

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



“MICROEXTRACCIÓN DE HORMONAS DESDE AGUAS RESIDUALES UTILIZANDO CORCHO LAMINAR COMO FASE SORBENTE Y SU DETERMINACION POR CROMATOGRAFÍA DE GASES 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 por:

JÁIRON DENNYS GOYA PACHECO

Director de Tesis: Dr. Pablo Richter Duk.

Codirectora de Tesis: Dra. Valentina Manzo

Santiago - Chile

Julio 2020

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 el candidato:

JAIRON DENNYS GOYA PACHECO

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

Director de Tesis:

Dr. Pablo Richter D.

Codirectora de tesis:

Dra. Valentina Manzo

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. German Günther (presidente).

Dra. María Carolina Zúñiga.

Dra. Mercedes Becerra.

PUBLICACIONES.

Cork sheet as a sorptive phase to extract hormones from water by rotating disk sorptive extraction (RDSE)

Valentina Manzo, Jáiron Goya-Pacheco, Daniel Arismendi, Mercedes Becerra-Herrera, Alver Castillo-Aguirre, Rosario Castillo-Felices, Milton Rosero-Moreano, Eduardo Carasek f Pablo Richter.

Analytica Chimica, Vol 1087, 2019, 1-10

RESUMEN

Las sustancias en el ambiente que no están normadas, pero tienen el potencial de causar daño a la salud o el ambiente aun en muy bajas concentraciones, han sido denominadas contaminantes emergentes. Algunas de estas sustancias han sido clasificadas como disruptores endocrinos (EDCs) que son agentes que interfieren con la producción, liberación, transporte, metabolismo acción o eliminación de las hormonas naturales del cuerpo.

Los EDCs pueden ser agrupados de acuerdo con su origen: naturales (estrógenos y andrógenos), semisintéticos (anticonceptivos) y sintéticos (xenoestrógenos).

Este grupo de contaminantes se deriva principalmente de productos utilizados en grandes cantidades en la vida cotidiana y es por eso, por lo que existe la gran preocupación respecto a ellos debido al potencial de acarrear un impacto ecológico y efectos adversos en la salud, a concentraciones extremadamente bajas (ngL^{-1}).

Entre los EDCs más conocidos tenemos las hormonas estrogénicas naturales: estrona (E1) Estradiol (E2) estriol (E3) secretadas por seres humanos y animales y la hormona sintética de uso anticonceptivo, la 17 α etinilestradiol (EE2) la que presenta mayor grado de actividad estrogénicas.

Estos compuestos no se eliminan totalmente de las plantas de tratamiento, aun en concentraciones bajas, son persistentes en el tiempo a esto se suma la complejidad de las matrices ambientales en que se encuentran, lo que hace necesario la implementación de un método analítico de alta sensibilidad y selectividad que permita separarlos de la matriz y concentrarlos.

En este estudio se introdujo en la práctica de la Química Analítica Ecoeficiente, el corcho como fase extraíble renovable (verde) para la microextracción de compuestos de baja polaridad. Mediante la microextracción por sorción en disco rotatorio (RDSE) y la adhesión de una lámina de corcho como fase fueron utilizadas para la extracción

y posterior medición y cuantificación de estas hormonas mediante Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) a partir de muestras de aguas residuales.

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

Los analitos son retenidos y preconcentrados en una fase laminar de corcho, que se encuentra inmobilizada en la superficie de un disco plano de teflón. Las condiciones óptimas de extracción fueron una agitación de 2000 rpm por un tiempo de 45 min y volumen de muestra de 20 mL. Se realizó un previo acondicionamiento de la fase sorbente (corcho) a 2000 rpm con volúmenes de 10 mL de metanol y finalmente agua durante 5 min por cada solvente utilizado.

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 80°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 parte el proceso se incorporó un estándar "Surrogate" ((20,21)- 13 C₂-EE₂).

Las características analíticas del método desarrollado pudieron determinar que los 4 compuestos estrogénicos tienen un R^2 superior a 0.99. Las recuperaciones absolutas fueron mayores de 63% y la precisión expresada como desviación estándar relativa varió entre 2 a 16%. Los rangos de LOD y LOQ fueron 3 - 19 y 10 - 62 ngL^{-1} respectivamente.

Este método propuesto se aplicó al análisis de aguas residuales y la concentración de hormonas en una planta de tratamiento de aguas residuales en Santiago de Chile iban desde <LOD a 48 ngL^{-1} .

