 32 años, 24 semanas de embarazo) sin (a) y con (b) hidrólisis enzimática.	93
Figura 46 Cromatograma muestra real H (Hombre, 46 años) sin (a) y con (b) hidrólisis enzimática.	94

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla I. Estructura de las fases estudiadas.....	19
Tabla II. Tiempos y masas de los fragmentos correspondientes a los compuestos sililados.....	26
Tabla III. Resumen de Recuperación (%) de las hormonas con e-DVB en polvo y lámina.....	34
Tabla IV. Resumen de las recuperaciones absolutas de las hormonas sin y con etapa de limpieza.....	50
Tabla V. Parámetros analíticos del método.....	53
Tabla VI. Comparación de metodologías de hidrólisis enzimática.....	54
Tabla VII. Puntos de penalización de la metodología.....	57
Tabla VIII. Condiciones óptimas para la metodología de extracción de las hormonas.....	58
Tabla IX. Resultados muestra real A (Mujer, 26 años).....	59
Tabla X. Resultados muestra real B (Hombre, 29 años).....	59
Tabla XI. Resultados muestra real C (Mujer, 50 años).....	60
Tabla XII. Resultado muestra real D (Mujer, 32 años, 24 semanas de embarazo).....	60
Tabla XIII. Resultados muestra real E (Mujer, 26 años).....	61
Tabla XIV. Resultados muestra real F (Mujer, 59 años, menopausia).....	61
Tabla XV. Resultados muestra real G (Hombre, 46 años, paciente que tuvo cáncer testicular).....	62
Tabla XVI. Resultados muestra real H (Hombre, 46 años).....	62
Tabla XVII. Resultados muestra real I (Hombre, 27 años).....	63
Tabla XVIII. Resultados de la muestra I fortificada con 10 [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$].....	63
Tabla XIX. Comparación de diferentes métodos analíticos de extracción y determinación para hormonas estrogénicas en orina humana.....	68
Tabla XX. Propiedades físico-químicas de las hormonas en estudio.....	83

Tabla XXI. Propiedades físico-químicas de los componentes de la orina..... 84

ABREVIATURAS

E1	: Estrona.
E2	: Estradiol.
E3	: Estriol.
EE2	: 17 α -Etinilestradiol.
2-OHE1	: 2-Hidroxiestrona.
2-OHE2	: 2-Hidroxiestradiol.
4-OHE1	: 4-Hidroxiestrona.
4-OHE2	: 4-Hidroxiestradiol.
16α-OHE1	: 16 α -Hidroxiestrona.
PCB 77	: 3,3',4,4'-Tetraclorobifenil.
SPE	: Extracción en fase sólida.
SPME	: Microextracción en fase sólida.
SBSE	: Extracción por sorción con barra de agitación.
RDSE	: Microextracción por sorción en disco rotatorio.
BAμE	: Microextracción por sorción con barra.
FPSE	: Extracción por sorción en fase de tejido.
UAPCE	: Extracción de punto de nube asistida por ultrasonido.
PDMS	: Polidimetilsiloxano.
PDMS-DVB	: Polidimetilsiloxano-divinilbenceno.
PA	: Poliacrilato.
C18	: Octadecil.
Oasis HLB	: Divinilbenceno-N-Vinilpirrolidona.
e-DVB	: Estireno-divinilbenceno
Anión-SR	: Copolímero de estireno-divinilbenceno modificada con grupos de amina cuaternaria.
MSTFA	: N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida.

BSTFA	: N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida.
GC-MS	: Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas.
LC-MS	: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.
PM	: Peso molecular.
pKa	: Constante de disociación ácida.
logKow	: Logaritmo del coeficiente de partición octanol-agua.
SIM	: Monitoreo selectivo de iones.
SCAN	: Barrido completo de masas.
ppt	: Partes por trillón.
ppb	: Partes por billón.
LOD	: Límite de detección.
LOQ	: Límite de cuantificación.
%RDS	: Desviación estándar relativa.
PAHs	: Hidrocarburos aromáticos policíclicos.
PCBs	: Bifenilos policlorados.

I. INTRODUCCIÓN

Los estrógenos son un grupo de hormonas sexuales esteroidales del tipo femenino, principalmente derivadas del colesterol, presentes en los animales y seres humanos. Los más altos niveles de estas hormonas se encuentran en los tejidos con función reproductiva, como son los ovarios, las mamas y el útero. Éstas ejercen diversas funciones biológicas, siendo: la diferenciación sexual femenina, la vasodilatación arterial y el mantenimiento de la densidad ósea. Además, los estrógenos naturales tienen una función protectora contra diversas enfermedades, como la osteoporosis, la arteriosclerosis, las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas [1]. Las hormonas estrogénicas se pueden clasificar dentro de dos grupos: las naturales (o endoestrógenos) y las sintéticas (o exoestrógenos). Las naturales son sintetizadas por el organismo humano, dentro de las cuales encontramos a la estrona (E1), el estradiol (E2) y el estriol (E3) (Figura 1), mientras que las sintéticas son producidas de manera artificial, como el 17 α -etinilestradiol (EE2) (Figura 2) que se utiliza en la formulación de anticonceptivos y se ha relacionado con la disminución en la reproducción y feminización de los peces, cuando ésta se encuentran presentes en aguas naturales. [2]–[6]. Existen otros compuestos que emulan la acción de los estrógenos (por ejemplo, ciertos pesticidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs), los bifenilos policlorados (PCBs), fármacos y productos de cuidado personal), debido a que presentan estructuras químicas similares a las hormonas [2].

Los estrógenos, particularmente el esteroide sintético, EE2, y los esteroides naturales, como E1 y E2, han llamado la atención de los científicos durante los últimos años debido a su constante aparición en aguas superficiales y en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales; además de los posibles efectos adversos en el desarrollo y la reproducción de los peces, la vida silvestre

(disminución de la tasa de reproducción de aves) e incluso se ha observado que los efectos alcanzan a los seres humanos (disminución del conteo de espermatozoides y desarrollo de cáncer de mama, testicular y de próstata) [7], [8].

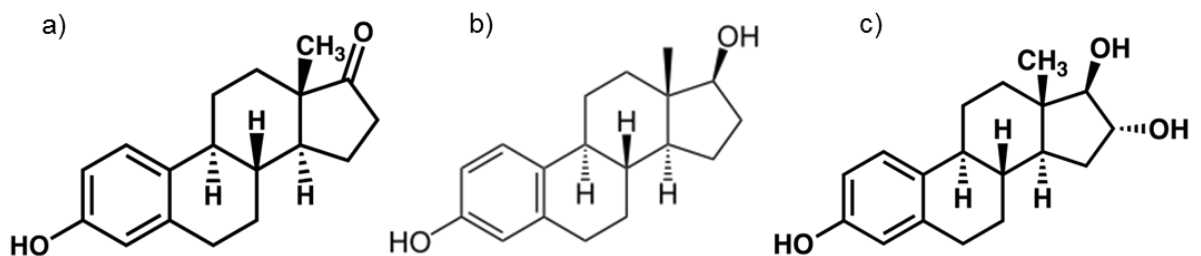


Figura 1. Hormonas estrogénicas naturales a) E1, b) E2 y c) E3.

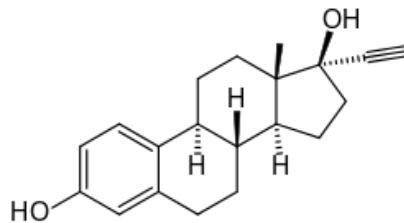


Figura 2. Hormona sintética EE2.

La principal fuente de origen de los estrógenos en el agua son los efluentes domésticos, éste es debido principalmente a las hormonas que naturalmente son excretadas por el organismo humano, al uso generalizado de píldoras anticonceptivas y otros medicamentos análogos que se utilizan para el tratamiento de cánceres o trastornos hormonales, como ocurre comúnmente durante la menopausia. Los estrógenos naturales pueden ser excretados en diferentes cantidades dependiendo del género, edad, estado de salud, la dieta o el embarazo. Otras fuentes importantes de estas hormonas son los desechos del ganado, provenientes de ovejas, vacas, cerdos, aves de corral y otros animales,

así como reguladores del crecimiento en la acuicultura y también por las descargas de aguas residuales provenientes de la industria farmacéutica [9], [10].

Se ha informado que las concentraciones de los estrógenos en afluentes y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales y de los recursos hídricos superficiales van en el orden de las partes por trillón (ppt), pero los valores dependerán principalmente si la cantidad de estrógeno está en forma conjugada o libre cuando es excretada en la orina y las heces. Aunque las concentraciones que han sido detectadas son muy bajas, éstas pueden afectar de igual manera al medio acuático [11]. Las máximas concentraciones de hormonas en las aguas superficiales aún esperan ser reguladas por la legislación europea. En el año 2012, la comisión europea propuso la incorporación de 15 productos químicos a la lista de los 33 contaminantes que deben ser monitoreados y controlados en aguas superficiales de la Unión Europea (EU), que incluyen al diclofenaco, EE2 y E2 [12].

Se conoce que los estrógenos naturales que son excretados se encuentran principalmente como conjugados de glucurónidos y sulfatos, pero luego pueden cambiar a estrógeno libre. En el caso de los glucurónidos, se ha informado que su cambio a estrógeno libre es mucho más rápido que los sulfatados [13]. La biotransformación de los estrógenos a sus formas conjugadas se produce en el hígado y hace que las moléculas sean menos lipofílicas, con el fin de ser fácilmente excretadas en la orina y la bilis [1], [14]–[16].

La medición de los principales estrógenos naturales, como son E1 y E2, en la sangre y la orina, ha servido para diagnosticar y monitorear las terapias de reemplazo hormonal, detectar la pubertad precoz en niñas y fundamentalmente para el estudio de la enfermedad de Alzheimer, cáncer de testículo, ovario y mama. Por lo tanto, el seguimiento de los niveles de estas hormonas en una

matriz como la orina, resulta ser tanto de interés clínico como ambiental. En este tipo de matriz se han detectado concentraciones de los estrógenos del orden de las partes por billón (ppb), utilizando la técnica de cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) [17]–[20].

Para poder explicar cómo los estrógenos contribuyen al cáncer, existen dos mecanismos que se dan a conocer. El primer mecanismo es debido a que los elevados niveles de estrógenos aumentan de manera directa o indirectamente la tasa de proliferación de células genotóxicas por estimulación de los receptores de estrógenos que controlan la transcripción y por consecuencia, aumenta el número de errores que ocurren durante la replicación del ADN. Mientras que el segundo mecanismo, se relaciona con la generación de derivados de quinona de algunos metabolitos de estrógenos, como son el 2-hidroxiestradiol (2-OHE2) y el 4-hidroxiestradiol (4-OHE2), lo que da como resultado mutaciones oncogénicas para inducir el cáncer [6].

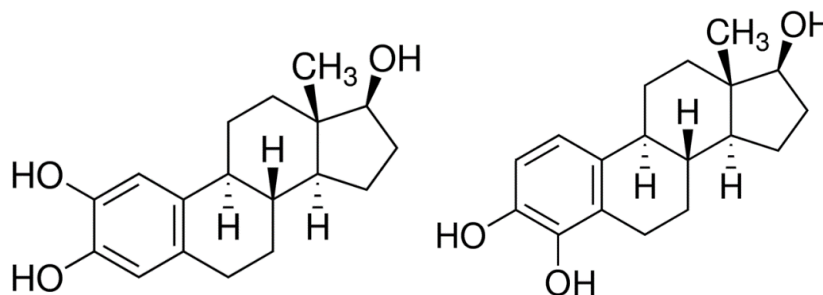


Figura 3. 2-Hidroxiestradiol y 4-Hidroxiestradiol.

1.1. Preparación de muestra.

La cuantificación de los estrógenos en muestras ambientales y biológicas presenta un importante desafío, debido a que sus concentraciones se encuentran en niveles traza y ultra traza en este tipo de matrices tan complejas, por lo que

es necesario una serie de rigurosos pasos de preparación de muestra antes de su determinación analítica [10].

Varios procedimientos analíticos para la determinación de estrógenos están basados principalmente en el uso de extracción en fase sólida (SPE) [4], [6], [8], [11], [12], [16], [17], [21]–[27], microextracción en fase sólida (SPME) [2], [21], [28] y extracción por sorción con barra de agitación (Stir bar sorptive extraction) (SBSE) [9], [18], [21].

La SPE es una importante técnica para el enriquecimiento y limpieza de muestras ambientales, que permite la sorción del analito, si es que éste resulta afín con la fase sorbente, mientras que los eventuales interferentes de la matriz, eluyen [29]. Sus beneficios van desde el tiempo de análisis, un costo relativamente bajo, reducción del trabajo, rapidez, baja manipulación por parte del analista, hasta la reducción del consumo de disolvente (en comparación con la extracción líquido-líquido) [30]. Además, es la principal técnica utilizada para la extracción de estrógenos desde diversas matrices. Los inconvenientes de SPE incluyen que las muestras deben ser filtradas para evitar la obstrucción de la fase sorbente por algún tipo de partícula y la utilización de disolventes orgánicos en las etapas de acondicionamiento, lavado y elución.

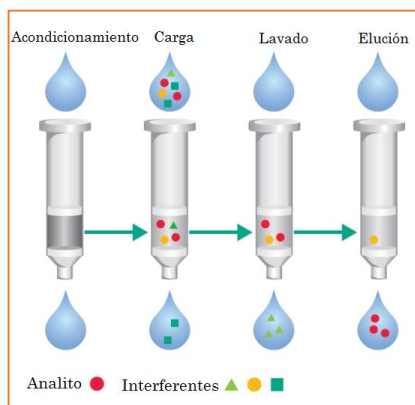


Figura 4. Proceso de extracción y elución de los analitos en SPE.

La SPME es una técnica que se comenzó a desarrollar en el año 1989 y se aplica muy a menudo para la preparación de muestras de hormonas esteroidales. La extracción se lleva a cabo con sorbentes que tengan una alta afinidad por los analitos de interés, de manera reproducible y con baja afinidad por los compuestos interferentes [30]. El dispositivo de extracción es portátil y fácil de usar; y la extracción es relativamente rápida, se puede automatizar y acoplar en línea a una técnica instrumental. Sin embargo, esta técnica presenta algunas deficiencias como son: la fragilidad de fibra de sílice fundida, su limitada capacidad de sorción, alto costo, tienen una escasa vida útil, y el deterioro de la fibra con solventes orgánicos [10], [22]. En este sentido, las nuevas versiones de las técnicas de microextracción se han desarrollado para superar los problemas relacionados con el uso de la fibra [21]. Los clásicos sorbentes utilizados en esta técnica son: polidimetilsiloxano (PDMS), polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB) y el poliacrilato (PA).

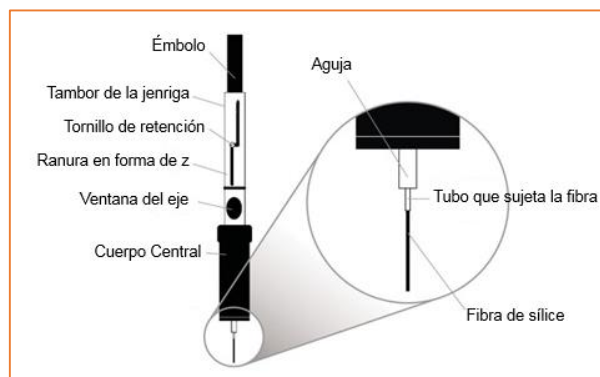


Figura 5. Esquema del dispositivo comercial de SPME.

Otra técnica de extracción, que es ampliamente utilizada hoy en día, es la SBSE. Dicha técnica se desarrolló en 1999 y consiste en una barra magnética recubierta con una fase estacionaria como sorbente, que se sumerge en un vial que contiene la muestra para extraer el analito de la solución. La muestra se agita con el dispositivo de extracción por un tiempo determinado [10], [30]. Sin

embargo, esta técnica posee desventajas, como el rápido deterioro de la fase por el continuo roce de ésta con las paredes del vial que lo contiene. Debido a esto, no es recomendable utilizar velocidades altas de rotación (sobre 600 rpm) para extender la vida de la fase de sorción.



Figura 6. Esquema de SBSE convencional.

En el año 2009, basándose en la tecnología de bioreactores rotatorios [31], [32], se desarrolló una técnica alternativa a la SBSE, denominada microextracción por sorción en disco rotatorio (*rotating disk sorptive extraction*) (RDSE) (Figura 7). La ventaja de RDSE es 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. Por otra parte, el dispositivo posee una mayor relación área/volumen de fase, lo que favorece al proceso de extracción [33]. Es de menor costo y mucho más versátil con respecto a la fase que requiere ser inmobilizada, ya que posee dos conformaciones: disco plano [33]–[44] y disco con cavidad [45]–[49]. Para el disco plano, se han utilizado sorbentes en lámina como octadecil (C18), nylon o PDMS, que permiten la extracción de compuestos apolares y semi-polares. En el caso del disco con cavidad, se tiene la posibilidad de alojar sorbentes en polvo, como C18 u Oasis HLB, siendo este último utilizado para extraer compuestos de mayor polaridad al ser un copolímero que presenta estructuralmente un balance hidrofílico-lipofílico. La capacidad de poder adaptar

diferentes tipos de fases sorbente, permite utilizar la fase más adecuada según el analito en estudio.

Existen diversos trabajos previos referentes a RDSE que describen su aplicación en una gran variedad de determinaciones analíticas, como pesticidas, triclosán, PAHs, nonilfenol, anti inflamatorios, hormonas, entre otros. Además de diversas matrices, como agua, plasma y orina [33]–[49].

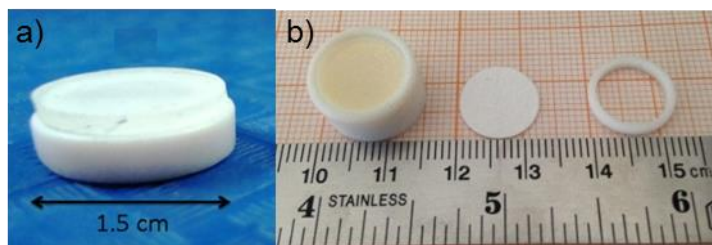


Figura 7. Disco Rotatorio Plano (a) y con cavidad central (b).

1.2. Determinación y cuantificación analítica.

Una vez realizada la preparación de la muestra, se procede a utilizar una técnica de determinación analítica, destacando la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) [12], [21], [22], [50], cromatografía líquida acoplada a un detector masa-masa (LC-MS/MS) [2], [8], [21], [24], [26] y cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) [2], [4], [11], [12], [17]–[22], [50], [51] para este tipo de analitos.

LC-MS y LC-MS/MS se han convertido en las técnicas más ampliamente utilizadas para la determinación de estrógenos en matrices acuosas, debido a su gran sensibilidad y especificidad. Ambas no están limitadas por la no volatilidad y el alto peso molecular de las hormonas. Además poseen la ventaja de realizar un análisis directo sin necesidad de una etapa previa de derivatización. LC-

MS/MS ofrece límites de detección mucho más bajos que LC-MS, además esta técnica es superior en términos de selectividad, ayudando a evitar falsos positivos en el análisis de matrices complejas [21], [22].

En el caso de GC-MS, ofrece una buena sensibilidad, bajos límites de detección para la investigación de muestras complejas y el mantenimiento de éste es mucho más económico que el LC-MS y el LC-MS/MS. Pero esta técnica es menos utilizada en el análisis de esteroides que LC-MS, debido principalmente a la dificultad de la etapa adicional de derivatización [10], [12], [19], [20], [22]. Para solucionar este problema, la sililación es el método más común y versátil utilizado en la derivatización de compuestos orgánicos que contienen hidrógenos activos (como los de los grupos –OH, de los estrógenos) lo que resulta en productos con polaridad reducida, aumentando su volatilidad y estabilidad térmica, permitiendo así que sean medidos por GC-MS. Otra ventaja importante, es que se mejoran las propiedades de espectrometría de masas mediante la producción de patrones de fragmentación más favorables. Las hormonas estrogénicas pueden ser sililadas usando diferentes reactivos como N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) o N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) (Figura 8), como es el caso de esta tesis. También, con la finalidad de mejorar la derivatización, se utilizan catalizadores, tales como la N,N-dimetilformamida o piridina [7], [52].

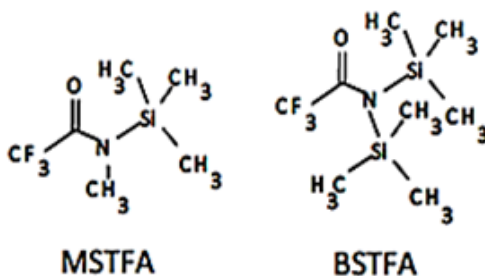


Figura 8. Estructura de los derivatizantes MSTFA y BSTFA.

1.3. Hidrólisis enzimática.

Se han desarrollado varias metodologías para la determinación de estrógenos en muestras de orina. Cuando sólo se desea determinar estrógenos libres, la metodología incluye una preparación de muestra sencilla [49]. Sin embargo, debido a que en la orina las hormonas se excretan también como metabolitos hidroxilados y conjugados, es que se han desarrollado tratamientos de hidrólisis previo a la extracción para poder determinar la cantidad total de estrógenos (libres + conjugados).