SUMMARY

Substances in the environment that are not regulated but have the potential to cause damage to health or the environment even in very low concentrations, have been called emerging pollutants. Some of these substances have been classified as endocrine disruptors (EDCs) that are agents that interfere with the production, release, transport, metabolism, action, or elimination of the body's natural hormones.

EDCs can be grouped according to their origin: natural (estrogens and androgens), semi-synthetic (contraceptives) and synthetic (xenoestrogens).

This group of pollutants is derived mainly from products used in large quantities in everyday life and that is why, there is great concern about them due to the potential to carry an ecological impact and adverse health effects, at extremely high concentrations. Low (ng L^{-1}).

Among the best-known EDCs, we have the natural estrogenic hormones: estrone (E1) Estradiol (E2); estriol (E3) secreted by humans and animals and the synthetic hormone for contraceptive use, 17 α -ethinylestradiol (EE2), which has the highest degree of estrogenic activity.

These compounds are not completely eliminated from the treatment plants, even at low concentrations, they are persistent over time to this the complexity of the environmental matrices in which they are found is added, which makes it necessary to implement a high sensitivity analytical method and selectivity that allows them to be separated from the matrix and concentrated.

In this study, cork was introduced into the practice of Eco-efficient Analytical Chemistry, the cork as a removable renewable phase (green) for the microextraction of low polarity compounds. Through the microextraction by rotary disk sorption (RSDE) and the adhesion of a sheet Cork as phase were used for the extraction and subsequent measurement and quantification of these hormones by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) from sewage samples.

The RDSE was selected as a versatile and eco-efficient economic technique (green chemistry) while the GC-MS offers good sensitivity and low detection limits for complex sample research.

The analytes are retained and pre-concentrated in a laminar phase of cork, which is immobilized on the surface of a flat Teflon disk. The optimal extraction conditions were a 2000 rpm agitation for a time of 45 min and a sample volume of 20 mL. A preconditioning of the sorbent phase (cork) was carried out at 2000 rpm with volumes of 10 mL of methanol and finally water for 5 min for each solvent used.

The desorption of the compounds was carried out in 1 stage of 15 minutes with 5 mL of methanol, then the extract was evaporated with nitrogen until dry. To the dry eluate, 50 μ L of the N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (MSTFA) derivative and 50 μ L of pyridine was added. Subsequently it was subjected to a temperature environment at 80 ° C for 30 minutes. Once the derivatization was completed, 20 μ L of 3, 3', 4, 4'-Tetrachlorobiphenyl (PCB 77, internal standard) was added and finally 2 μ L was injected into the GC-MS. In addition, in part the process incorporated a "Surrogate" standard ((20, 21) - 13 C₂-EE₂).

The analytical characteristics of the method developed could determine that the 4 estrogenic compounds have an R² greater than 0.99. Absolute recoveries were greater than 63% and the accuracy expressed as relative standard deviation varied between 3 to 19%. The ranges of LOD and LOQ were 3 - 19 and 10 - 62 ngL⁻¹, respectively.

This proposed method was applied to the analysis of wastewater and the concentration of hormones in a wastewater treatment plant in Santiago de Chile ranged from <LOD and 48 ngL⁻¹.

"Sabido que en el mismo instante de la práctica cualquier teoría se derrumba, es necesario buscar que nuestras acciones, logros y metas trasciendan en el tiempo, es decir, que dejen huellas en una o miles de personas, en un grupo de trabajo o una nación completa. La gloria es para pocos y para los que buscan trascender más allá de su tiempo de vida, para los que entienden que el ser humano forma parte de una colectividad y por esta razón busca una obra que impacte y aporte algo a la humanidad. La medida social del hombre está en sus obras: la inmortalidad es privilegio de quienes las hacen supervivientes a los siglos y por ellas se mide."

Walter Risso.

"Cuando juntamos la técnica con la inteligencia, se logra la rara perfección de lo simple"

Richard A. Bonnard.

Agradecimientos.