La hidrólisis más utilizada ha sido la del tipo enzimática, mediante la enzima β -glucuronidasa proveniente de *Hélix Pomatia*, la cual tiene acción sobre los conjugados glucurónidos (Figura 9) y en menor proporción, acción sulfatasa. El tratamiento consiste básicamente en agregar un buffer de hidrólisis a la muestra (que contiene la enzima β -glucuronidasa a un pH determinado) y dejar actuar por el tiempo que indique la metodología a utilizar. Si se quisiera estudiar la cantidad de estrógeno que estaría presente en la forma conjugada, se deduce restando la concentración de estrógeno totales (muestra que presenta la hidrólisis) menos los estrógenos libres (muestras no sometidas a la hidrólisis) [1], [6], [17]–[20], [24], [53], [54].

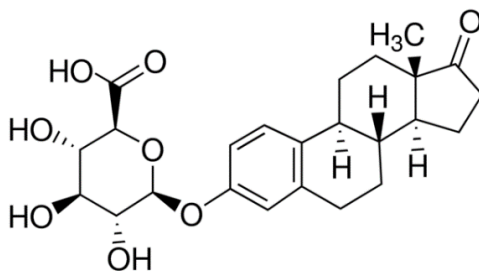


Figura 9. Estrona-3-glucurónido.

1.4. Analitos en estudio.

Los compuestos investigados en la presente tesis corresponden a hormonas estrogénicas naturales: estrona, estradiol y estriol, y sus metabolitos: 2-hidroxiestradiol, 4-hidroxiestradiol, 2-hidroxiestrona, 4-hidroxiestrona y 16 α -hidroxiestrona, en sus formas libres y conjugadas (glucurónidos y sulfatados), y la determinación de estrógenos sintéticos, como es el 17 α -etinilestradiol en una matriz biológica como la orina. Ésto puede estar limitado por las bajas concentraciones que se puedan encontrar de estos esteroides en la orina y la complejidad de la matriz. Ésto puede estar limitado por las bajas concentraciones que se puedan encontrar de estos esteroides en la orina y la complejidad de la matriz.

II. HIPÓTESIS

La combinación de RDSE con GC-MS permitirá el desarrollo de una metodología analítica para la determinación de estrógenos y sus metabolitos en muestras de orina, basándose en la afinidad química que existe entre éstos y la fase sorbente, en conjunto con las características hidrodinámicas de la técnica de extracción.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General.

Desarrollar y optimizar una estrategia analítica para la determinación de estrógenos y sus metabolitos desde orina, mediante RDSE, para su posterior cuantificación mediante GC-MS.

3.2. Objetivos Específicos.

- Optimizar la derivatización de los analitos y desarrollar un método para su detección y cuantificación por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).
- Optimizar las variables que afectan en el proceso de extracción, limpieza y elución del sistema analítico en estudio mediante RDSE.
- Implementar y optimizar una metodología de hidrólisis enzimática, para permitir la recuperación de los estrógenos conjugados.
- Determinar las propiedades analíticas del método, incluyendo su ecoeficiencia.
- Aplicar el método analítico desarrollado para la determinación de los analitos en muestras reales.
- Analizar e interpretar resultados.

IV. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

4.1. Reactivos.

- Acetato de etilo, acetona y metanol grado HPLC, ácido clorhídrico fumante (37%) y ácido acético (100%), Merck (Darmstadt, Germany).
- L-ácido ascórbico, Merck (Darmstadt, Germany).
- Acetato de sodio, Merck (Darmstadt, Germany).
- Agua ultra pura (Milli-Q).
- Agente derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA), Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA).
- Piridina, Merck (Darmstadt, Germany).
- Fase sorbente en lámina estireno-divinilbenceno, Supelco.
- Fase sorbente en lámina de un copolímero de estireno-divinilbenceno modificada con grupos de amina cuaternaria (Anión-SR), Supelco.
- Fase sorbente en lámina C18, Supelco.
- Fase sorbente en polvo C18 endcapped, Selectra.
- Fase sorbente en polvo de un copolímero de estireno-divinilbenceno modificada con grupos de amina cuaternaria, Selectra.
- Fase sorbente en polvo de estireno-divinilbenceno, Selectra.
- Fase sorbente en polvo OASIS HLB, Water.
- Enzima β -glucuronidasa, tipo HP-2 de *Hélix pomatia*, Sigma Aldrich (USA).
- Nitrógeno extrapuro $\geq 99,995\%$, Linde (Santiago, Chile).
- Helio extrapuro $\geq 99,9999\%$, Linde (Santiago, Chile)

4.2. Estándares.

- Estrona Fluka, Sigma Aldrich (USA)
- Estradiol, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany)
- Estriol 98,8%, Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany)
- 17 α -etinilestradiol 99%, Sigma Aldrich (USA).
- 2-Hidroxiestrona, Toronto Research Chemicals INC (Toronto, Canadá)
- 4-Hidroxiestrona, Sigma Aldrich (USA).
- 16 α -Hidroxiestrona, Toronto Research Chemicals INC (Toronto, Canadá)
- 2-Hidroxiestradiol, Sigma Aldrich (USA).
- 4-Hidroxiestradiol, Sigma Aldrich (USA).
- Estándar "surrogate": (20,21)-¹³C₂-17 α -etinilestradiol (99%) de 100 mg·L⁻¹, Cambridge Isotope Laboratories, Inc (USA).
- Estándar interno: 3,3',4,4'-Tetraclorobifenil (PCB 77), Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany)

4.3. Materiales.

- Jeringas de Inyección Hamilton de 10, 50, 100 y 1000 μ L.
- Discos de teflón con cavidad y planos, 1,5 centímetros de diámetro con barra magnética.
- Material de vidrio, vasos precipitados, pipetas aforadas, matraces de aforo y botellas Duran.
- Pipetas Pasteur Hirshman.
- Sacabocado de golpe 12 y 14 mm de diámetro, Boehm.
- Viales de vidrio 1.8, 12, 20 y 40 mL con tapa con liner de teflón, Genesys.
- Micropipetas 5 - 1000 μ L, Labopette.
- Cinta doble contacto 3M.

- 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 con detector de espectrómetro de masas con analizador cuadrupolo, ISQ e inyector SSL. El modo de ionización es por impacto electrónico (EI), como gas portador se utilizó helio de 99,999 % pureza con un flujo de 1 mL/min y columna capilar 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.
- Agitadores magnéticos MMS-3000, Boeco, Alemania.
- Agitadores magnéticos multipunto MS-52M, Jeio Tech, Korea.
- pH metro WTW pmx 3000.
- Baño de ultrasonido, LUC-410, Labtech, Korea.
- Bloque de calor VWR, U.S.A.
- Estufa WTC Binder.
- Vortex mixer KMC-1300V.
- Incubadora, VWR, U.S.A.

V. METODOLOGÍA

5.1. Identificación de los analitos mediante GC-MS.

Para la identificación de las hormonas por GC-MS se utilizaron estándares de 5 mg·L⁻¹ de cada una de ellas, para la realización de un barrido completo de masas (modalidad scan) en un rango de 50-550 *m/z*, donde se seleccionó dos iones representativos y de alta abundancia para cada uno de los analitos. Luego se realizó un monitoreo selectivo de iones (SIM) con los iones seleccionados en modalidad scan. El ion de mayor abundancia se utiliza para cuantificar (target ion) y el segundo para la confirmación inequívoca de los compuestos (qualifier ion). La confirmación se realiza de acuerdo a la razón de la abundancia de ambos iones en la muestra, la cual debe corresponder al mismo valor que se ha determinado en un estándar ($\pm 20\%$), de lo contrario no se puede confirmar la presencia de éste en la muestra.

5.2. Condiciones Cromatográficas.

El programa de temperaturas del horno inicia en 75°C por 1 min, luego alcanza los 150°C a una razón de 20°C/min manteniéndose por 5 min, y finalmente llega a una temperatura de 300°C a 10°C/min por 3 min con un *solvent delay* de 14 min. La temperatura del inyector es de 280°C en modalidad splitless, la línea de transferencia a 250 °C, la fuente de ionización a 200°C, y el flujo del gas portador es de 1 mL/min.

5.3. Derivatización de los analitos.

Las muestras antes de ser analizadas por GC-MS, fueron derivatizadas. Para ello los 5 mL que se obtienen del proceso de desorción se evaporaron a

sequedad con gas nitrógeno. Al eluato seco se le agregó 50 µL de derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) y 50 µL de piridina. Ésto se sometió a un ambiente de temperatura a 90°C por 30 minutos. Una vez completada la derivatización se enfrió a temperatura ambiente, posteriormente se agregó 20 µL de 3,3',4,4'-Tetraclorobifenil (PCB 77, estándar interno) y finalmente se inyectó 2 µL en el GC-MS.

5.4. Optimización de las variables químicas e hidrodinámicas del proceso de extracción.

Se realizó la optimización de las variables que podrían afectar la extracción de los analitos en estudio: fase sorbente, pH, velocidad de rotación del disco, tiempo de extracción, volumen de muestra y tiempo de desorción.

Como blanco para todos los estudio se utilizó orina de un pre púber (niño de 4 años), en donde las concentraciones de los analitos en estudio son mínimas o nulas [55].

5.4.1. Variables químicas

a) Fase sorbente.

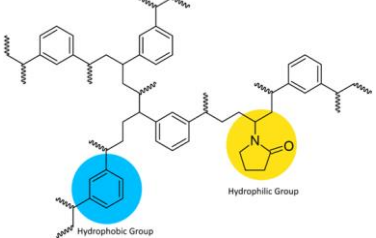
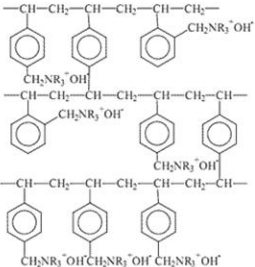
Para realizar el estudio de la fase sorbente se utilizó una metodología que ya había sido implementada en el laboratorio de química ambiental para la extracción de 3 de las 9 hormonas en agua [49], ésto con el objetivo de utilizar un método univariado, es decir, sólo variando la fase sorbente. Además, se realizó en agua para observar cual extrae de mejor manera los analitos sin el efecto matriz que provoca la orina.

Las condiciones de extracción para realizar este estudio fueron: una agitación a 3000 rpm por un tiempo de 60 minutos y un volumen de muestra de 25 mL

(agua ultra pura) a pH 7. La desorción se realizó en 2 etapas, cada una de ellas de 15 minutos con 5 mL de metanol, posteriormente el extracto se evaporó con nitrógeno hasta sequedad para pasar a la etapa de derivatización.

Las fases que se utilizaron en polvo son un copolímero de Divinilbenceno-N-vinilpirrolidona (Oasis HLB), Octadecil (C18), Estireno-divinilbenceno (e-DVB) y un copolímero de Estireno-divinilbenceno modificado con grupos de amina cuaternaria (Anión-SR) y en lámina se utilizarán las mismas a excepción de Oasis HLB.

Tabla I. Estructura de las fases estudiadas.

Fases	Estructuras
Octadecil (C18)	$\begin{array}{c} R_1 \\ \\ \text{Silica)-O-Si-(CH}_2\text{ CH}_2\text{ CH}_2\text{ CH}_2\text{ CH}_2\text{ CH}_2\text{ CH}_2\text{ CH}_2\text{)}_2\text{CH}_2\text{CH}_3 \\ \\ R_2 \end{array}$
Estireno-divinilbenceno (e-DVB)	$\begin{array}{c} \left\langle \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{CH} \right\rangle_n \\ \begin{array}{ccc} \text{C}_6\text{H}_5 & \text{C}_6\text{H}_5 & \text{C}_6\text{H}_5 \\ & & \\ \text{CH} - \text{CH}_2 - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH} - \text{CH}_2 \end{array} \end{array}$
Divinilbenceno-N-vinilpirrolidona (Oasis HLB)	
Estireno-divinilbenceno modificado con grupos de amina cuaternaria (Anión-SR)	

b) pH.

Los pH estudiados fueron en un intervalo de 3 a 12, para el ajuste de pH ácidos (entre 3 y 6) se agregó ácido clorhídrico (HCl) $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ y para pH alcalinos (entre 9 y 12) fue hidróxido de sodio (NaOH) $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$.

c) Desorción y volumen de disolvente.

Una vez extraídos los analitos en la fase sorbente seleccionada es necesario desorberlos para su posterior determinación. La eficiencia se evaluó respecto al área relativa a distintos tiempos y con diferentes volúmenes de metanol. Se hicieron pruebas variando el volumen de metanol de 5 y 10 ml, en 1 y 2 etapas, y en un intervalo de tiempo de 5, 10, 15, 20 y 30 minutos de desorción.

5.4.2. Variables hidrodinámicas.

a) Tiempo de extracción y volumen de muestra.

Para determinar el tiempo óptimo se realizaron extracciones variando el tiempo entre 15 a 150 minutos para 2 mL de orina diluida en 23 mL de agua ultra pura con una concentración final de $0,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de las hormonas en el volumen total.

Además, se estudió el volumen de muestra a utilizar. Ésto se realizó con 25 mL de orina, 10 mL de orina en 15 mL de agua ultra pura, 5 mL de orina en 20 mL de agua ultra pura, 3 mL de orina en 22 mL de agua ultra pura y 2 mL de orina en 23 mL de agua ultra pura.

b) Velocidad de agitación.

Para establecer la dependencia de la agitación en el proceso de extracción, se realizaron pruebas a diferentes velocidades de rotación del disco, de 500 a 3000 rpm por un tiempo de 30 minutos.

5.5. “Clean up”.

Para poder eliminar el potencial interferente de la orina (Urobilina) se probó diferentes modalidades de limpieza.

Una modalidad de pre extracción de “*clean up*” fue utilizada inmovilizando sobre un disco plano una fase sorbente compuesta por un copolímero de estireno-divinilbenceno modificada con grupos de amina cuaternaria (anión-SR), el cual se introduce en la muestra por 30 min. También se probó la utilización de la misma fase en polvo soportado en un disco con cavidad, por el mismo tiempo.

Por otra parte, se probó la realización de una etapa de limpieza de manera simultánea a la extracción. Para ello en el vial que contenía los 25 mL de la solución (2 mL de orina y 23 mL de agua ultra pura) se le agregó 6,5 mg de la fase anión-SR en polvo.

También se realizó la modalidad de “*clean up*” post extracción [56], [57] utilizando 5 mL de disoluciones de 1:4 y 2:3 de metanol-agua por 5 minutos sobre el dispositivo, para luego realizar la desorción con metanol puro, evaporar a sequedad y derivatizar para su determinación.

5.6. Reutilización de la fase.

A un disco plano se le adhirió una fase sólida en lámina con un diámetro de 14 mm correspondiente a e-DVB y se utilizó para el proceso de extracción.

Además, para establecer cuantas extracciones se pueden realizar sin alterar la eficiencia de la extracción, se procedió a reutilizar la fase sorbente.

5.7. Validación del método analítico.

5.7.1. Precisión.

Para evaluar la precisión a nivel de replicabilidad, se evaluó en una muestra de orina de pre púber enriquecida con una concentración final de $0,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de los analitos, aplicando el método propuesto a 6 muestras de la misma orina utilizando diferentes discos en las mismas condiciones. La precisión es expresada como la desviación estándar relativa (%RDS) de las mediciones.

5.7.2. Exactitud.

La exactitud del método fue determinada a partir de las recuperaciones relativas, para esto se aplicó el método de extracción a 6 muestras de orina de un pre púber enriquecidas a una concentración final de $0,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de los analitos.

5.7.3. 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 a una concentración final de $0,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 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.

5.7.4. 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 que fue multiplicado por el factor 10 para obtener el límite de cuantificación.

5.7.5. Curva de Calibración.

La curva de calibración se realizó en matriz y fue obtenida a partir del área cromatográfica de soluciones a diferentes niveles de concentración ($0,4 - 100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) dividido por el área de la señal del estándar interno PCB 77 (con el fin de normalizar). Se grafica en cada caso la concentración de cada hormona en función del área relativa, para luego mediante regresión lineal obtener la ecuación de la recta.

5.8. Optimización de la hidrólisis enzimática.

Para la optimización de la hidrólisis se utilizaron de la literatura dos metodologías: la primera consistía en realizar este procedimiento por 20 horas a una temperatura de 37°C [53] y la segunda por 3 horas a 55°C [17], todo esto utilizando 2 mL del buffer de hidrólisis enzimática más 2 mL de orina de una mujer (muestra real).

El buffer utilizado se prepara a partir de 50 mg de L-ácido ascórbico, 100 μL de enzima β -glucuronidasa, tipo HP-2 de *Hélix Pomatia* y 10 mL de $0,15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de buffer de acetato de sodio (pH 5,2).

5.9. Eco-escala analítica.

La eco-escala del método desarrollado se determinó siguiendo el análisis propuesto por Galuszka et al. en 2012 [58]. 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. 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.

5.10. Aplicación del método validado a muestras reales de orina para estimar los niveles de las hormonas estudiadas.

El método desarrollado fue aplicado a 9 muestras de orina provenientes tanto de mujeres como hombres en un amplio intervalo de edad (26 a 59 años). Las muestras se obtuvieron de la primera orina de la mañana, en un volumen entre 100 – 300 mL. Éstas fueron almacenadas en botellas de vidrio con ácido ascórbico (para prevenir la degradación oxidativa de los metabolitos) [19] y protegidas de la luz (para evitar la fotodegradación de las hormonas presentes). En caso de no ser utilizadas de manera inmediata se congelaron.

Para el análisis se tomó 10 mL de la muestra, se ajustó pH y se agregó 50 µL de “surrogate” de 1 mg·L⁻¹. Las muestras se dividieron en 4 alícuotas de 2 mL, a 2 de ellas se agregó un volumen de agua ultra pura de 23 mL y se les introdujo

el dispositivo de extracción de manera directa y las 2 restantes se llevaron a la etapa de hidrólisis. En esta etapa los 2 mL de orina se mezclan con 2 mL del buffer de hidrólisis y se incuban por el tiempo y temperatura óptimo. Transcurrido el tiempo, a los 4 mL se les agregó 21 mL de agua ultra pura y se introdujo el dispositivo de extracción.

5.11. Comparación con otras metodologías.

Para la evaluar las propiedades analíticas de la metodología desarrollada, se comparan las cifras de mérito y la eco-escala de otras metodologías reportadas para determinar las hormonas en estudio en la matriz orina.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Optimización del método de derivatización.

Se utilizó la metodología de derivatización conjunta de 3 de las 9 hormonas en estudio (E2, E3 y EE2), que ya se había implementado en el laboratorio de química ambiental [49]. Ésta consiste en la utilización de 50 μL de MSTFA y 50 μL de piridina a una temperatura de 80°C por 30 minutos. Con ésto se logró la completa derivatización de las 9 hormonas (Figura 10). Los tiempos de retención y los fragmentos de las moléculas del espectro de masas obtenido de cada hormona (Tabla II) fueron útiles para corroborar la presencia de los analitos en los análisis de optimización y muestra real.

Tabla II. Tiempos y masas de los fragmentos correspondientes a los compuestos sililados.

Analitos	Tiempo de retención en matriz [min]	Ion de cuantificación [m/z]	Ion de identificación [m/z]
E1	23,58	342	257
E2	23,85	285	416
2-OHE1	24,67	430	431
EE2	24,73	425	440
2-OHE2	24,80	504	505
16 α -OHE1	24,87	286	287
4-OHE1	24,94	430	431
4-OHE2	25,21	504	505
E3	25,41	311	345
PCB 77	19,97	292	290
(20,21)- ¹³ C ₂ -EE2	24,73	427	442

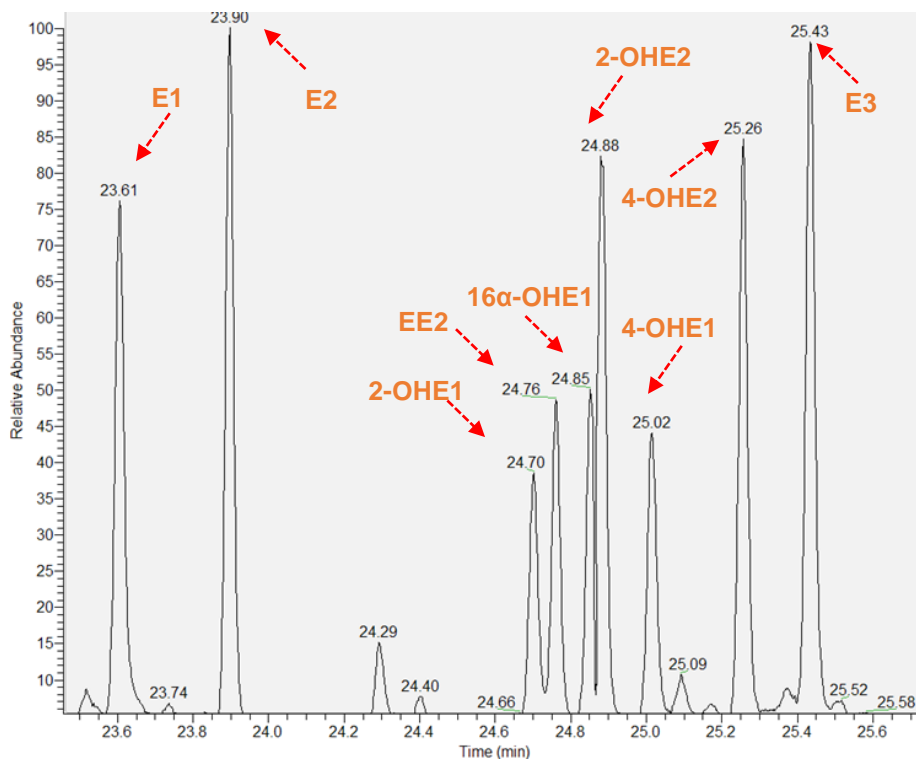


Figura 10. Cromatograma del full scan de un estándar de 5 [mg·L⁻¹] de las 9 hormonas derivatizadas.

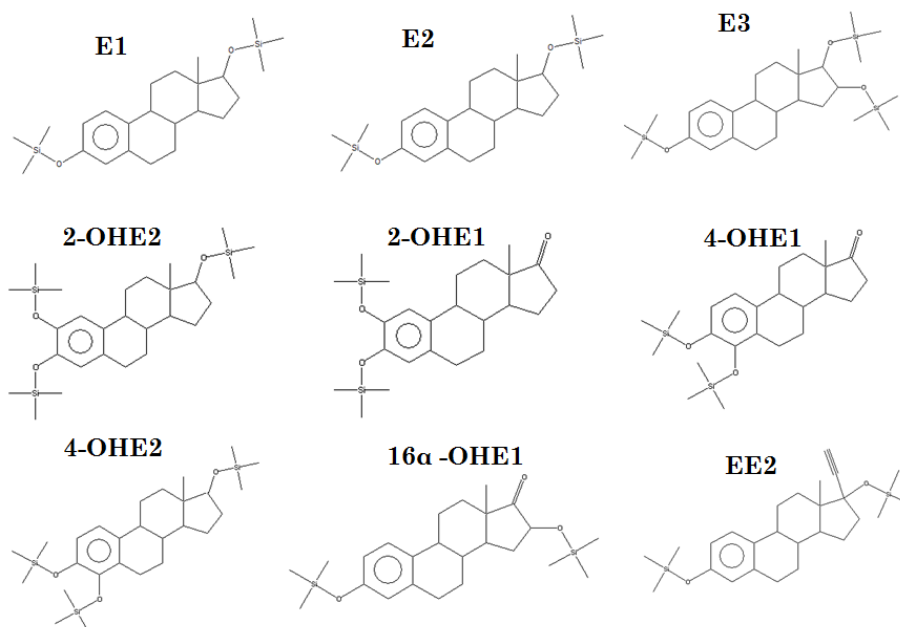


Figura 11. Estructuras de las 9 hormonas derivatizadas con MSTFA y piridina.

Los derivatizantes trimetilsililados (MSTFA y BSTFA) han sido ampliamente utilizados como agente de sililación, pero como la hormona EE2 contiene un grupo etinil y un grupo hidroxilo en el Carbono 17, esto provoca que los derivatizantes por sí solos no cumplan su función (Figura 12) [7]. La utilización de un solvente catalítico como la piridina [52] permite la formación de un solo producto de derivatización, evitando la formación de compuestos mono sililados de EE2 y E1, este último se forma debido a que la hormona EE2 en el proceso de derivatización puede perder su grupo etinil.

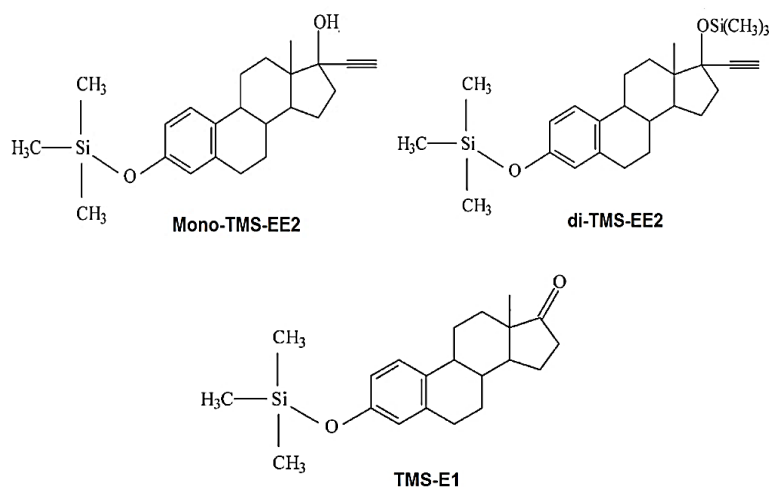


Figura 12. Estructuras de los productos obtenidos en la derivatización de EE2 con MSTFA y sin piridina.

Una vez probada la metodología se observó que los metabolitos hidroxilados presentaban una menor sensibilidad con respecto al resto, por lo que se decidió realizar diferentes pruebas cambiando la temperatura y tiempo del proceso de derivatización: 45 minutos a 80°C, 30 minutos a 90°C y 30 minutos a 80°C. Para el caso de la cantidad de piridina y MSTFA a utilizar, esto ya había sido estudiado previamente [49], [59], por lo que se optó por mantener constantes las concentraciones anteriormente utilizadas (50 µL de piridina y 50 µL MSTFA).

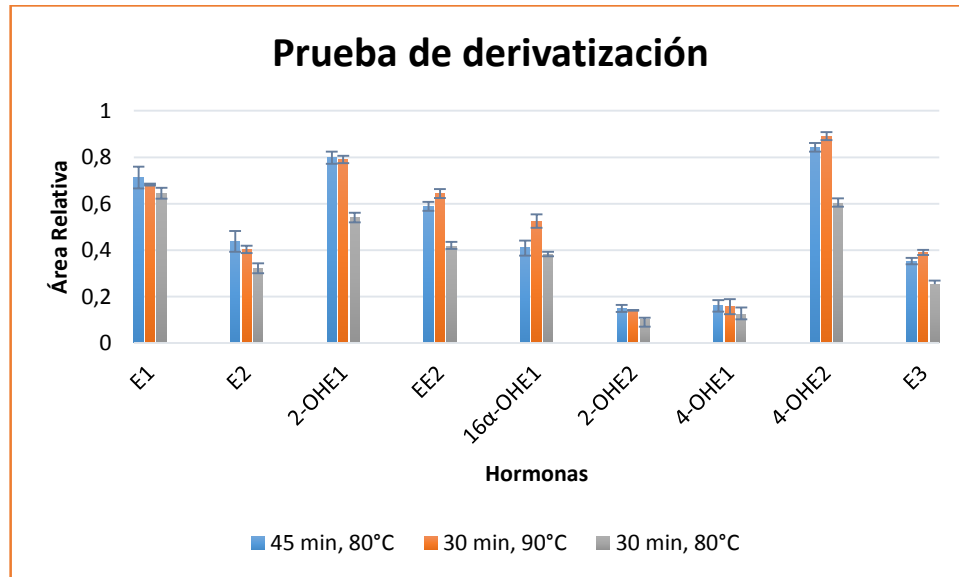


Figura 13. Pruebas de derivatización a diferentes tiempos y temperaturas.

Se puede observar que cuando la derivatización se realiza a un mayor tiempo que el de la metodología original, aumenta el área relativa de todas las hormonas (sin la generación de subproductos) (Figura 13), lo mismo ocurre en el caso de aumentar la temperatura. Ésto puede deberse principalmente a que la mayoría de las hormonas poseen 3 grupos hidroxilo, por lo que se debería necesitar un mayor tiempo o una mayor temperatura para realizar la completa derivatización de la totalidad de ellas.

Se selecciona el tiempo de 30 minutos a 90°C, ya que se obtienen las mejores áreas relativas, aumentando la sensibilidad de los compuestos hidroxilados en el equipo. También pudo ser una opción 45 minutos a 80°C, pero no se seleccionó por preferir una metodología más rápida y con resultados equivalentes.

6.2. Optimización de las variables químicas e hidrodinámicas del proceso de extracción.

6.2.1. Variables químicas.

a) Fase sorbente.

Para realizar este estudio se utilizaron tanto fases en polvo (C18, e-DVB, Oasis HLB y Anión-SR) como fases en lámina (todas las anteriormente mencionadas a excepción de Oasis HLB). Las fases sorbentes seleccionadas en este estudio son las más utilizadas en la extracción de estos analitos, a excepción del anión-SR y e-DVB.

La fase C18 es un adsorbente que se ha utilizado ampliamente para extraer analitos apolares en matrices líquidas. Su estructura química corresponde a una superficie de sílice unida a un grupo octadecil. Para el caso de analitos polares esta fase es insuficiente para determinarlos de manera cuantitativa y además posee la desventaja que es inestable a pH extremos (menores a 2 y mayores a 8) [60].

Por su parte la fase e-DVB presenta en su estructura una gran cantidad de anillos aromáticos. No hay limitaciones de pH como es el caso de los polimeros basados en sílices enlazadas, ya que son estables en todo el intervalo de pH. La ausencia de los grupos silanoles, implica menos interacciones secundarias y la amplia estabilidad de pH de estos polímeros incrementa la flexibilidad de desarrollo de metodologías de preparación de muestra [61]. Es adecuada para la extracción cuantitativa de analitos apolares y de polaridad intermedia.

La tercera fase 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 [62].

Mientras que la fase anión-SR (intercambiador aniónico) está formada de un polímero (estireno-divinilbenceno) con grupos funcionales enlazados con propiedades ácido-base, en este caso aminas cuaternarias [61]. La interacción en la extracción como en la elución de los analitos dependerá de varios factores, como son: el pH de la muestra, las condiciones del medio eluyente y el pKa de los compuestos.

De los datos que se presentan a continuación, se observa que para el caso de la fase aniónica se alcanzan los valores más bajos de recuperación, tanto para cuando se utiliza en polvo y/o lámina, los cuales fluctúan entre 0,4 y 10% (Figura 15 y 16). En esta fase, adicionalmente a las interacciones hidrofóbicas intrínsecas del grupo divinilbenceno (π - π), se presentan interacciones del tipo electrostática entre compuestos con carga opuesta, por lo que para realizar una extracción cuantitativa se debe realizar al menos 2 unidades sobre el pKa de las hormonas (Tabla XX, anexo) donde estarán en su forma disociada y no a pH 7 donde se encuentran en su forma molecular neutra, como se realizó en este estudio.

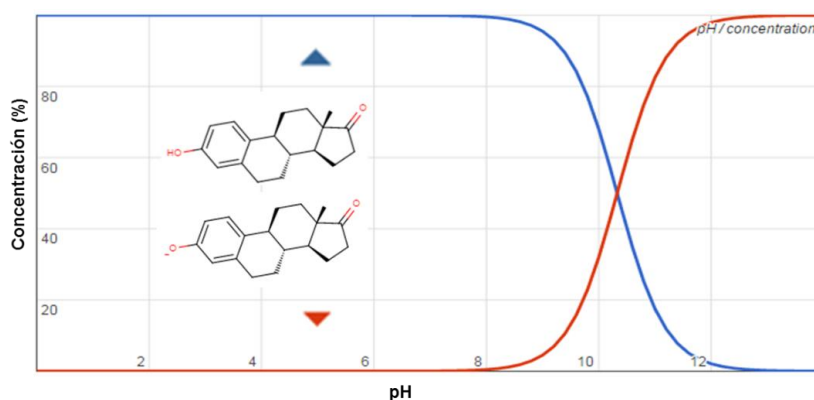


Figura 14. Especies de E1 en intervalo de pH (1 a 14).

Para el caso de la fase e-DVB, ésta presenta las mejores recuperaciones de las 4 fases probadas, las cuales van en un intervalo entre un 42 y 100% cuando es en polvo (Figura 15) y entre 54 y 99% cuando se utiliza en lámina (Figura 16). Las principales interacciones que puede presentar son del tipo π - π entre los anillos aromáticos de la fase y de los analitos cuando se encuentran en su forma molecular neutra (hasta pH 9). Además se caracteriza por extraer de manera cuantitativa analitos de polaridad intermedia y apolares.

Entre las dos fases restantes, Oasis HLB presenta las mejores recuperaciones (Figura 15). Ésto se debe a que al tener un balance hidrofílico-lipofílico es capaz de interactuar con las partes polares y apolares de las hormonas, produciendo una extracción más eficiente que la obtenida con C18 que puede interactuar solo a través de los sitios apolares. Las interacciones que se producen con Oasis son tanto por puentes de hidrógeno, entre el hidrógeno ácido de los compuestos con el oxígeno del carbonilo del grupo lactama, como también afinidad de los sitios apolares de las cadenas hidrocarbonadas.

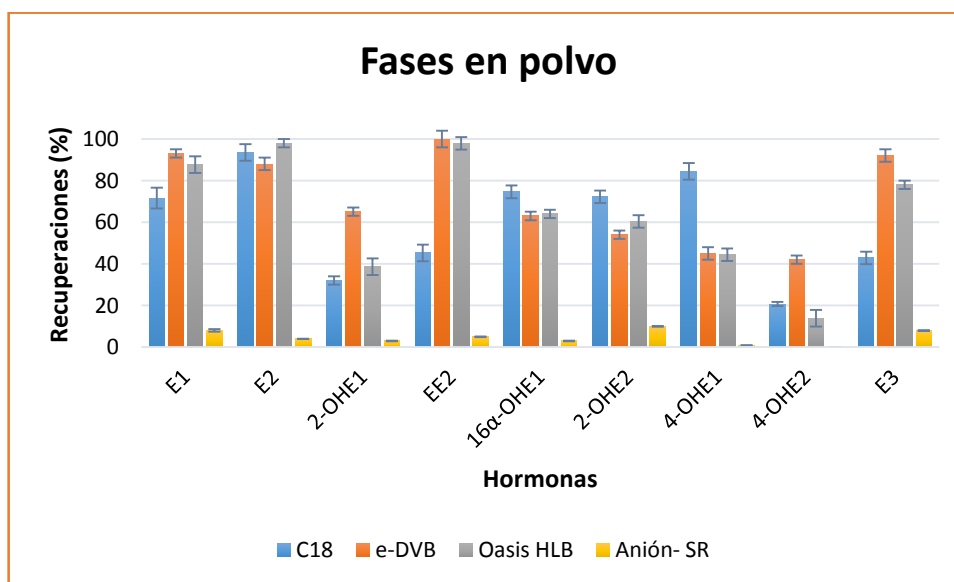


Figura 15. Estudio de recuperación de los analitos en las fases en polvo a pH 7.

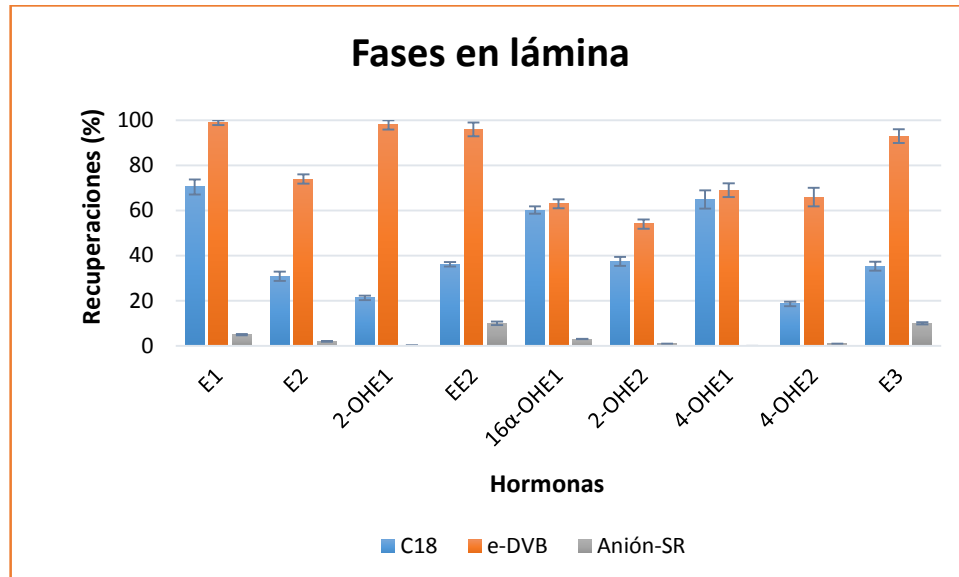


Figura 16. Estudio de recuperación de los analitos en las fases en lámina a pH 7.

Se decidió utilizar la fase e-DVB en lámina, ya que en términos de recuperaciones es igual o mayor en 8 de las 9 hormonas con respecto al polvo (Tabla III). La diferencia puede deberse a que usando el disco plano con la lámina, la extracción es por contacto directo de los analitos sobre la superficie del material sorbente, mientras que en el polvo existe una menor área de fase en contacto, además de la dificultad de atravesar la fibra de vidrio para ingresar a la cavidad del disco, donde se encuentra la fase.

Oasis HLB también pudo haber sido una buena opción para realizar las extracciones de estos analitos, pero se seleccionó la fase e-DVB porque ha sido mucho menos utilizada en técnicas de extracción en fase sólida, entregaría una mayor selectividad respecto a interferencias polares que eventualmente están presentes en la orina y por la facilidad de preparar el dispositivo de extracción, ya que la adhesión de la fase láminar es mucho más sencillo que la utilización de una en polvo.

Tabla III. Resumen de Recuperación (%) de las hormonas con e-DVB en polvo y lámina.

Hormonas	Fase Sorbente e-DVB	
	Polvo	Lámina
E1	93 ± 2	99 ± 1
E2	88 ± 3	74 ± 2
2-OHE1	65 ± 2	98 ± 2
EE2	100 ± 4	96 ± 3
16α-OHE1	63 ± 2	63 ± 2
2-OHE2	54 ± 2	54 ± 2
4-OHE1	45 ± 3	69 ± 3
4-OHE2	42 ± 2	66 ± 4
E3	92 ± 3	93 ± 3

b) pH.

El estudio de este parámetro en la extracción de las hormonas es relevante debido a que no sólo afecta a las propiedades de la fase, sino que también pueden verse afectados los analitos en estudio. Puesto que son ácidos débiles, éstos pueden adquirir diferentes estructuras químicas dependiendo si el pH está sobre o bajo su pKa. Lo que hará que la fase tenga distinta afinidad por alguna de sus estructuras.

Como la orina actúa intrínsecamente como un buffer (por tener altas concentraciones de diferentes sales) [63] se realizó este estudio directamente sobre las muestras. En la Figura 19 y 20 se observa que en el rango de pH de 7 a 9 se mantiene casi constante el área relativa. Pero sobre pH 9 comienza a decrecer hasta llegar, en algunos casos, a no ser detectable a pH 12. Ésto se debe principalmente a que si sabemos que los pKa de las hormonas van en un rango de 9,8 – 10 (Tabla XX, anexo), a pH menores que 10, las hormonas están en su forma molecular neutra (es decir, la forma no disociada), ya que son ácidos muy débiles, mientras que a pH mayores de 10, estarán en su forma disociada (es decir, las bases conjugadas). Las hormonas se convierten en su forma ionizada a pH alto, ya que pierden protones de los grupos hidróxilo. En el caso del pH 3 fue posible observar que el disco estaba más coloreado que en los otros experimentos (Figura 18), lo cual se puede atribuir a que se podría estar extrayendo una mayor cantidad de urobilina (Figura 17), componente encargado de darle el color amarillo a la orina. Ésto provocaría la disminución del área relativa de las hormonas, ya que en ese pH predomina su especie neutra (pKa 4,05 – 4,49). Otra posibilidad a lo cual se puede atribuir lo ocurrido es que la intensidad de color de la forma ácida sea mayor a la básica, es decir, que la absorptividad molar es mayor en este caso.

Se selecciona el pH 7 como el de trabajo, ya que los valores de este parámetro físico-químico en la orina humana se presentan en un intervalo de 4,6 – 8 [64], por lo que el ajuste de éste en las muestras reales será más fácil al ser más cercano.

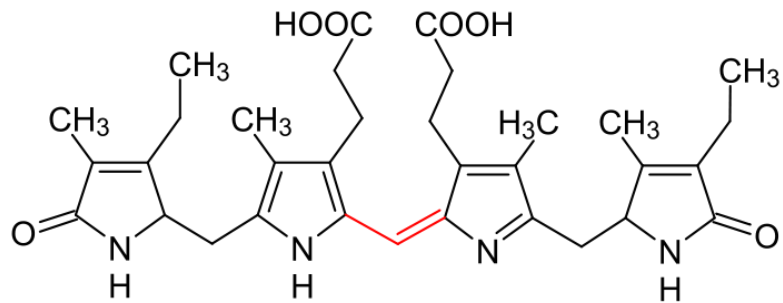


Figura 17. Estructura de la urubilina (producto de degradación de la bilirrubina).

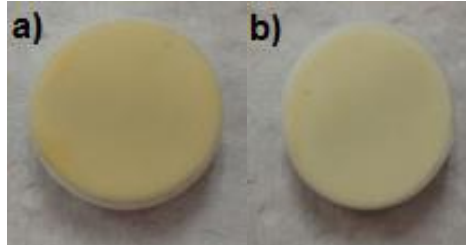


Figura 18. Disco a pH 3 (a) y 7 (b).

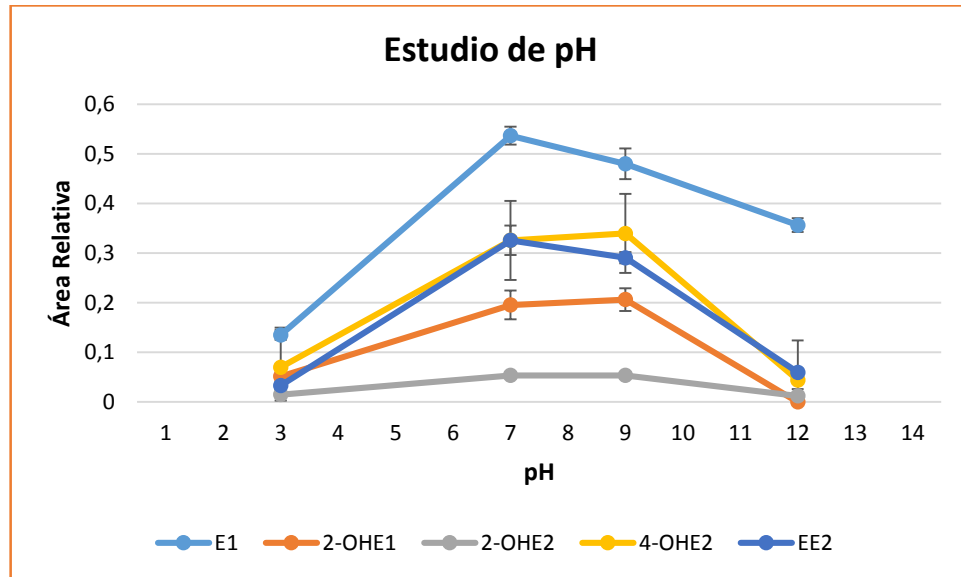


Figura 19. Estudio de pH para la extracción de E1, 2-OHE1, 2-OHE2, 4-OHE2 y EE2, en disco con lámina de e-DVB.