Lo que parece ser el final, en realidad es un nuevo comienzo, culminando una etapa, un objetivo más, de gran exigencia y desafíos, pero que fue haciéndose amigable y llevadero a medida del tiempo transcurrido y gracias a las personas que fui encontrando en el camino, dotándome junto a ellas de más sabiduría, conocimientos e instrucciones, que han hecho de mi mejor persona, mejor profesional y que justifican cualquier esfuerzo, estrés o cansancio, por lo que estoy seguro que este logro tendrá el valor que se merece y traerá consigo consecuencias satisfactorias para mí y mi entorno.

Un agradecimiento total a Chile como nación, como sociedad, porque desde un inicio a mi llegada a este país me abrió sus puertas, me brindó las oportunidades para aportar humana y profesionalmente en distintas áreas, pero destaco sobre todo la oportunidad de estudiar en una Universidad de gran figura académica, muy reconocida en la región como es la Universidad de Chile.

Siempre habrá palabras justas y necesarias para agradecer a mis padres, todo lo que soy se lo debo a ustedes, por sus consejos, sus cuidados, por todo lo aprendido y por qué siempre sus hijos hemos sido su prioridad, son los padres que muchos quisieran tener, los amo mucho y gracias por apoyarme en mis proyectos, todas las gracias del mundo no serán suficientes para retribuir todas esas muestras de cariño y sacrificio, mis siempre recordados y amados padres Nancy y Amado.

También quiero dedicar este logro a mi hijo Saulo David, eres la inspiración y empuje que necesitaba, aunque las distancias nos separen, estarás siempre presente, eres ese ser que llenó ese espacio vacío, desde entonces siempre existirá esa preocupación y ocupación para que nunca te falten, las esperanzas, los sueños y las oportunidades. Mi pequeño todas las bendiciones del cielo para ti.

A ustedes mis hermanos que son mi mano derecha, mi familia, presentes allí siempre y cuando más los he necesitado. En esta ocasión tan especial quiero dedicarles esta tesis, a ustedes personas de bien, seres especiales, gracias por sus ayudas, sus

ejemplos, los extraño y quiero demasiado. Muchas gracias, Iván, Johan, Charli y muy especialmente Darwin, quién aun en su condición y mirando fijo mucho tiempo, con un solo gesto apruebas y festejas con nosotros, de ti aprendimos que nada nos puede limitar, sin duda eres el mejor de todos y nuestra inspiración diaria para seguir adelante.

A mi novia, mi compañera, Lorena, mi cable a tierra, de la mano siempre con la complicidad y atenta para tomar las decisiones correctas, gracias por confiar en mis capacidades, por esta caminata juntos, por tu tiempo y la motivación constante, todo eso y tu compañía son la mejor muestra de amor que me has podido brindar.

Como no mencionar también a mis compañeros de Laboratorio de Química Ambiental, todos ellos de gran disposición y atentos ante cualquier consulta o necesidad, además de los buenos momentos compartidos. Muchas gracias infinitas a Luis, Felipe, Cristina, Alejandra y de manera muy especial a Daniel Arizmendi y Valentina Manzo, siempre estaré en gratitud con ustedes por acompañarme y orientarme durante este proceso.

A los profesores Inés Ahumada, Dra. Loreto Ascar y Dra. Tatiana Garrido, por su motivación constante, apoyo y disponibilidad ante las dudas planteadas.

En forma especial a mi colega y amigo QF. Edgardo González, gracias por darme la mano cuando lo necesité, por esa flexibilidad y empatía, que fueron necesidad urgente cuando así lo demandaban mis horarios, fuiste tolerante, paciente y nunca estuvo de más un consejo y una palabra de aliento, aptitudes en ti que agradezco enormemente.

Y también agradecer al profesor Dr. Pablo Richter, mi director de tesis, por su buena disposición, por la confianza depositada en mí, para ser parte de este Proyecto de Investigación y por los buenos momentos compartidos en Laboratorio, muchas gracias, profesor Pablo.

Finalmente agradezco al Proyecto FONDECYT 1180742, por ese importante respaldo financiero y logístico para el desarrollo de este trabajo de investigación, que hoy se traduce en la presente tesis.