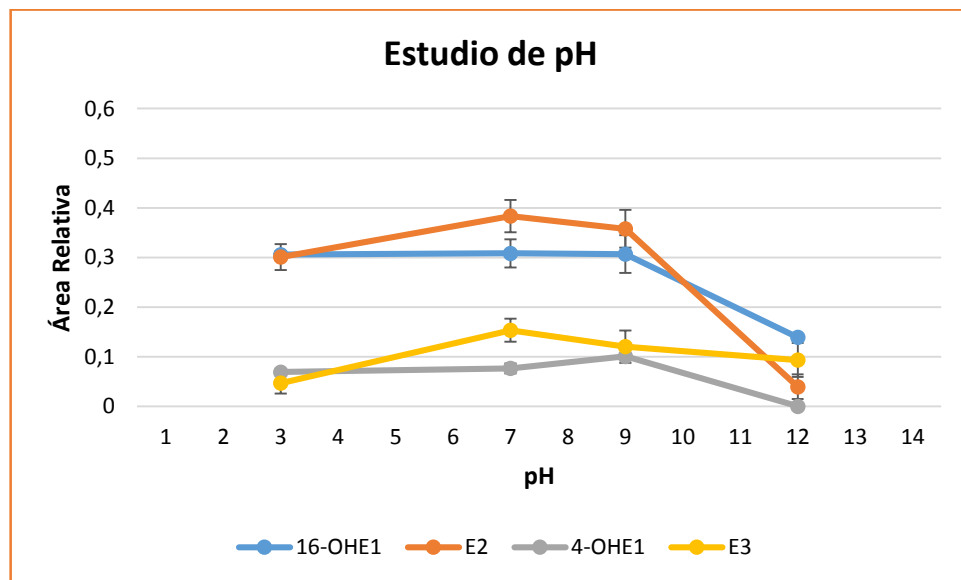


Figura 20. Estudio de pH para la extracción de 16 α -OHE1, E2, 4-OHE1 Y E3, en disco con lámina de e-DVB.

c) Desorción y volumen de disolvente.

Una vez retenidos los analitos en la fase sorbente es necesario eluirlos en lo posible con bajos volúmenes de disolvente (para favorecer una metodología verde), de manera rápida y cuantitativa. Para esto se usó metanol como disolvente para eluir los analitos desde la fase e-DVB. Se estudió el tiempo de desorción y el volumen de éste.

Cuando se utilizó 10 mL de metanol en 1 sola etapa se observa que las mejores áreas relativas de las hormonas son a 15 minutos a excepción de tres de ellas (E1, 16 α -OHE1 y EE2), que alcanzan su máximo a los 20 minutos (Figura 21).

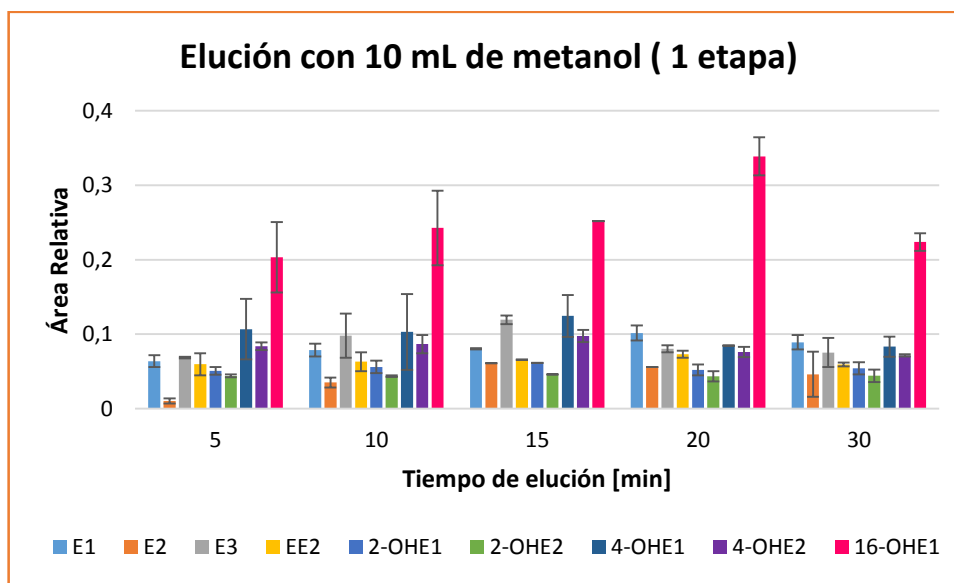


Figura 21. Desorción de las 9 hormonas en estudio con 10 mL de metanol en 1 etapa de 5, 10, 15, 20 y 30 minutos.

Para mejorar el proceso de desorción se comparó 1 etapa por 5, 10 y 15 minutos con 5 mL de metanol (Figura 22) y 2 etapas en los mismos tiempos y volumen de solvente (Figura 23). Se observó que en 1 etapa por 15 minutos se obtienen áreas relativas similares a cuando se realiza por el mismo tiempo pero en 2 etapas. Es por ello que se selecciona la elución en 1 sola etapa por 15 minutos, disminuyendo además la cantidad de solvente a utilizar favoreciendo que la metodología sea verde.

Cabe destacar, que el uso de un solvente con alto poder de elución, como el metanol, permite en un periodo corto de tiempo vencer las fuerzas intermoleculares que mantienen al analito unido a la fase, debido a su característica de disolvente polar prótico, el cual posee la habilidad de formar puentes de hidrógeno con los compuestos a eluir [65]. Además de ser miscible con el agua lo cual es muy importante, ya que no dificulta la entrada de éste para extraer a los analitos.

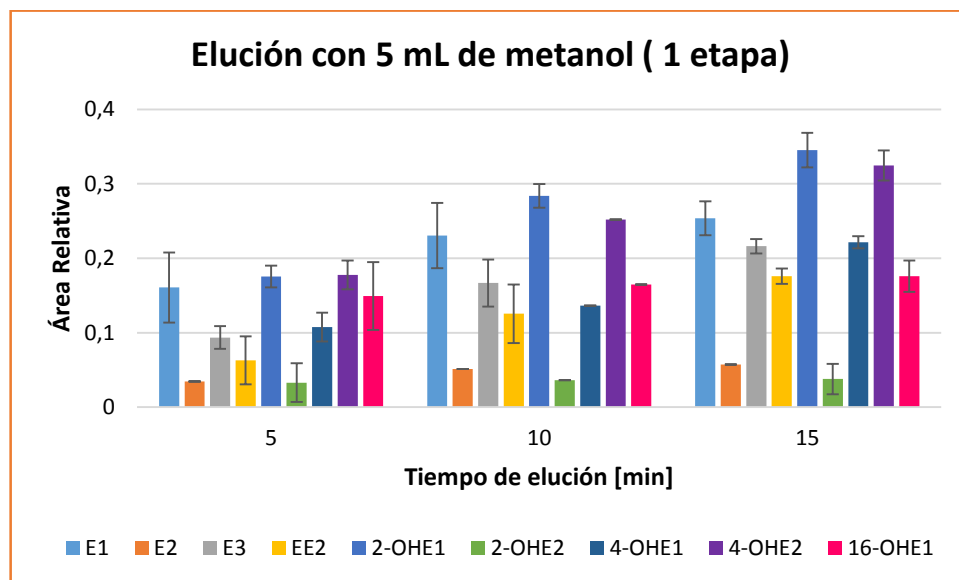


Figura 22. Desorción de las 9 hormonas en estudio con 5 mL de metanol en 1 etapa de 5, 10 y 15 minutos.

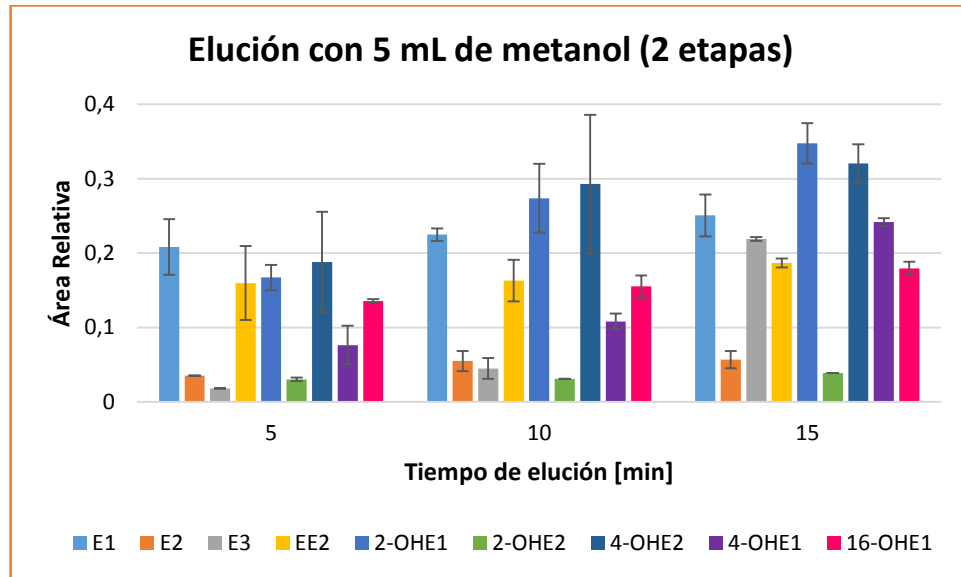


Figura 23. Desorción de las 9 hormonas en estudio con 5 mL de metanol en 2 etapa de 5, 10 y 15 minutos.

6.2.2. Variables Hidrodinámicas.

a) Tiempo de extracción y volumen de muestra.

El perfil de extracción fue obtenido en un intervalo de tiempo de 15 a 150 minutos, para un volumen de 2 mL de orina en 25 mL totales.

Como se puede observar en las Figuras 24 y 25 se alcanzan las mayores áreas relativas de la totalidad de las hormonas en 60 minutos, para luego mantenerse constante o en algunos casos decrecer hasta 150 minutos. Al aumentar el tiempo de extracción se pretende que la totalidad de los analitos presentes en la muestra lleguen a la fase sorbente.

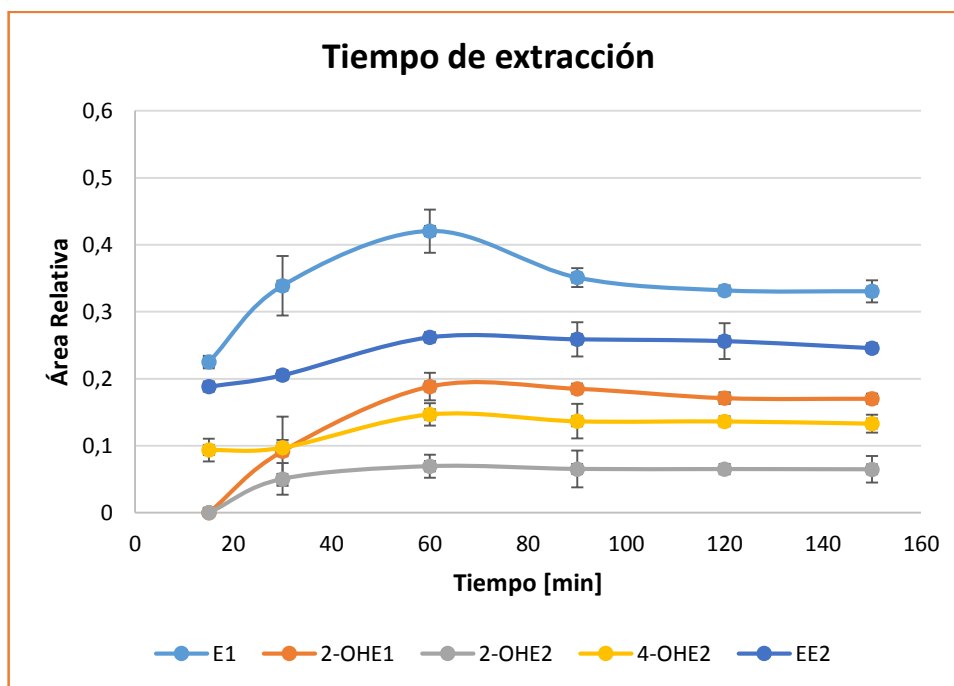


Figura 24. Perfil de extracción a diferentes tiempo de E1, 2-OHE1, 2-OHE2, 4-OHE2 y EE2.

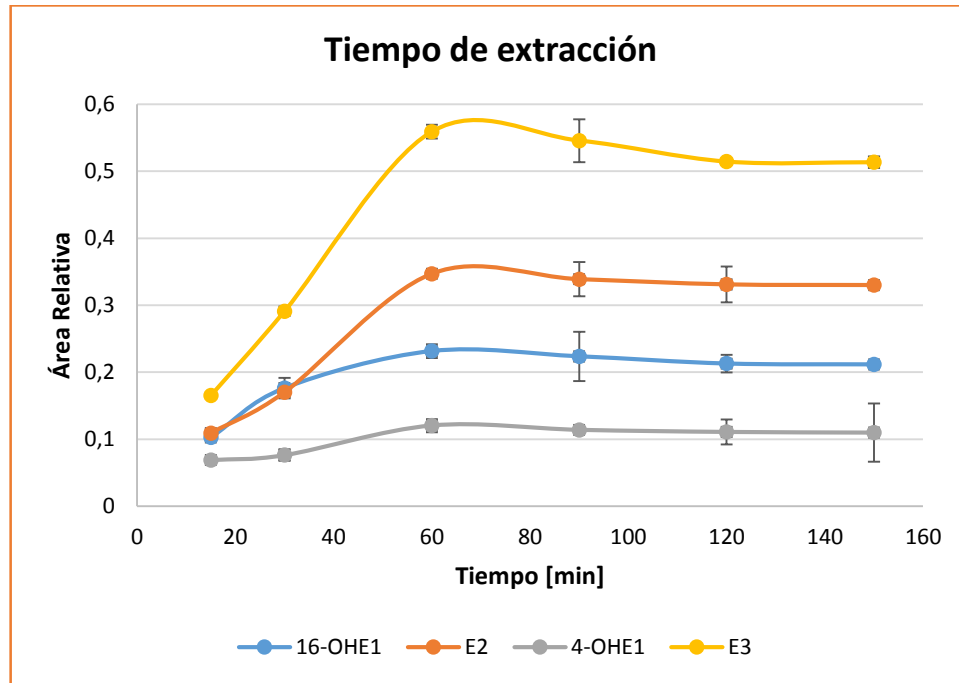


Figura 25. Perfil de extracción a diferentes tiempo para 16 α -OHE1, E2, 4-OHE1 y E3.

Respecto al volumen de muestra se puede observar que a medida que disminuimos la cantidad de orina pura en solución (25 a 2 mL) se incrementan las áreas relativas (Figura 27), debido a que entre más diluida se encuentre menor será el efecto matriz.

Para un volumen de 25 mL de orina no fue posible detectar los analitos, debido a que el disco se teñía completamente de amarillo (Figura 26) suponiendo que lo que mayoritariamente se estaría extrayendo sería urobilina, ya que posee un log K_o/w muy similares a las hormonas (Tabla XX, anexo), provocando una posible competencia al momento de la extracción. Además de consumir derivatizante por tener hidrógenos activos (grupos -OH) para ser sililados.

Se utilizó un volumen total de 25 mL (2 mL de orina y 23 mL de agua ultra pura), ya que había sido probado en la metodología implementada previamente

para 3 de las 9 hormonas en agua [49]. Un aumento en el volumen, manteniendo constante la concentración de los analitos en solución, provocaría que el equilibrio se deba alcanzar en un mayor tiempo. Ésto se debe a que al aumentarlo se incrementa el espacio donde los analitos pueden estar presentes, adquiriendo un mayor tiempo de residencia en la fase acuosa.



Figura 26. Disco con e-DVB antes y después de la extracción con un volumen de 25 mL de orina, respectivamente.

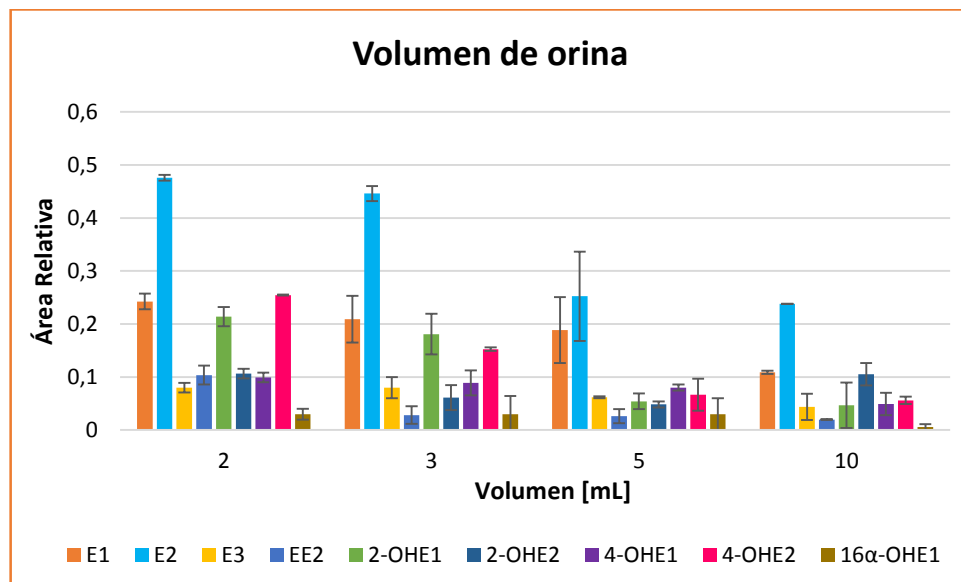


Figura 27. Estudio de volumen de orina para las 9 hormonas.

b) Velocidad de agitación.

La velocidad de rotación del disco es una variable muy importante en el proceso de extracción, ya que sin la ayuda de un dispositivo que produzca agitación, el proceso dependerá principalmente de la difusión del analito desde la fase acuosa lo que puede realizarse en un largo período de tiempo. A mayor velocidad, el equilibrio de partición se alcanza más rápido, dado que la velocidad de transferencia del analito hacia la fase aumenta, disminuyendo la capa estacionaria de agua que se encuentra presente entre la solución acuosa y la fase sorbente. Se estudió velocidades de rotación entre 500 y 3000 rpm, obteniendo una mayor velocidad de transferencia de masa a 2500 y 3000 rpm dependiendo del analito (Figura 29 y 30).

Como se quiere realizar una extracción en conjunto de las 9 hormonas se decidió utilizar para la metodología 3000 rpm, ya que las hormonas que alcanzaban el máximo de área a 2500 rpm pasado ese valor su área permanece constante, por lo que no afecta la extracción de ellas. A 3000 rpm se logró un flujo más turbulento hacia el disco (Figura 28), lo que aumenta la movilidad de los analitos en solución y a la vez disminuye el espesor de la capa estacionaria, aumentando la extracción y trayendo como consecuencia una mayor recuperación de los analitos.



Figura 28. Proceso de extracción en RDSE a 3000 rpm.

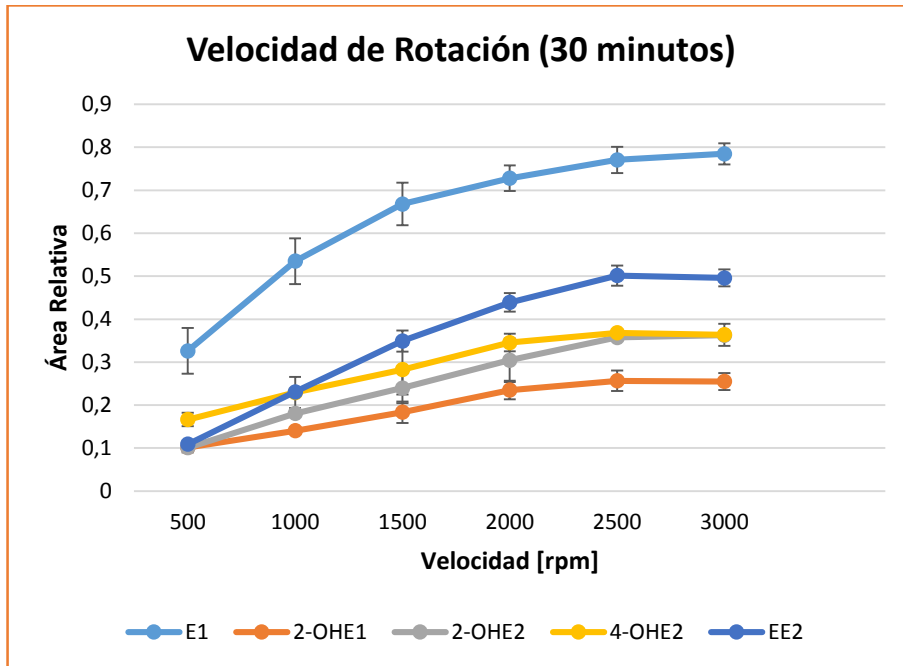


Figura 29. Estudio de velocidad de rotación del disco para la extracción de E1, 2-OHE1, 2-OHE2, 4-OHE2 y EE2.

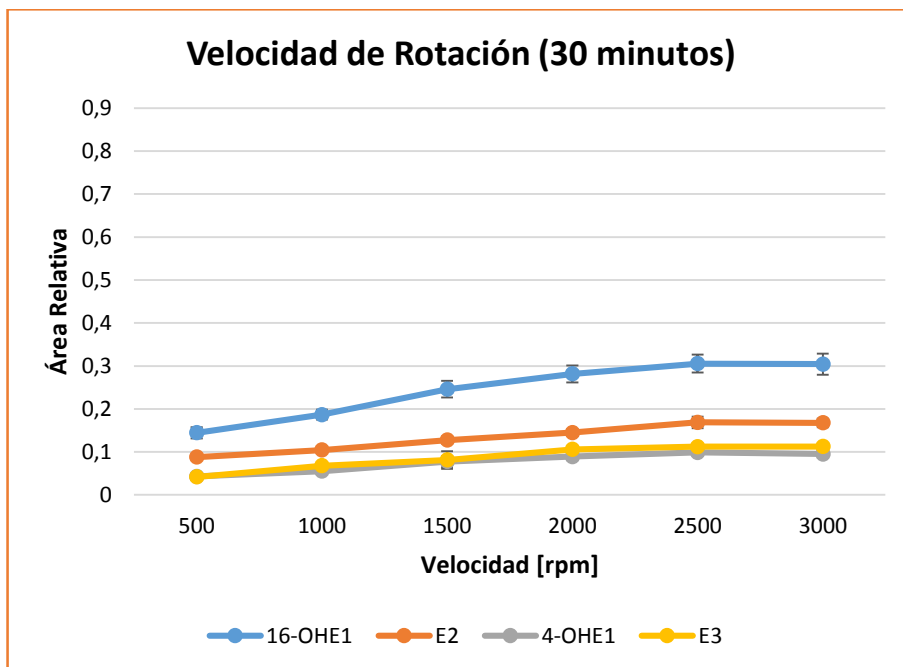


Figura 30. Estudio de velocidad de rotación del disco para la extracción de 16α-OHE1, E2, 4-OHE1 y E3.

6.3. “Clean up”.

Para mejorar las recuperaciones de las hormonas, después del proceso de optimización, se realizaron diferentes modalidades de “clean up”, con el objetivo de eliminar la urobilina (pigmento amarillo), la cual sigue presente pese a disminuir el volumen de muestra de orina en solución.

En primer lugar se intentó retirar la urobilina desde la matriz haciendo una extracción previa, utilizando primeramente el disco rotatorio con una fase en lámina Anión-SR, o bien agregando esta fase en polvo en un disco con cavidad. También se intentó agregar esta fase en polvo al seno de la muestra en un proceso simultáneo de extracción en el disco.

Cuando se utilizó la modalidad de pre extracción con la fase en lámina Anión-SR soportada en el disco plano, las recuperaciones fueron en un intervalo de 10 a 29%, siendo en algunos casos bastante bajas (Figura 32) . Lo mismo ocurre al utilizar esta misma fase pero en polvo soportado en un disco con cavidad, obteniéndose recuperaciones en un intervalo de 12 a 43%, con la diferencia que estos porcentajes corresponden a 4 de 9 hormonas, las 5 restantes no fueron detectadas (Figura 32). Estos bajos porcentajes ocurren porque la fase aniónica también puede extraer parte de los analitos en el momento de la limpieza, además de la pérdida de muestra que se genera al retirar el disco.

Para la utilización de una etapa de limpieza simultánea a la extracción, utilizando la fase aniónica en polvo, las recuperaciones fueron en un intervalo de 15 a 41% correspondiendo nuevamente a 4 de las 9 hormonas (Figura 32). La utilización de un “clean up” simultáneo no fue lo más óptimo, además de no recuperar la totalidad de los analitos, la fase de limpieza continuó hasta el final

de la extracción (Figura 31), ya que se depositó sobre el e-DVB, teniendo que ser filtrado el eluato para poder ser evaporado y derivatizado.

La fase aniónica fue utilizada como “clean up” por no retener significativamente las hormonas en el estudio de fases, ya que al ser un copolímero de estireno-divinilbenceno modificada con grupos de amina cuaternaria debe tener otro pH para poder retenerlas de manera cuantitativa (sobre el valor de pKa de los analitos).

Otra modalidad de “clean up” utilizado fue de post extracción [56], [57], llevando a cabo la limpieza en la fase, después del proceso de extracción de los analitos. Éste consiste en la utilización de una solución 2:3 de metanol- agua, al ser aplicado las recuperaciones fueron en un intervalo de 16 a 43% (Figura 32).

Con el objetivo de mejorar las recuperaciones se disminuyó la cantidad de metanol en solución (1:4 de metanol-agua), debido a que si disminuimos la cantidad de solvente orgánico se evitará que comience la co-elución de los analitos. Con esta solución se observaron muy buenas recuperaciones para una matriz tan compleja como la orina, siendo la más baja para 2-OHE2 (33%) y la más alta para EE2 (49%) (Figura 32).



Figura 31. Comparación de turbidez cuando se realiza el “clean up” simultáneamente a la extracción con la fase aniónica en polvo frente a la modalidad post extracción con 1:4 de metanol-agua.

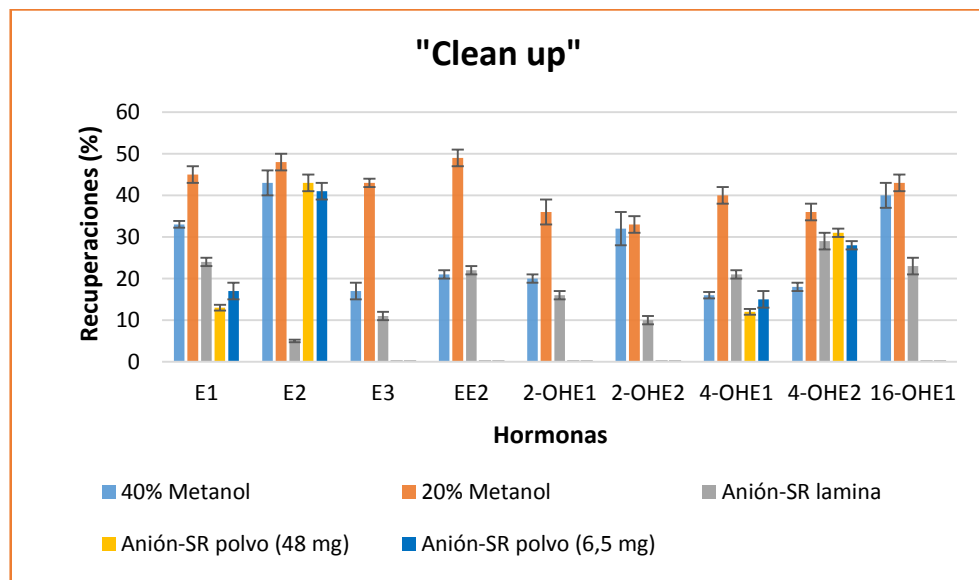


Figura 32. Estudio de diferentes procesos de “clean up” para las 9 hormonas.

Para saber si efectivamente 20% de metanol (1:4 metanol-agua) era lo más adecuado se realizó un estudio con diferentes cantidades de metanol, en un intervalo de 10 a 50% (Figura 33). Se observó que con 10% se obtenían también buenas recuperaciones pero aún así el 20% fue un poco mejor en 6 de las 9 hormonas.

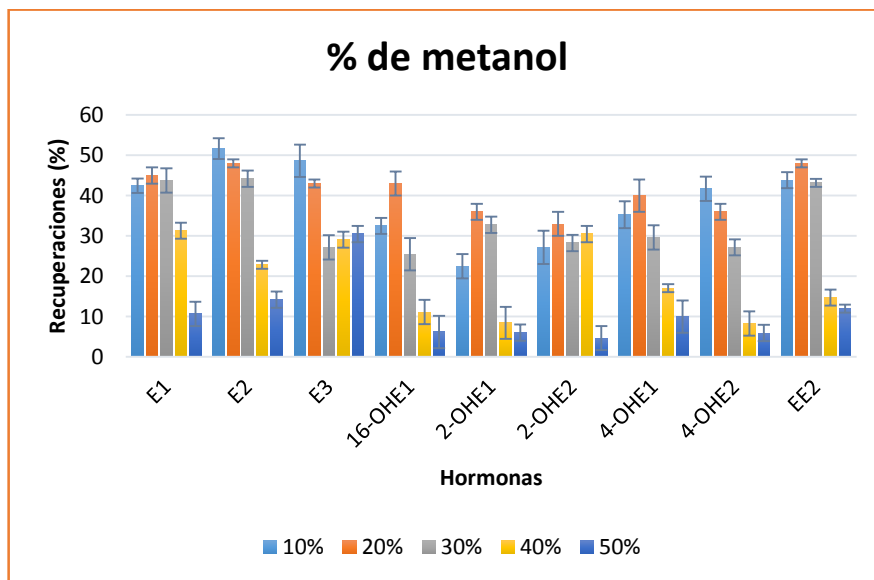


Figura 33. Estudio del porcentaje de metanol utilizado en el proceso de “Clean up” post extracción.

Tabla IV. Resumen de las recuperaciones absolutas de las hormonas sin y con etapa de limpieza.

Hormonas	Recuperaciones	
	absolutas (%) sin “clean up”	absolutas (%) con “clean up” 20% metanol
E1	20 ± 1	45 ± 2
E2	20 ± 2	48 ± 1
2-OHE1	14 ± 1	36 ± 2
EE2	25 ± 1	49 ± 1
16α-OHE1	27 ± 3	43 ± 3
2-OHE2	11 ± 1	33 ± 3
4-OHE1	18 ± 1	40 ± 4
4-OHE2	12 ± 1	36 ± 2
E3	10 ± 1	43 ± 1

6.4. Reutilización de la fase.

La reutilización de la fase sorbente es muy importante al momento de desarrollar una metodología analítica de extracción, ya que permite disminuir los costos de ella cuando se usan fases que muchas veces pueden ser costosas.

Como se puede observar en la Figura 34 y 35, la fase e-DVB en un mismo disco puede ser sometidas a 2 ciclos de sorción y desorción, con una desviación estándar relativa de 5 - 8% (n=6) para las 9 hormonas, para luego decrecer sus áreas. Además, se observó que para el cuarto ciclo la fase se desprende del disco plano, por lo que se procedió a ser adherida nuevamente, pero aún así las recuperaciones decrecen hasta llegar en algunos casos a cero.

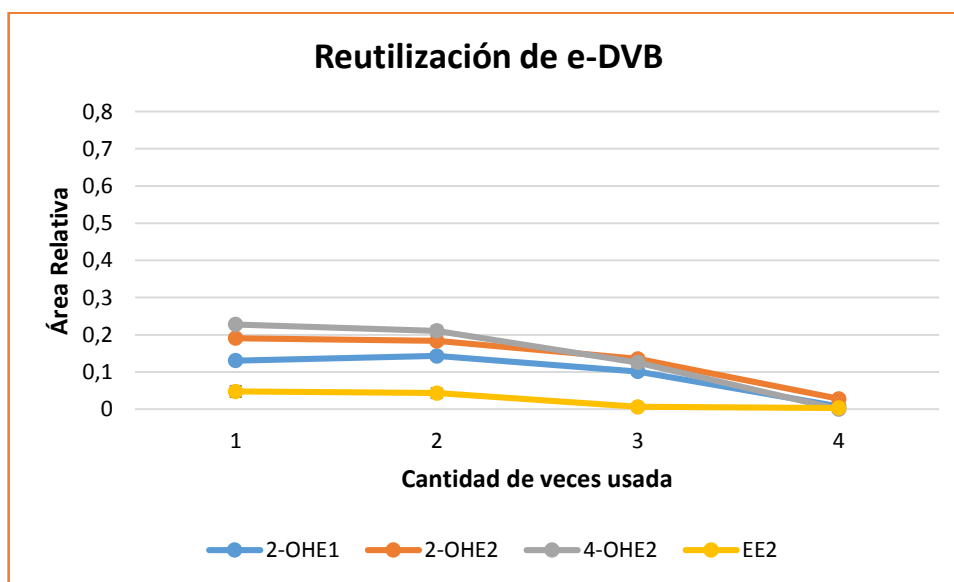


Figura 34. Estudio de reutilización de la fase e-DVB para 2-OHE1, 2-OHE2, 4-OHE2 y EE2.

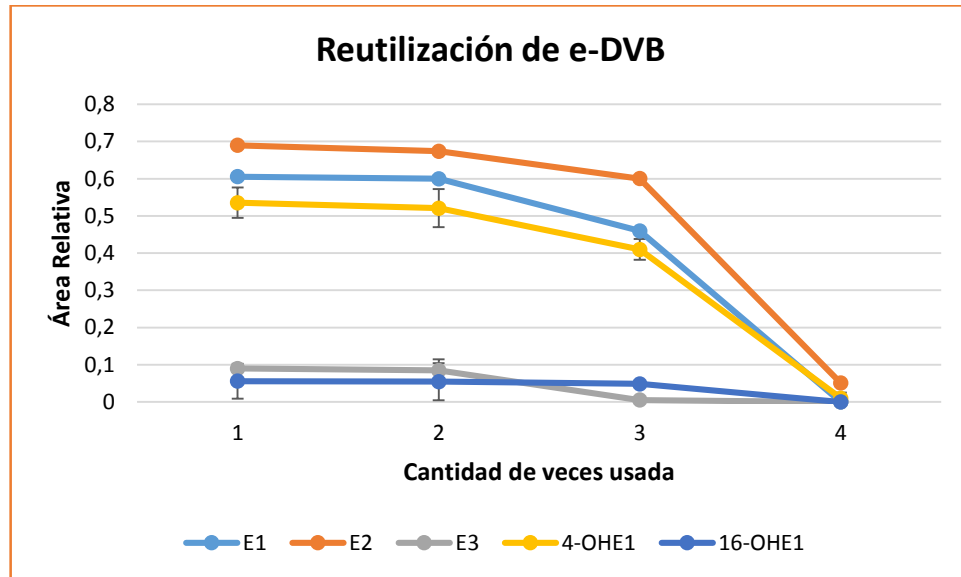


Figura 35. Estudio de reutilización de la fase e-DVB para E1, E2, E3, 4-OHE1 y 16 α -OHE1.

6.5. Validación del método.

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

Los valores de exactitud del método fueron obtenidos en orina de pre puber enriquecidas con $0,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, a través de sus recuperaciones relativas al estándar surrogate, usando un disco diferente para cada muestra. Éstas oscilaron entre 67 - 98% con desviaciones estándar relativa interdisco (RSD) entre 3 - 8%. Se determinó también la precisión mediante el uso de 6 discos (al mismo tiempo) para la extracción a una concentración de $0,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n = 6$). La RSD intradisco en estas condiciones varió entre 3 - 7 %.

Tabla V. Parámetros analíticos del método.

Hormona	Linealidad (r)	Exactitud (%)	Precisión (% RSD)	LOD [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	LOQ [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
E1	0,9956	94	8	0,24	0,73
E2	0,9977	97	4	0,39	1,18
2-OHE1	0,9924	72	4	0,16	0,50
EE2	0,9904	98	2	0,21	0,64
16α-OHE1	0,9967	86	5	0,13	0,38
2-OHE2	0,9911	67	3	0,30	0,92
4-OHE1	0,9888	78	3	0,71	2,15
4-OHE2	0,9766	71	5	0,057	0,17
E3	0,9933	85	2	0,14	0,42

6.6. Optimización de la hidrólisis enzimática.

Los estrógenos pueden ser excretados en la orina como conjugados de glucurónidos o sulfatos. Por lo tanto, la determinación de la cantidad total de ellos requiere la aplicación de una etapa de hidrólisis antes de la realización de la metodología analítica. Para la optimización de la hidrólisis enzimática se utilizó orina de una mujer en edad fértil, ya que en ésta podríamos encontrar alguna de las hormonas en estudio y realizar la desconjugación de ellas.

Al aplicar las dos metodologías, se observó que cuando la muestra se expuso durante 20 horas a 37°C se pudo detectar la presencia de 5 de 9 de las hormonas en estudio (tabla VI), incluyendo la 4-OHE1 que en 3 horas a 55°C no se detecta. Además en el caso de E1 y EE2 la cantidad de conjugado que se obtienen es levemente mayor en un tiempo más prolongado, es por ello que se selecciona la metodología de 20 horas a 37°C para trabajar.

La principal limitación de este procedimiento es el tiempo requerido para la realización de la hidrólisis, pero como es un procedimiento que no necesita mayor supervisión perfectamente se puede dejar incubando toda la noche.

Tabla VI. Comparación de metodologías de hidrólisis enzimática.

Concentración [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]			
Hormonas	Sin Hidrólisis	20 h, 37°C	3 h, 55°C
E1	3,8 \pm 0,3	6,9 \pm 0,6	4,3 \pm 0,8
E2	9,5 \pm 0,1	10,5 \pm 0,1	10,7 \pm 0,3
EE2	3,7 \pm 0,1	7,3 \pm 0,3	5,8 \pm 0,1
E3	1,6 \pm 0,2	2,7 \pm 0,1	2,1 \pm 0,2
4-OHE1	-	5,3 \pm 0,3	-

6.7. Eco-escala analítica.

La eco-escala analítica es un nuevo enfoque integral propuesto por Galuszka et al en 2012 [58] que busca evaluar cuán verde es una metodología analítica, basándose en la asignación de puntos de penalización a los parámetros de un proceso analítico. Según esta escala, un análisis verde ideal tiene un valor de 100.

Para cada parámetro del procedimiento analítico (cantidad de reactivo, peligro, energía y desechos) se asignan puntos de penalización según 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.

Según la puntuación obtenida se tiene que la metodología verde es:

Eco-escala > 75 excelente

Eco-escala > 50 aceptable

Eco-escala < 50 inadecuada

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

Acondicionamiento del disco: La fase e-DVB se acondicionó de manera secuencial con 5 mL de acetona, 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 insertó dentro del vial con 2 mL de orina y 23 mL de agua ultra pura (con una concentración final de $0,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), se agitó a 3000 rpm por 60 minutos a temperatura ambiente.

“Clean up”: Se realizó con 5 mL de una solución 1:4 de metanol-agua por 5 minutos a 1800 rpm.

Desorción: La desorción se realizó con metanol por 15 minutos (1 etapa x 5 mL) a 1800 rpm. Los extractos fueron evaporados a sequedad con nitrógeno a temperatura ambiente.

Derivatización: Para la derivatización de los analitos previo a la determinación por GC-MS, se reconstituyó con 50 μL de piridina y 50 μL de N-metil-N-(trimetilsilil)- trifluoroacetamida (MSTFA) a 90°C por 30 minutos.

Hidrólisis enzimática: A 2 mL de orina se le agregó 2 mL del buffer de hidrólisis y se incubó por 20 horas a 37°C . El buffer utilizado se preparó a partir de 50 mg de L-Ácido ascórbico, 100 μL de enzima β -glucuronidasa, tipo HP-2 de *Hélix Pomatia* y 10 mL de $0,15 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de buffer de acetato de sodio (pH 5,2).

Tabla VII. Puntos de penalización de la metodología.

Reactivos, energía y desechos	Puntos de penalización
Metanol	6
MSTFA	2
Piridina	4
Enzima β-glucuronidasa	2
GC-MS	2
Emisiones de vapores y gases al aire	3
Total	19

Eco-escala analítica = 81

El resultado final fue de 81 puntos, por lo que el método propuesto puede ser considerado como una metodología verde excelente, lo que indica que la microextracción por sorción en disco rotatorio (RDSE) es una tecnología ecológica de acuerdo a 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 (μ L).

6.8. Muestra real.

Una vez optimizada y validada la metodología analítica, es necesario demostrar si con ella es posible encontrar alguna de las 9 hormonas en muestras de orina.

Las muestras fueron sometidas al procedimiento de extracción y desorción usando las condiciones óptimas:

Tabla VIII. Condiciones óptimas para la metodología de extracción.

Condiciones	
Fase	e-DVB
Volumen de muestra (sin hidrólisis)	2 mL de orina en 23 mL de agua milli-Q
Volumen de muestra (con hidrólisis)	4 mL (2 mL de orina y 2 mL del buffer de hidrólisis) en 21 mL de agua ultra pura
Tiempo de extracción	60 minutos
pH	7
Velocidad de rotación	3000 rpm
Desorción	5 mL de metanol por 15 minutos
Clean up post extracción	5 mL de una solución al 20% de metanol
Hidrólisis	20 horas a 37°C

Las muestras fueron sometidas a extracción con hidrólisis y sin hidrólisis con la finalidad de obtener la cantidad total de estrógenos libres y conjugados. Las

concentraciones de las hormonas encontradas en las diferentes muestras se pueden observar en las tablas IX a la XVII.

Tabla IX. Resultados muestra real A (Mujer, 26 años).

Hormonas	Sin hidrólisis [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Con Hidrólisis [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Conjugado [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
E1	3,8 \pm 0,3	6,9 \pm 0,6	3,1
E2	9,5 \pm 0,1	10,5 \pm 0,1	1,0
2-OHE1	n.d	n.d	-
EE2	3,7 \pm 0,1	7,3 \pm 0,3	3,6
16 α -OHE1	n.d	n.d	-
2-OHE2	n.d	n.d	-
4-OHE1	n.d	5,3 \pm 0,3	5,3
4-OHE2	n.d	n.d	-
E3	1,6 \pm 0,2	2,7 \pm 0,1	1,1

n.d: no detectado.