INDICE

I	INTRODUCCIÓN	1
1.1	Preparación de la muestra	8
1.2	Corcho: Propiedades y antecedentes	14
1.3	Determinación y cuantificación de la muestra	17
1.4	Analitos modelo	18
II	HIPOTESIS	19
III	OBJETIVOS	20
3.1	Objetivo general	20
3.2	Objetivo específico	21
IV	MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS	22
4.1	Reactivos	22
4.2	Estándares	22
4.3	Materiales	23
4.4	Instrumentos y equipos	24
V	METODOLOGIA	25
5.1	Identificación de analitos mediante GC-MS	25
5.2	Condiciones GC-MS	26
5.3	Derivatización de los analitos modelo	27
5.4	Optimización de las variables químicas e hidrodinámicas	27
5.4.1	Variables químicas	27
5.4.1.1	pH	27
5.4.1.2	Fuerza iónica	28
5.4.1.3	Volumen de solvente y desorción	28
5.4.1.4	Fase sorbente (corcho laminar)	28
5.4.2	Variables hidrodinámicas	29
5.4.2.1	Perfil de extracción	29
5.4.2.2	Volumen de muestra y velocidad de extracción	29
5.5	Pretratamiento de la fase y del disco	30
5.6	Caracterización de la fase	31

5.7	Reutilización de la fase	31
5.8	Validación del método analítico	31
5.8.1	Precisión	32
5.8.2	Exactitud	32
5.8.3	Límite de detección del método LOD	32
5.8.4	Límite de cuantificación del método LOQ	32
5.8.5	Curva de calibración	33
5.8.6	Sensibilidad	33
5.9	Aplicación de la metodología en muestras reales	33
5.10	Eco-escala analítica	34
VI	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
6.1	Caracterización de lámina de corcho	35
6.2	Identificación de los analitos mediante GC-MS	38
6.3	Optimización del proceso de derivatización	40
6.4	Optimización de las variables químicas e hidrodinámicas del proceso de extracción por RDSE	42
6.4.1	Variables químicas	42
6.4.1.1	Fase sorbente	42
6.4.1.2	Optimización del pH	44
6.4.1.3	Optimización del volumen del Solvente de elución y desorción	46
6.4.1.4	Estudio de efecto matriz	47
6.4.2	Variables hidrodinámicas	50
6.5	Resumen de las variables optimizadas en la metodología	56
VII	VALIDACIÓN DEL METODO	57
7.1	Análisis de muestra real por GC-MS	59
7.2	Eco-escala analítica	61
7.3	Comparación entre lámina de corcho y otras fases comerciales utilizadas en RDSE	63
7.4	Comparación con otras metodologías para la determinación de hormonas	64
7.5	Esquema de la metodología desarrollada	66
VIII	CONCLUSIONES	68
IX	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	69

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Aguas residuales urbanas y efluentes hospitalarios	1
Figura 2	Estructura principal de las hormonas esteroideas	3
Figura 3	Esquema general para el objeto de este estudio	7
Figura 4	Esquema de extracción en fase sólida (SPE)	9
Figura 5	Esquema de microextracción en fase sólida (SPME) por ID y head space	10
Figura 6	Esquema de extracción por sorción en barra de agitación (SBSE)	11
Figura 7	Microextracción por sorción en disco rotatorio utilizando corcho laminar	12
Figura 8	Disco de teflón adherido a corcho laminar	13
Figura 9	Fragmento de molécula de lignina y tanino	14
Figura 10	Comparación de las respuestas obtenidas utilizando diferentes fibras y corcho molido en análisis de PAHs por DI-SPME	15
Figura 11	Reproducibilidad en la producción de las barras de BAMÉ con corcho y evaluación de la eficacia de la barra utilizada	16
Figura 12	Reactivos utilizados como derivatizantes en la extracción de hormonas estrogénicas	18
Figura 13	Analitos modelo del DR. Ehrenstorfer GmbH(Augsburg, Alemania)	18
Figura 14	Proceso de extracción con agitación magnética a 2000 rpm por RDSE	20
Figura 15	Muestra de efluente proveniente de planta mapocho Trebal de la región metropolitana	25
Figura 16	a.) disco con cavidad y fase en polvo b.) disco con cavidad y plano adherido a fase de corcho laminar	29
Figura 17	Fase de corcho laminar sometida a limpieza por ultrasonido	30
Figura 18	Matriz efluente y afluente, filtrado y centrifugado previo al análisis	34
Figura 19	[a] plano máximo de fluorescencia con $\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$ [b] representación tridimensional del análisis de la sección transversal de la muestra a $40 \mu\text{m}$ de profundidad	35
Figura 20	Análisis de imagen multivariante de una microzona en corcho laminar a través de MCR-ALS	36