Tabla X. Resultados muestra real B (Hombre, 29 años).

Hormonas	Sin hidrólisis [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Con Hidrólisis [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Conjugado [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
E1	2,0 \pm 0,1	3,9 \pm 0,2	1,9
E2	n.d	2,8 \pm 0,1	2,8
2-OHE1	n.d	n.d	-
EE2	n.d	n.d	-
16 α -OHE1	n.d	n.d	-
2-OHE2	n.d	n.d	-
4-OHE1	n.d	n.d	-
4-OHE2	n.d	n.d	-
E3	1,3 \pm 0,1	1,6 \pm 0,03	0,3

n.d: no detectado.

Tabla XI. Resultados muestra real C (Mujer, 50 años).

Hormonas	Sin hidrólisis [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Con Hidrólisis [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Conjugado [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
E1	6,0 \pm 0,3	11,6 \pm 0,5	5,6
E2	n.d	6,8 \pm 0,2	6,8
2-OHE1	n.d	9,3 \pm 0,7	9,3
EE2	n.d	n.d	-
16α-OHE1	n.d	n.d	-
2-OHE2	n.d	n.d	-
4-OHE1	n.d	n.d	-
4-OHE2	n.d	n.d	-
E3	1,3 \pm 0,02	2,5 \pm 0,04	1,2

n.d: no detectado.

Tabla XII. Resultado muestra real D (Mujer, 32 años, 24 semanas de embarazo).

Hormonas	Sin hidrólisis [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Con Hidrólisis [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Conjugado [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
E1	123 \pm 6	211 \pm 14	88
E2	58 \pm 2	109 \pm 8	51
2-OHE1	24 \pm 1	92 \pm 3	68
EE2	n.d	n.d	-
16α-OHE1	106 \pm 7	251 \pm 13	145
2-OHE2	n.d	n.d	-
4-OHE1	n.d	n.d	-
4-OHE2	38 \pm 2	154 \pm 12	116
E3	366 \pm 24	709 \pm 53	343

n.d: no detectado.

Tabla XIII. Resultados muestra real E (Mujer, 26 años).

Hormonas	Sin hidrólisis [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Con Hidrólisis [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Conjugado [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
E1	7,7 \pm 0,5	12,5 \pm 2	4,8
E2	6,9 \pm 0,03	14,8 \pm 0,7	7,9
2-OHE1	n.d	5,7 \pm 0,4	5,7
EE2	2,6 \pm 0,4	3,3 \pm 0,1	0,7
16α-OHE1	n.d	n.d	-
2-OHE2	1,8 \pm 0,1	1,2 \pm 0,02	0,6
4-OHE1	n.d	n.d	-
4-OHE2	n.d	n.d	-
E3	n.d	n.d	-

n.d: no detectado.

Tabla XIV. Resultados muestra real F (Mujer, 59 años, menopausia).

Hormonas	Sin hidrólisis [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Con Hidrólisis [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Conjugado [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
E1	2,8 \pm 0,1	6,5 \pm 0,1	3,7
E2	n.d	n.d	-
2-OHE1	n.d	n.d	-
EE2	n.d	n.d	-
16α-OHE1	n.d	n.d	-
2-OHE2	n.d	n.d	-
4-OHE1	2,7 \pm 0,3	9,7 \pm 0,1	7
4-OHE2	n.d	n.d	-
E3	0,5 \pm 0,03	1,1 \pm 0,02	0,6

n.d: no detectado.

Tabla XV. Resultados muestra real G (Hombre, 46 años, paciente que tuvo cáncer testicular).

Hormonas	Sin hidrólisis [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Con Hidrólisis [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Conjugado [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
E1	7,2 \pm 0,3	9,3 \pm 0,2	2,1
E2	2,5 \pm 0,1	5,7 \pm 0,4	3,2
2-OHE1	n.d	n.d	-
EE2	n.d	n.d	-
16 α -OHE1	n.d	n.d	-
2-OHE2	n.d	n.d	-
4-OHE1	2,6 \pm 0,2	5,0 \pm 0,4	2,4
4-OHE2	N.D	2,3 \pm 0,1	2,3
E3	0,9 \pm 0,03	3,1 \pm 0,1	2,2

n.d: no detectado.

Tabla XVI. Resultados muestra real H (Hombre, 46 años).

Hormonas	Sin hidrólisis [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Con Hidrólisis [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Conjugado [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
E1	7,5 \pm 0,3	10,1 \pm 0,3	2,6
E2	n.d	2,1 \pm 0,1	2,1
2-OHE1	n.d	n.d	-
EE2	n.d	n.d	-
16 α -OHE1	3,0 \pm 0,1	6,8 \pm 0,5	3,8
2-OHE2	n.d	n.d	-
4-OHE1	n.d	n.d	-
4-OHE2	n.d	n.d	-
E3	n.d	n.d	-

n.d: no detectado

Además se realizó una novena muestra, a la cual se le realizó la hidrólisis y se fortificó a un nivel de concentración de 10 [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$] de las hormonas, ésto con el objetivo de ver la recuperación en una muestra real (Tabla XVII).

Tabla XVII. Resultados muestra real I (Hombre, 27 años).

Hormonas	Sin hidrólisis [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Con Hidrólisis [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Conjugado [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]
E1	3,7 \pm 0,3	5,5 \pm 0,4	1,8
E2	n.d	3,2 \pm 0,1	3,2
2-OHE1	n.d	n.d	-
EE2	n.d	n.d	-
16 α -OHE1	5,4 \pm 0,3	7,3 \pm 0,3	1,9
2-OHE2	n.d	n.d	-
4-OHE1	1,2 \pm 0,04	3,4 \pm 0,1	2,2
4-OHE2	n.d	n.d	-
E3	n.d	1,2 \pm 0,02	1,2

n.d: no detectado.

Tabla XVIII. Resultados de la muestra I fortificada con 10 [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$].

Hormonas	Concentración [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Recuperación (%)	%RSD
E1	13,0 \pm 0,1	130	1,4
E2	9,8 \pm 0,2	98	2
2-OHE1	7,7 \pm 0,1	77	1,3
EE2	9,9 \pm 0,3	99	3
16 α -OHE1	13,7 \pm 0,2	137	2,2
2-OHE2	6,5 \pm 0,2	65	3,7
4-OHE1	8,6 \pm 0,1	86	0,9
4-OHE2	6,8 \pm 0,2	68	3,1
E3	8,2 \pm 0,3	82	3,5



Figura 36. Foto de 5 de las 9 muestras reales de orina.

De los datos obtenidos fue posible detectar la presencia de las 9 hormonas en concentraciones similares a las reportadas previamente [13], ésto se debe a la gran cantidad de muestras que se analizaron (Figura 36). Los estrógenos pueden ser excretados en diferentes cantidades dependiendo del género, edad, estado de salud, la dieta o el embarazo, como se muestra en este estudio.

Es importante destacar que la concentración urinaria de los analitos puede variar durante todo el día, por lo que la medición de una muestra de orina en la mañana puede no ser representativa para un diagnóstico o monitoreo. La creatinina es un buen índice del volumen del filtrado glomerular (volumen de orina filtrado por unidad de tiempo), por lo que la normalización por medio de ella es el método más ampliamente utilizado. Esta proteína no se modifica por la dieta, pero sus valores se pueden alterar con la edad y el ejercicio físico intenso [66], [67].

Otra forma de compensar las fluctuaciones en la concentración de los estrógenos es mediante la recolección de muestra por 24 horas (que se realiza en las investigaciones clínicas y el diagnóstico o la detección de algunas

enfermedades) [20], pero su principal inconveniente es utilizar mucho tiempo en la recolección de la muestra, lo que puede ser incomodo en el desarrollo de las actividades diarias, sobre todo laborales.

Dentro de las muestras reales se destaca la D, correspondiente a una mujer embarazada de 6 meses. La excreción de estriol es alrededor de 230 veces mayor que en la muestra A (mujer en edad fértil no embarazada). Generalmente, un aumento de esta hormona en el embarazo se debe principalmente a la placenta. La determinación de estos estrógenos en este tipo de muestras es relativamente fácil. Aun así, el método es adecuado para la determinación de bajos niveles.

6.9. Comparación con otras metodologías.

La tabla XIX compara los parámetros analíticos del método desarrollado para la determinación de hormonas en orina con otros, basados en tecnologías alternativas de preparación de muestra.

Los métodos basados en SPE han utilizado fases sorbentes como C18 y Oasis HLB. Estos métodos se clasifican como metodologías verdes excelentes o adecuadas, debido a que su puntuación de eco-escala va de los 79 a 62. Los límites de detección son bastante similares a los obtenidos en esta tesis, a excepción de la que utiliza C18, los que son significativamente más altos, fluctuando entre 2,7 a 8,3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. La exactitud de estos métodos, considerando el porcentaje de recuperación, son levemente superiores, pero se debe considerar que en la mayoría de ellos no se analizan los metabolitos y la hormona sintética, lo cual si se considera en este trabajo. En el caso de la precisión son similares a RDSE.

Microextracciones basados en SBSE y BA μ E también se han informado para la extracción de los estrógenos en muestras de orina. Como se muestra en la tabla XIX, cuando se utilizó PDMS como fase de sorción, se observaron bajas recuperaciones. Ésto es debido principalmente a que este tipo de fase sorbente extrae de manera cuantitativa analitos muy apolares. Además, en ambos tipos de microextracción se utiliza un elevado tiempo de trabajo, por lo que hace que la metodología sea muy lenta.

Con respecto a dos nuevas técnicas de microextracción, como son la extracción por sorción con fase de tejido (FPSE) y la extracción de punto de nube asistida por ultrasonido (UAPCE), presentan una muy buena puntuación total en la eco-escala (mayores a 75), siendo consideradas metodologías verdes excelentes. La fase utilizada en el caso de FPSE fue un sol gel de poli

(tetrahidrofurano) soportada en celulosa, que normalmente se utiliza para analitos con mediana polaridad. Los límites de detección, exactitud y la precisión en ambas metodologías son bastante buenos, pero nuevamente corresponde a 3 de las 9 hormonas en estudio.

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

Tabla XIX. Comparación de diferentes métodos analíticos de extracción y determinación para hormonas estrogénicas en orina humana.

Técnica	Hormonas	Volumen de muestra [mL]	Tiempo de extracción [min]	LOD [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Recuperación (%)	RSD (%)	Eco-escala analítica	Ref.
FPSE (sol-gel poli PTHF)	E2, EE2	1	20	0,020 – 0,036	90,9 – 91,4	2,3 – 2,7	87	[10]
UAPCE	E1, E2	10	60	0,1 – 0,2	104 – 104,3	4,24 – 4,91	94	[64]
BAμE (Polímero de pirrolidona)	E1,E2,E3,EE2	1	960	0,05 – 0,1	95 – 101	3 – 6	90	[15]
SBSE (PDMS)	E1, E2, EE2	5 ó 20	120	1	11,1 – 24,6	4,4 – 7,6	No calculado *.	[9]
SPE (C18)	E2,E3, EE2	0,5	No reportado.	2,7 – 8,3	85,5 – 99,9	1,29 – 3,31	79	[16]
SPE (Oasis HLB)	E1, E2, E3, 2 y 4-OHE1, 2 y 4-OHE2, 16 α -OHE1	2	No reportado.	0,01 – 0,05	97,7 – 109,5	1,6 – 11,6	62	[19]

Técnica	Hormonas	Volumen de muestra [mL]	Tiempo de extracción [min]	LOD [$\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$]	Recuperación (%)	RSD (%)	Eco-escala analítica	Ref.
SPE (Oasis HLB)	E2	1	60	0,2 - 3	No reportado.	No reportado.	75	[17]
SBSE (PDMS)	E1, E2	1	60	0,02 - 0,03	No reportado.	No reportado.	No calculado*.	[18]
RDSE (e-DVB)	E1, E2, E3, 2 y 4-OHE1, 2 y 4-OHE2, 16 α -OHE1, EE2	2	60	0,057 – 0,71	65 – 99	0,9 – 3,7	81	♦

(*) No se especifican los volúmenes a utilizar.

♦ Este trabajo.

VII. CONCLUSIONES

La combinación de RDSE con GC-MS permitió desarrollar una metodología analítica para la determinación de los estrógenos y sus metabolitos desde muestras de orina, con propiedades analíticas similares o mejores a las reportadas previamente. Las concentraciones encontradas en muestra real fueron en un intervalo de 0,5 - 366 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y 1,1 - 709 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ sin y con hidrólisis enzimática, respectivamente.

La derivatización conjunta de las 9 hormonas se logró con 50 μL de derivatizante MSTFA y 50 μL de piridina a un temperatura de 90°C por 30 minutos, 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 plano con la fase e-DVB, un volumen de muestra de 25 mL (2 mL de orina y 23 mL de agua ultra pura) a pH 7, una velocidad de rotación 3000 rpm, clean up post extracción con 5 mL de una solución 1:4 metanol-agua por 5 minutos y una desorción con 5 mL de metanol por 15 minutos (en 1 etapa).

Fue posible implementar una metodología de hidrólisis enzimática, para la desconjugación de las estrógenos en la orina, en un tiempo de 20 horas a 37°C utilizando 2 mL de orina con 2 mL de un buffer de hidrólisis (que contiene la enzima β -glucuronidasa).

Los parámetros analíticos del método fueron: límite de detección entre 0,057 a 0,71 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y de cuantificación entre 0,17 a 2,15 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Respecto a las recuperaciones relativas estas se encuentra en un rango de 67 a 98%, siendo la más baja para el 2-OHE2 y la más alta para EE2. Además se estableció que es un método verde, de fácil elaboración en el laboratorio y que permite la pre-concentración de los analitos (en este caso 20 veces).

VIII. REFERENCIAS.

- [1] B. Álvarez Sánchez, F. P. Capote, J. R. Jiménez, and M. D. Luque de Castro, "Automated solid-phase extraction for concentration and clean-up of female steroid hormones prior to liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry: An approach to lipidomics," *J. Chromatogr. A*, vol. 1207, no. 1–2, pp. 46–54, 2008.
- [2] B. Socas-Rodríguez, M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, A. V. Herrera-Herrera, and M. Ángel Rodríguez-Delgado, "Chromatographic analysis of natural and synthetic estrogens in milk and dairy products," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 44, pp. 58–77, 2013.
- [3] C. Green, J. Brian, R. Kanda, M. Scholze, R. Williams, and S. Jobling, "Environmental concentrations of anti-androgenic pharmaceuticals do not impact sexual disruption in fish alone or in combination with steroid oestrogens," *Aquat. Toxicol.*, vol. 160, pp. 117–127, 2015.
- [4] G. Streck, "Chemical and biological analysis of estrogenic, progestagenic and androgenic steroids in the environment," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 28, no. 6, pp. 635–652, 2009.
- [5] C. N. Duong, J. S. Ra, J. Cho, S. D. Kim, H. K. Choi, J. H. Park, K. W. Kim, E. Inam, and S. D. Kim, "Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries," *Chemosphere*, vol. 78, no. 3, pp. 286–293, 2010.
- [6] J. Huang, J. Sun, Y. Chen, Y. Song, L. Dong, Q. Zhan, R. Zhang, and Z. Abliz, "Analysis of multiplex endogenous estrogen metabolites in human urine using ultra-fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A case study for breast cancer," *Anal. Chim. Acta*, vol. 711, pp. 60–68, 2012.

- [7] 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.
- [8] V. Ingrand, G. Herry, J. Beausse, and M. R. De Roubin, "Analysis of steroid hormones in effluents of wastewater treatment plants by liquid chromatography-tandem mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1020, no. 1, pp. 99–104, 2003.
- [9] C. Almeida and J. M. F. Nogueira, "Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 41, no. 4, pp. 1303–1311, 2006.
- [10] R. Kumar, Gaurav, Heena, A. K. Malik, A. Kabir, and K. G. Furton, "Efficient analysis of selected estrogens using fabric phase sorptive extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection," *J. Chromatogr. A*, vol. 1359, pp. 16–25, 2014.
- [11] C. Pieper and W. Rotard, "Investigation on the removal of natural and synthetic estrogens using biofilms in continuous flow biofilm reactors and batch experiments analysed by gas chromatography/mass spectrometry," *Water Res.*, vol. 45, no. 3, pp. 1105–1114, 2011.
- [12] N. Migowska, M. Caban, P. Stepnowski, and J. Kumirska, "Simultaneous analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs and estrogenic hormones in water and wastewater samples using gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography with electron capture detection.," *Sci. Total Environ.*, vol. 441, pp. 77–88, 2012.

- [13] Z. hua Liu, Y. Kanjo, and S. Mizutani, "Urinary excretion rates of natural estrogens and androgens from humans, and their occurrence and fate in the environment: A review," *Sci. Total Environ.*, vol. 407, no. 18, pp. 4975–4985, 2009.
- [14] S. E. Jantti, M. Hartonen, M. Hilvo, H. Nygren, T. Hyotylainen, R. A. Ketola, and R. Kostianen, "Steroid and steroid glucuronide profiles in urine during pregnancy determined by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry," *Anal. Chim. Acta*, vol. 802, pp. 56–66, 2013.
- [15] C. Almeida and J. M. F. Nogueira, "Determination of steroid sex hormones in real matrices by bar adsorptive microextraction (BA μ E)," *Talanta*, vol. 136, pp. 145–154, 2015.
- [16] L. Mao, C. Sun, H. Zhang, Y. Li, and D. Wu, "Determination of environmental estrogens in human urine by high performance liquid chromatography after fluorescent derivatization with p-nitrobenzoyl chloride," *Anal. Chim. Acta*, vol. 522, no. 2, pp. 241–246, 2004.
- [17] M. H. Choi, K. R. Kim, J. K. Hong, S. J. Park, and B. C. Chung, "Determination of non-steroidal estrogens in breast milk, plasma, urine and hair by gas chromatography/mass spectrometry," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 16, no. 24, pp. 2221–2228, 2002.
- [18] A. Stopforth, B. V. Burger, A. M. Crouch, and P. Sandra, "The analysis of estrone and 17 β -estradiol by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography/mass spectrometry: Application to urine samples after oral administration of conjugated equine estrogens," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 856, no. 1–2, pp. 156–164, 2007.

- [19] J.-Y. Moon, K. J. Kim, M. H. Moon, B. C. Chung, and M. H. Choi, "A novel GC-MS method in urinary estrogen analysis from postmenopausal women with osteoporosis.," *J. Lipid Res.*, vol. 52, no. 8, pp. 1595–603, 2011.
- [20] X. 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. 2000, pp. 1991–2001, 2000.
- [21] J. Aufartová, C. Mahugo-Santana, Z. Sosa-Ferrera, J. J. Santana-Rodríguez, L. Nováková, and P. Solich, "Determination of steroid hormones in biological and environmental samples using green microextraction techniques: An overview," *Anal. Chim. Acta*, vol. 704, no. 1–2, pp. 33–46, 2011.
- [22] H. Tomsíková, J. Aufartová, P. Solich, L. Nováková, Z. Sosa-Ferrera, and J. J. Santana-Rodríguez, "High-sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 34, pp. 35–57, 2012.
- [23] M. J. López De Alda and D. Barceló, "Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography-diode array detection-mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 892, no. 1–2, pp. 391–406, 2000.
- [24] C. Miège, P. Bados, C. Brosse, and M. Coquery, "Method validation for the analysis of estrogens (including conjugated compounds) in aqueous matrices," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 28, no. 2, pp. 237–244, 2009.
- [25] C. Lu, M. Wang, J. Mub, D. Han, Y. Bai, and H. Zhang, "Simultaneous determination of eighteen steroid hormones in antler velvet by gas chromatography-tandem mass spectrometry," *Food Chem.*, vol. 141, no. 3,

pp. 1796–1806, 2013.

- [26] G. Kaklamanos and G. Theodoridis, “Rapid multi-method for the determination of growth promoters in bovine milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 930, pp. 22–29, 2013.
- [27] R. Gadzala-Kopciuch, J. Ricanyová, and B. Buszewski, “Isolation and detection of steroids from human urine by molecularly imprinted solid-phase extraction and liquid chromatography,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 877, no. 11–12, pp. 1177–1184, 2009.
- [28] K. Kurečková, B. Maralíková, and K. Ventura, “Supercritical fluid extraction of steroids from biological samples and first experience with solid-phase microextraction-liquid chromatography,” *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 770, no. 1–2, pp. 83–89, 2002.
- [29] V. Camel, “Solid phase extraction of trace elements,” *Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc.*, vol. 58, no. 7, pp. 1177–1233, 2003.
- [30] M. Somenath, *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, Chemical Analysis: A series monographs on analytical chemistry and its applications, Ed. 62, 2003, Hoboken, New Jersey, Wiley interscience, A Jhon Wiley & son, inc. 2003, pp.78-113.
- [31] J. Raba and H. A. Mottola, “Continuous-flow/stopped-flow system incorporating two rotating bioreactors in tandem: application to the determination of alkaline phosphatase activity in serum.,” *Anal. Chem.*, vol. 66, no. 9, pp. 1485–1489, 1994.

- [32] P. Richter, B. López Ruiz, M. Sanchez- Cabezudo and H. A. Mottola, "Immobilized enzyme reactors. Diffusion/convection, kinetics, and a comparison of packed-column and rotating bioreactors for use in continuous-flow systems," *Anal. Chem.*, vol. 68, no. 10, pp. 1701–1705, 1996.
- [33] A. Giordano, P. Richter, and I. Ahumada, "Determination of pesticides in river water using rotating disk sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry," *Talanta*, vol. 85, no. 5, pp. 2425–2429, 2011.
- [34] P. Richter, C. Leiva, C. Choque, A. Giordano, and B. Sepúlveda, "Rotating-disk sorptive extraction of nonylphenol from water samples," *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 49, pp. 8598–8602, 2009.
- [35] A. Cañas and P. Richter, "Solid-phase microextraction using octadecyl-bonded silica immobilized on the surface of a rotating disk: Determination of hexachlorobenzene in water," *Anal. Chim. Acta*, vol. 743, pp. 75–79, 2012.
- [36] L. Jachero, B. Sepúlveda, I. Ahumada, E. Fuentes, and P. Richter, "Rotating disk sorptive extraction of triclosan and methyl-triclosan from water samples," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 24, pp. 7711–7716, 2013.
- [37] Y. Corrotea, K. Sánchez, M. A. Rubio, and P. Richter, "Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons From Water Samples Into a Rotating-Disk Microextractor and the Subsequent Determination By Gas", *J. Chil. Chem. Soc*, vol. 2, pp. 2477–2480, 2014.
- [38] L. Jachero, I. Ahumada, and P. Richter, "Rotating-disk sorptive extraction: Effect of the rotation mode of the extraction device on mass transfer efficiency," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, no. 12, pp. 2987–2992, 2014.

- [39] V. Manzo, O. Navarro, L. Honda, K. Sánchez, M. I. Toral, and P. Richter, "Determination of crystal violet in water by direct solid phase spectrophotometry after rotating disk sorptive extraction," *Talanta*, vol. 106, pp. 305–308, 2013.
- [40] 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.
- [41] C. Muñoz, M. I. Toral, I. Ahumada, and P. Richter, "Rotating Disk Sorptive Extraction of Cu-Bisdiethyldithiocarbamate Complex from Water and Its Application to Solid Phase Spectrophotometric Quantification", *Anal. Sci.*, vol. 30, no. May, pp. 613–617, 2014.
- [42] V. Manzo, M. Miró, and P. Richter, "Programmable flow-based dynamic sorptive microextraction exploiting an octadecyl chemically modified rotating disk extraction system for the determination of acidic drugs in urine," *J. Chromatogr. A*, vol. 1368, pp. 64–69, 2014.
- [43] 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.
- [44] A. Cañas, P. Richter, and G. M. Escandar, "Chemometrics-assisted excitation – emission fluorescence spectroscopy on nylon-attached rotating disks . Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of interferences", *Anal. Chim. Acta*, vol. 852, pp. 105–111, 2014.

- [45] 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.
- [46] A. Cañas, S. Valdebenito, and P. Richter, "A new rotating-disk sorptive extraction mode, with a copolymer of divinylbenzene and N-vinylpyrrolidone trapped in the cavity of the disk, used for determination of florfenicol residues in porcine plasma Microextraction Techniques," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 406, no. 8, pp. 2205–2210, 2014.
- [47] V. Manzo, K. Ulisse, I. Rodríguez, E. Pereira, and P. Richter, "A molecularly imprinted polymer as the sorptive phase immobilized in a rotating disk extraction device for the determination of diclofenac and mefenamic acid in wastewater," *Anal. Chim. Acta*, vol. 889, pp. 130–137, 2015.
- [48] M. Becerra-Herrera, L. Honda, and P. Richter, "Ultra-high-performance liquid chromatography-Time-of-flight high resolution mass spectrometry to quantify acidic drugs in wastewater," *J. Chromatogr. A*, vol. 1423, pp. 96–103, 2015.
- [49] Y. Corrotea, N. Aguilera, L. Honda, and P. Richter, "Determination of Hormones in Wastewater Using Rotating Disk Sorptive Extraction and Gas Chromatography – Mass Spectrometry", *Anal. Lett.*, vol. 49, no. 9, p.p. 1-15, 2016.
- [50] M. S. Díaz-Cruz, M. J. López de Alda, R. López, and D. Barceló, "Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS)," *J. Mass Spectrom.*, vol. 38, no. 9, pp. 917–923, 2003.

- [51] X. Peng, Z. Wang, C. Yang, F. Chen, and B. Mai, "Simultaneous determination of endocrine-disrupting phenols and steroid estrogens in sediment by gas chromatography-mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1116, no. 1–2, pp. 51–56, 2006.
- [52] 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-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17 α -ethinylestradiol," *J. Chromatogr. A*, vol. 1108, no. 1, pp. 121–128, 2006.
- [53] X. Xu, T. D. Veenstra, S. D. Fox, J. M. Roman, H. J. Issaq, R. Falk, J. E. Saavedra, L. K. Keefer, and R. G. Ziegler, "Measuring fifteen endogenous estrogens simultaneously in human urine by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry," *Anal. Chem.*, vol. 77, no. 20, pp. 6646–6654, 2005.
- [54] X. Xu, L. K. Keefer, R. G. Ziegler, and T. D. Veenstra, "A liquid chromatography-mass spectrometry method for the quantitative analysis of urinary endogenous estrogen metabolites," *Nat Protoc*, vol. 2, no. 6, pp. 1350–1355, 2007.
- [55] A. M. Andersson and N. E. Skakkebaek, "Exposure to exogenous estrogens in food: Possible impact on human development and health", *Eur. J. Endocrinol.*, vol. 140, no. 6, pp. 477–485, 1999.
- [56] R. Todorovic, P. Devanesan, S. Higginbotham, J. Zhao, M. L. Gross, E. G. Rogan, and E. L. Cavalieri, "Analysis of potential biomarkers of estrogen-initiated cancer in the urine of Syrian golden hamsters treated with 4-hydroxyestradiol", *Carcinogenesis*, vol. 22, no. 6, pp. 905–911, 2001.

- [57] G.-W. Lien, C.-Y. Chen, and G.-S. Wang, "Comparison of electrospray ionization, atmospheric pressure chemical ionization and atmospheric pressure photoionization for determining estrogenic chemicals in water by liquid chromatography tandem mass spectrometry with chemical derivatizations.," *J. Chromatogr. A*, vol. 1216, no. 6, pp. 956–66, 2009.
- [58] 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.
- [59] R. Cantarero. " Estudio de adsorción de 17 α -etinilestradiol y triclosán en suelos tratados con biosólido y determinación de la fracción biodisponible de los compuestos a través de plantas de trigo". Memoria para obtener el título de Químico y Magíster en Química. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias químicas y Farmacéuticas, 2014. 81p.
- [60] 3M. Sorbent information for C18, C18FF and C8. [En línea]. <http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en_US/Empore/extraction/center/sorbents/c18-c18ff-c8/> [Consultado: 10 de marzo 2016].
- [61] B. Buszewski and M. Szultka, "Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review," *Crit. Rev. Anal. Chem.*, vol. 42, no. 3, pp. 198–213, Jul. 2012.
- [62] N. Gilart, F. Borrull, N. Fontanals, and R. M. Marcé, " Review: Selective materials for solid-phase extraction in environmental analysis," *Trends Environ. Anal. Chem.*, vol. 1, pp. e8–e18, 2014.
- [63] R. Montoreano, *Manual de fisiología y biofísica para estudiante de medicina*. Ed. Electrónica. 2002. Cap.8. Parte 3.

- [64] Y. Zou, Y. Li, H. Jin, H. Tang, D. Zou, M. Liu, and Y. Yang, "Determination of estrogens in human urine by high-performance liquid chromatography/diode array detection with ultrasound-assisted cloud-point extraction," *Anal. Biochem.*, vol. 421, no. 2, pp. 378–384, 2012.
- [65] K. Ulisse. "Microextracción de fármacos antiinflamatorios no esteroidales desde matrices acuosas usando polímero de impresión molecular inmovilizado en un sistema de disco rotatorio". Memoria para obtener el título de Químico. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias químicas y farmacéuticas. 2014. 64 p.
- [66] R. J. Mora, *Soporte nutricional especial*, 3era edición. Colombia. Editorial medica panamericana. 2002. pp. 90 -91.
- [67] J. Bestene Alvarado. *Introducción a la clínica*. 1era edición. Colombia. Editorial Javeriano. 2003. pp. 159-160.
- [68] ChemAxon. "Chemicalize". [En línea]. <<http://www.chemicalize.org/>> [Consulta: 25 de marzo 2015].
- [69] M. Kuster, M. José López De Alda, and D. Barceló, "Analysis and distribution of estrogens and progestogens in sewage sludge, soils and sediments," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 23, no. 10–11, pp. 790–798, 2004.

IX. ANEXO

Tabla XX. Propiedades físico-químicas de las hormonas en estudio [13], [22], [68], [69].

Compuesto	Masa Molecular [g/mol]	pKa	LogK _{ow}	Constante de Henry [atm·m ³ /mol]	Solubilidad en agua [mg/L]
E1	270,4	10,25	3,624	3,8·10 ⁻¹⁰	30
2-OHE1	286,4	10,10 13,07	2,817	-	-
4-OHE1	286,4	10,06 13,07	2,713	-	-
16α-OHE1	286,4	10,33 13,07	2,863	-	-
E2	272,4	10,27	4,146	3,64·10 ⁻¹¹	3.6
2-OHE2	288,4	10,12 13,07	3,338	-	-
4-OHE2	288,4	9,8 13,07	3,44	-	-
E3	288,4	10,25 13,62	2,527	1,33·10 ⁻¹²	441
EE2	296,4	10,24	4,106	7,94·10 ⁻¹²	11.3

Tabla XXI. Propiedades físico-químicas de los componentes de la orina [68].

Compuesto	Masa Molecular [g/mol]	pKa	LogK_{ow}
Urobilina	584,3	4,05 4,49	2,97
Ácido úrico	168,1	7,61 9,47	-1,54
Urea	60,1	-	-1,36
Creatinina	113,1	11,75	0,22

Desde la **Figura 37 a la 42** se muestran los espectros de masas para la selección de los iones de cuantificación e identificación de las 9 hormonas en estudio, el estándar surrogate e interno.

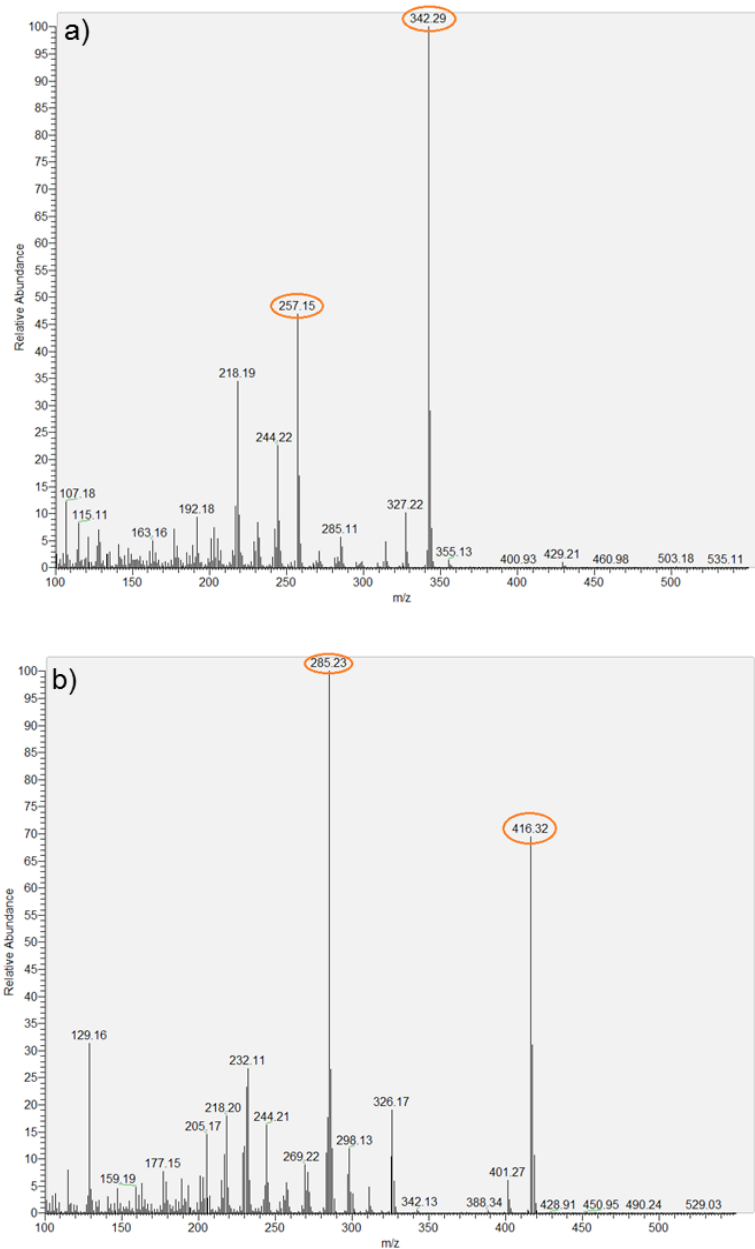


Figura 37. Espectros de masas de las hormonas E1 (a) y E2 (b) , donde se observan los fragmentos más importantes para su determinación analítica.

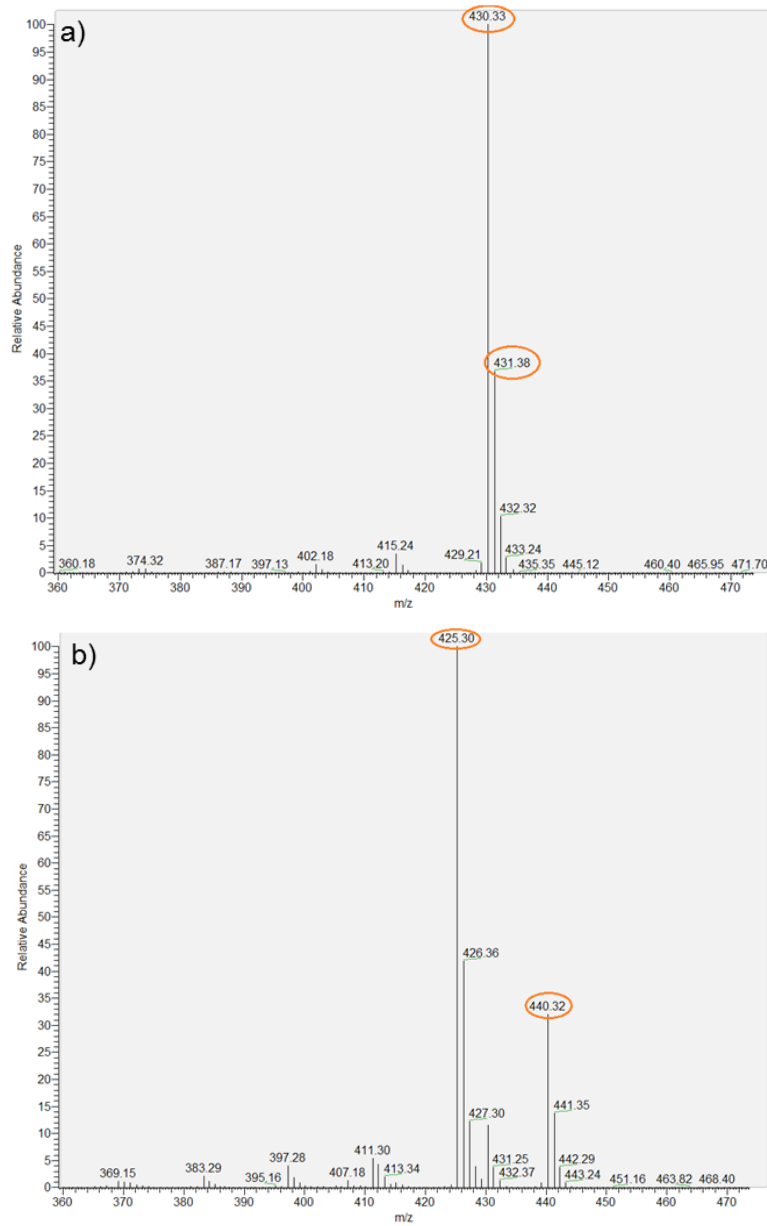


Figura 38. Espectros de masas de las hormonas 2-OHE1(a) y EE2 (b), donde se observan los fragmentos más importantes para su determinación analítica.

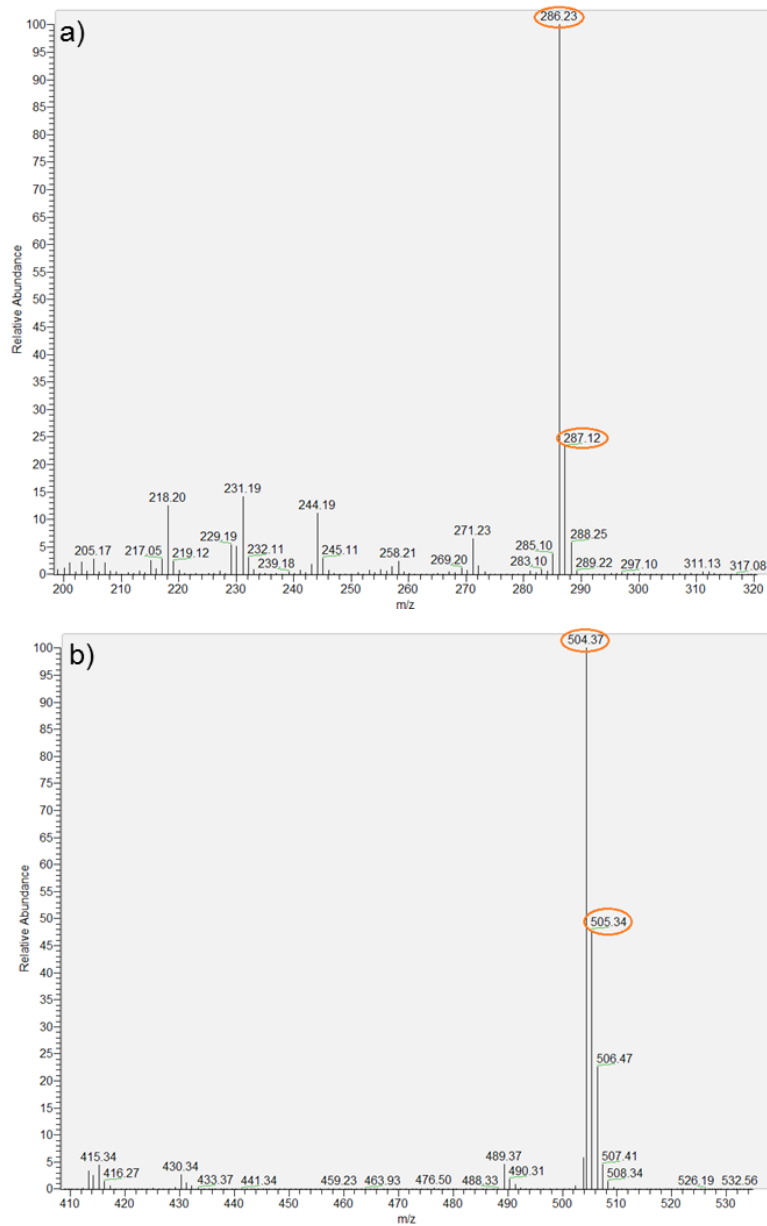


Figura 39. Espectros de masas de las hormonas 16 α -OHE1(a) y 2-OHE2 (b), donde se observan los fragmentos más importantes para su determinación analítica.

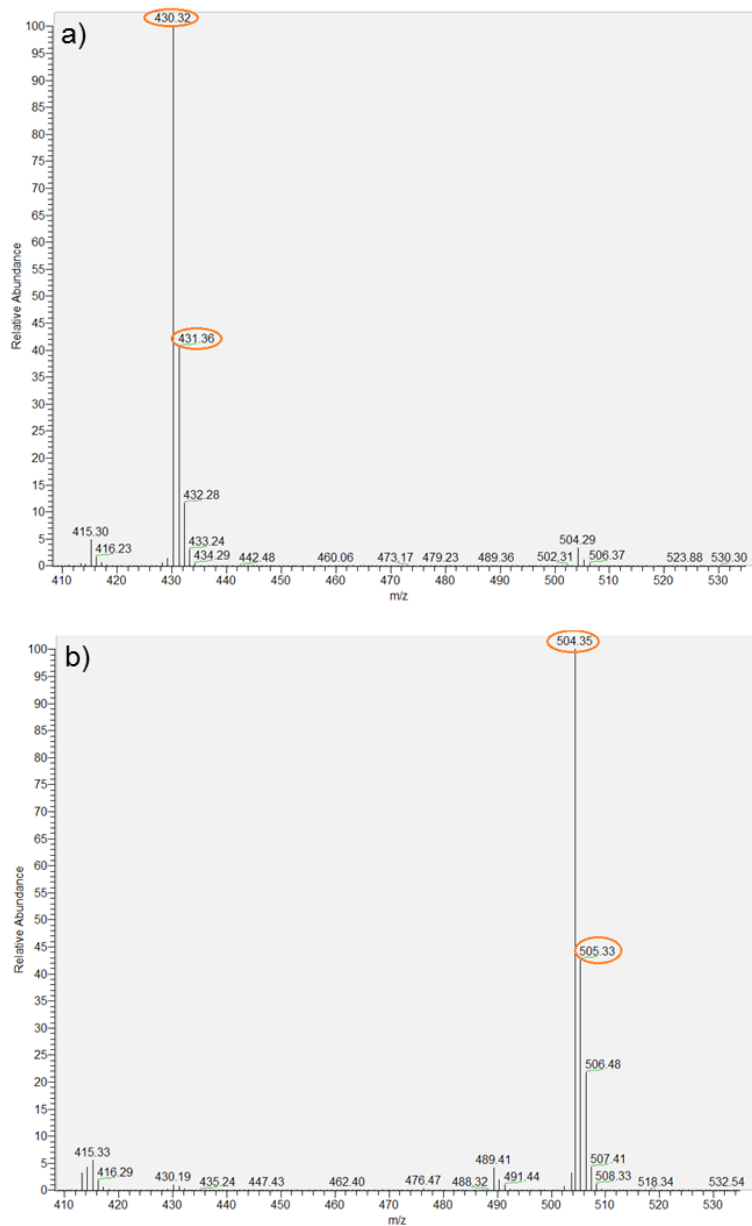


Figura 40. Espectros de masas de las hormonas 4-OHE1 (a) y 4-OHE2 (b), donde se observan los fragmentos más importantes para su determinación analítica.

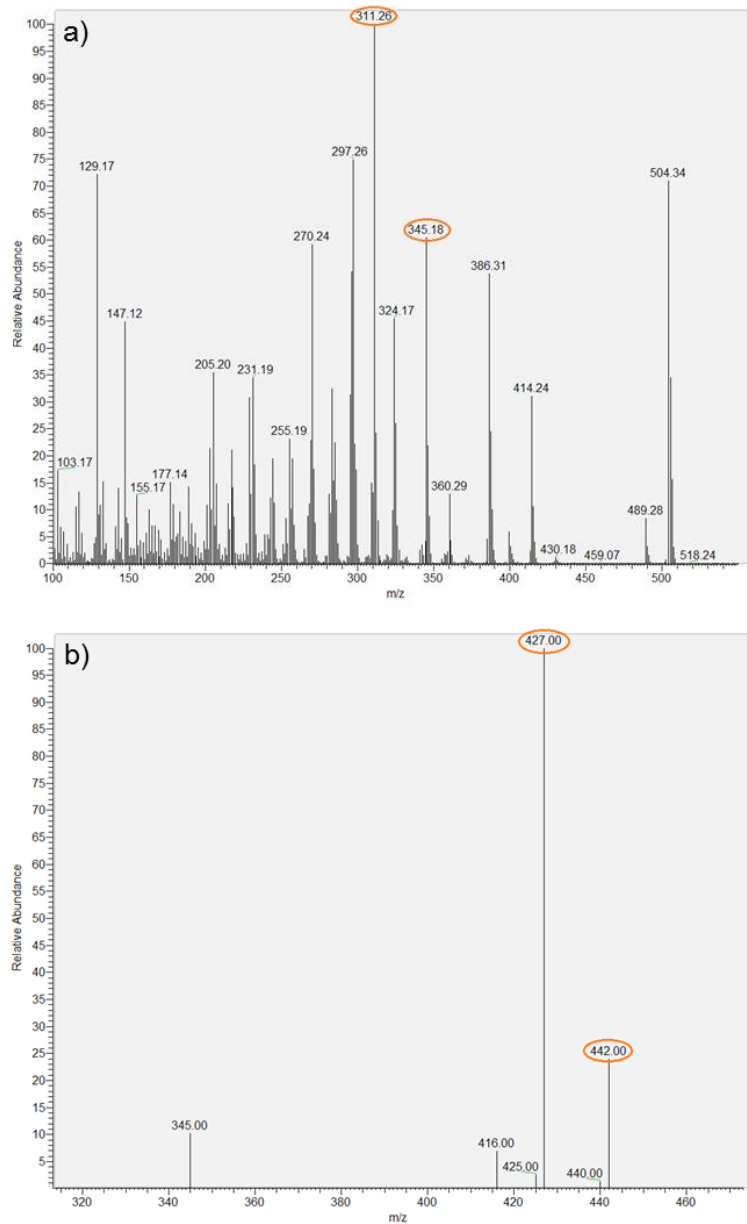


Figura 41. Espectros de masas de las hormonas E3 (a) y surrogate (20,21)-¹³C₂-EE2 (b), donde se observan los fragmentos más importantes para su determinación analítica.

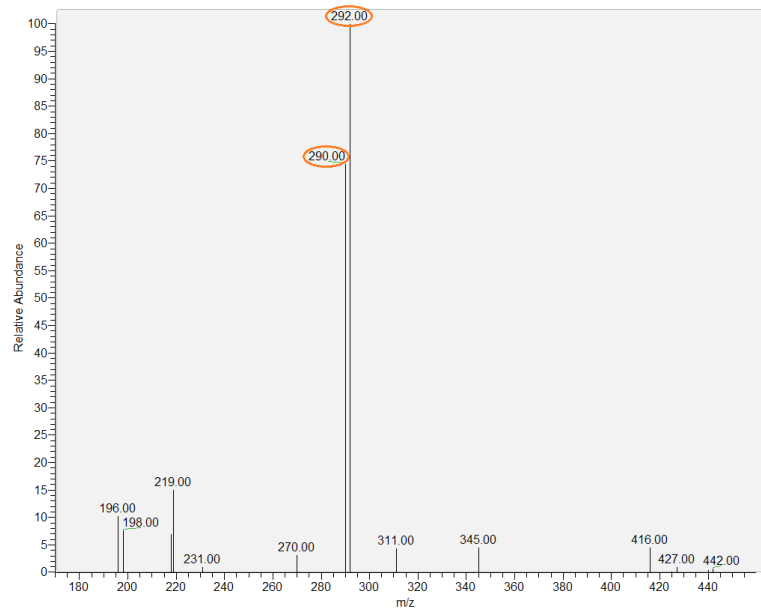


Figura 42. Espectro de masas del estándar interno PCB 77 , donde se observan los fragmentos más importantes para su determinación analítica.

Desde la **Figura 43 a la 46**, se muestran los cromatogramas de las muestras reales A,C,D y H sin y con hidrólisis enzimática.

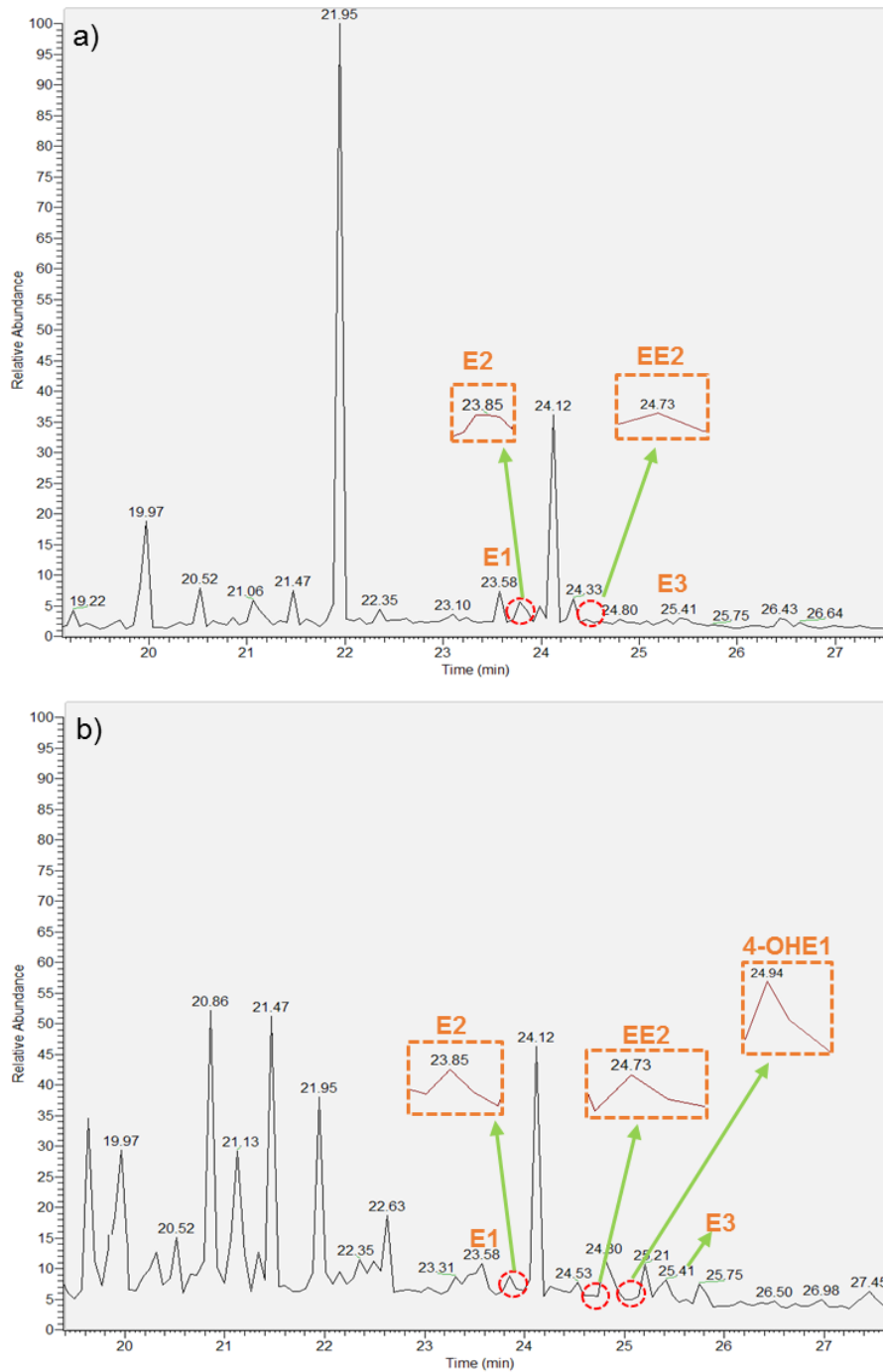


Figura 43. Cromatogramas muestra real A (Mujer, 26 años) sin (a) y con (b) hidrólisis enzimática.

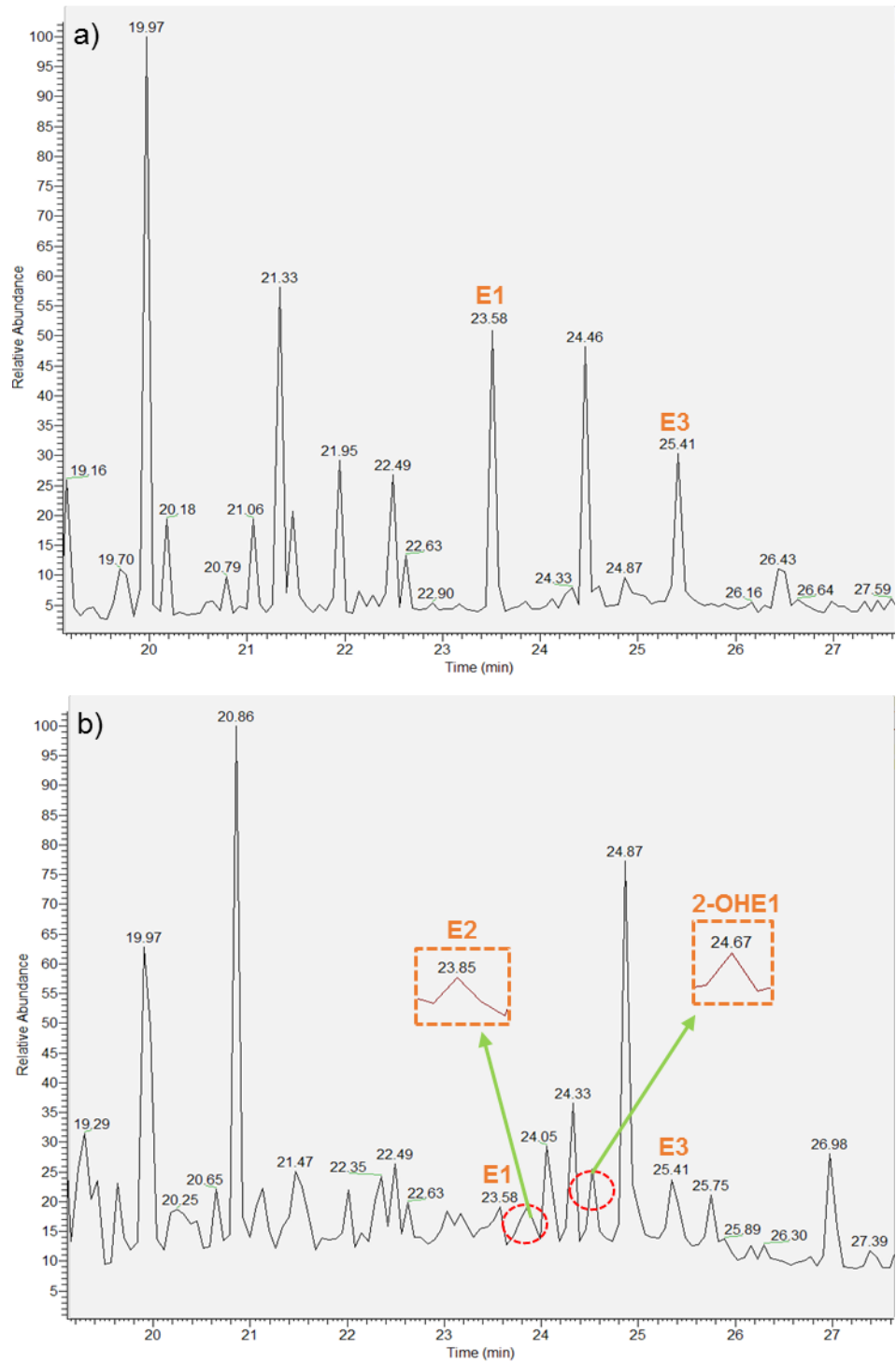


Figura 44. Cromatogramas muestra real C (Mujer, 50 años) sin (a) y con (b) hidrólisis enzimática.

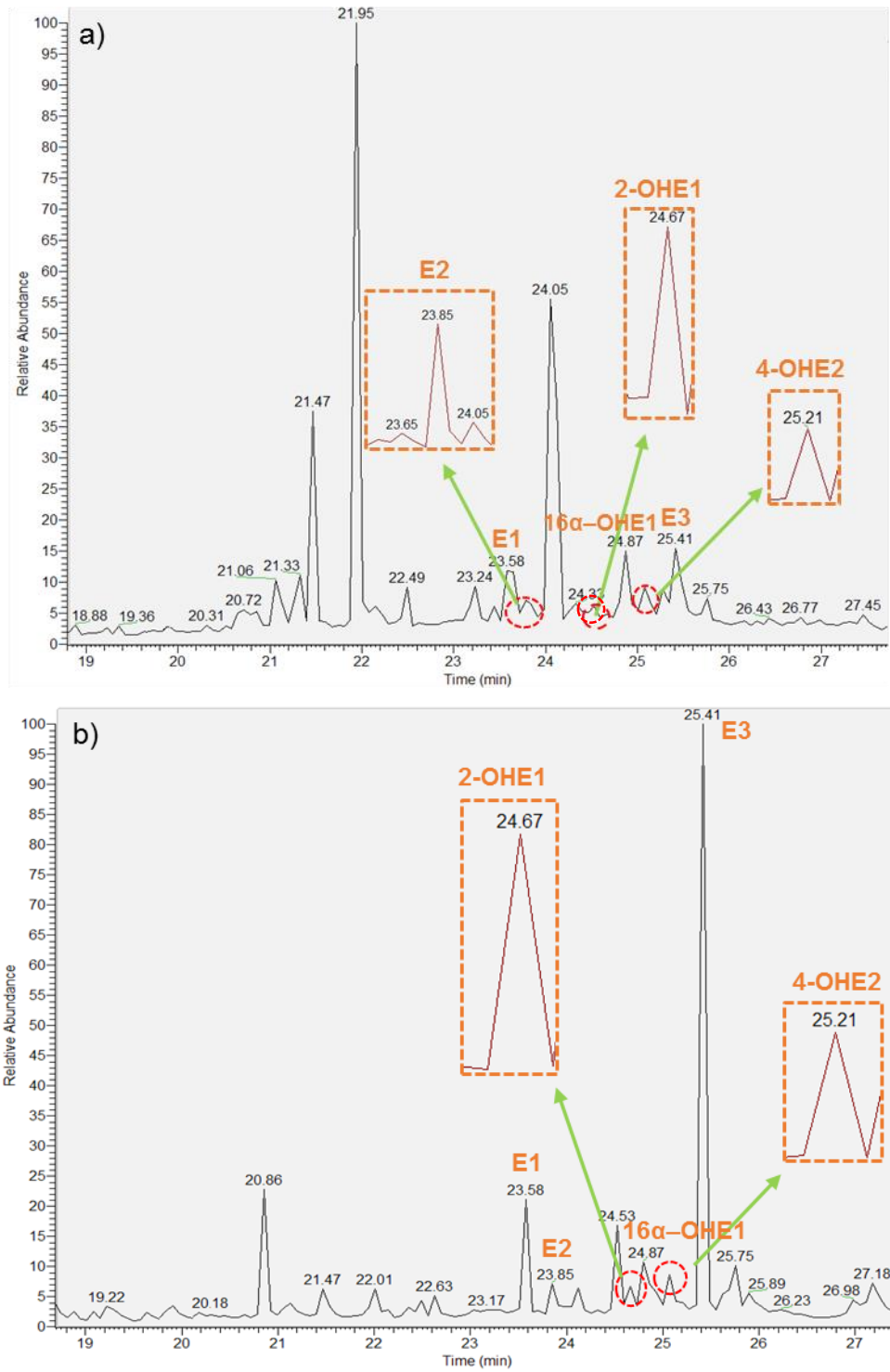


Figura 45. Cromatogramas muestra real D (Mujer, 32 años, 24 semanas de embarazo) sin (a) y con (b) hidrólisis enzimática.

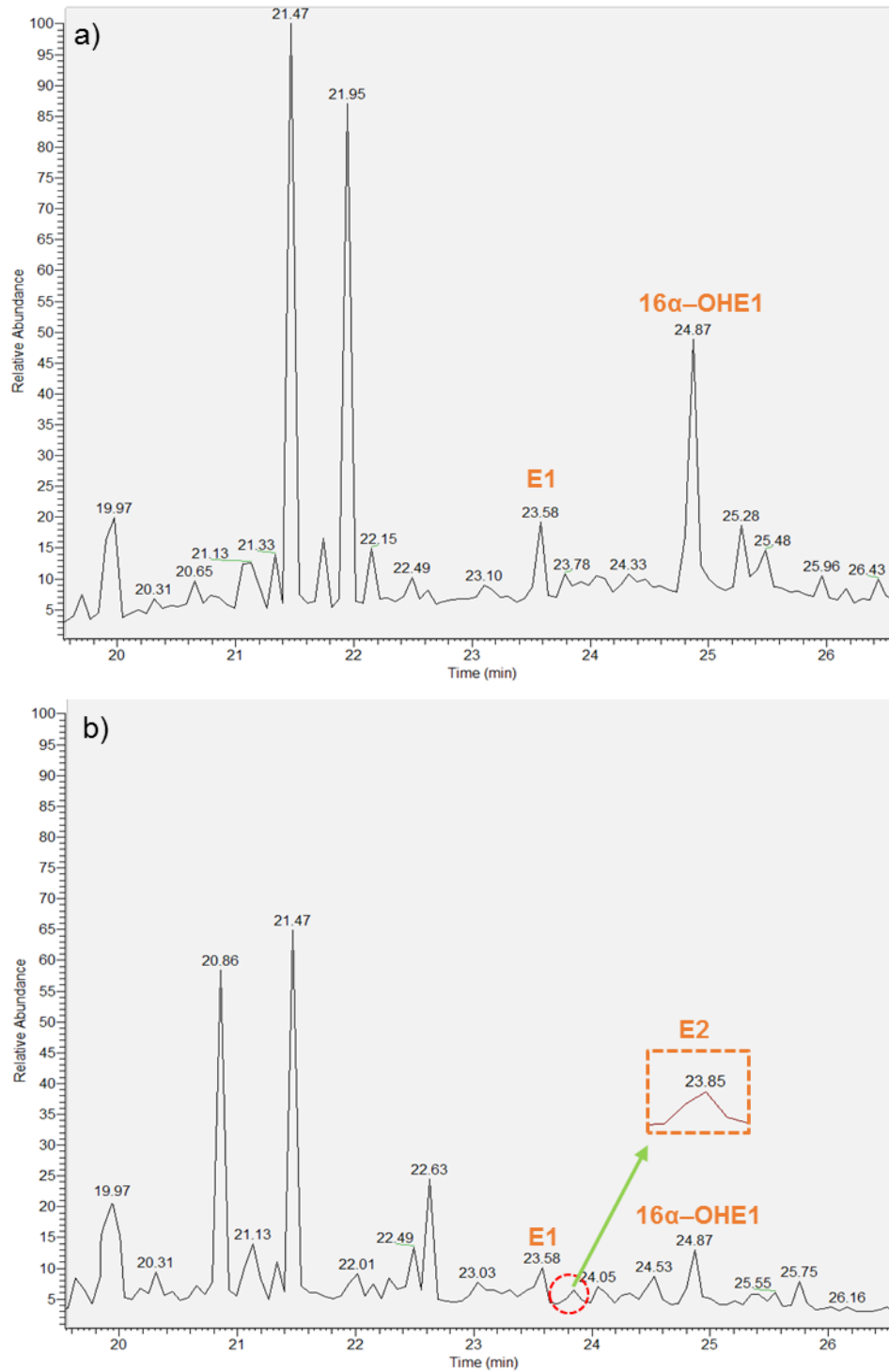


Figura 46 Cromatograma muestra real H (Hombre, 46 años) sin (a) y con (b) hidrólisis enzimática.