Figura 21	Espectro FTIR de la lámina de corcho	37
Figura 22	Micrografías SEM de la lámina de corcho	38
Figura 23	Cromatograma GC-MS modalidad SIM de estándares de hormonas	39
Figura 24	Estructuras de los productos obtenidos en la derivatización de EE2 con MSTFA y sin piridina	40
Figura 25	Optimización de la derivatización a diferentes tiempos y temperaturas	41
Figura 26	Recuperaciones % de corcho en lámina[CL] y corcho molido [CM]	42
Figura 27	Recuperación de analitos en distintas muestras con disco plano y con cavidad	43
Figura 28	Fase laminar de corcho en disco plano y con cavidad	44
Figura 29	Estudio del efecto del pH en la extracción	44
Figura 30	Efecto del pH sobre la respuesta analítica de las hormonas	45
Figura 31	Efecto matriz de hormonas en afluente	49
Figura 32	Efecto matriz de hormonas en efluente	50
Figura 33	Efecto del volumen de la muestra en la respuesta analítica	52
Figura 34	Perfil de extracción de hormonas por RDSE	53
Figura 35	Efecto de la velocidad del disco en el espesor de la capa de agua	54
Figura 36	Efecto de la velocidad de rotación del disco en la respuesta analítica	55
Figura 37	Cromatograma en modo SIM en presencia de hormonas en solución estándar y muestra real	60
Figura 38	Recuperación absoluta de hormonas utilizando diferentes fases de sorción en RDSE	63
Figura 39	Diagrama de flujo de la metodología desarrollada.	66

INDICE DE TABLAS

Tabla I	Compuestos estrogénicos y propiedades químicas	7
Tabla II	Condiciones cromatográficas y de espectrómetro de masa	26
Tabla III	Eco-escala analítica=100 total de puntos de penalización	34
Tabla IV	Tiempos de retención de iones seleccionados para modalidad SIM	39
Tabla V	Medición del pH desde el extracto acuoso	45
Tabla VI	Condiciones óptimas seleccionadas para la desorción	46
Tabla VII	Preparación de curvas de calibración en solvente, afluente y efluente	47
Tabla VIII	Evidencia de efecto matriz para afluente y efluente	49
Tabla IX	Diseño experimental para estudio de variable volumen(mL)	51
Tabla X	Perfil de extracción de hormonas para variable tiempo(min)	52
Tabla XI	Diseño experimental para estudio de variable velocidad(rpm)	54
Tabla XII	Resumen de las variables optimizadas en la metodología	56
Tabla XIII	Matriz dopada a diferentes niveles de concentración	57
Tabla XIV	Características analíticas del método: linealidad, rango dinámico LOD, LOQ y recuperación absoluta	58
Tabla XV	Características analíticas del método: factor de enriquecimiento y precisión	59
Tabla XVI	Concentración de hormonas determinadas en muestras reales	61
Tabla XVII	Puntos de penalización para la metodología desarrollada	62

ABREVIATURAS

E1	: Estrona
E2	: Estradiol
E3	: Estriol
EE2	: 17 α -Etinilestradiol
PCB77	: 3,3', 4,4'-Tetraclorobifenil.
SPE	: Extracción en fase sólida
SPME	: Microextracción en fase sólida
SBSE	: Extracción por sorción con barra de agitación
RDSE	: Extracción por sorción en disco rotatorio
BAmE	: Microextracción por sorción en barra
PDMS	: Polidimetilsiloxano
PDMS-DVB	: Polidimetilsiloxano-divinilbenceno
PA	: Poliacrilato
C18	: Octadecyl
OASIS HLB	: Divinilbenceno-N-Vinilpirrolidona
MSTFA	: N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
BSTFA	: N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
GC-MS	: Cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas
CL	: Corcho laminar
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 policíclicos aromáticos
PCBs	: Bifenilos policlorados
EDCs	: Compuestos disruptores endocrinos
%EM	: Efecto matriz

I. INTRODUCCIÓN.

Una gran variedad de compuestos químicos con una comprobada toxicidad aguda efectos carcinogénicos, mutagénicos han sido detectados en el medio ambiente y su presencia es el resultado de actividad antropogénica [1]. En estos últimos años los estudios se han centrado en otros grupos de contaminantes medioambientales que no han sido aún regulados (contaminantes emergentes), como los compuestos denominados disruptores endocrinos (EDCs) [2]. Figura 1.

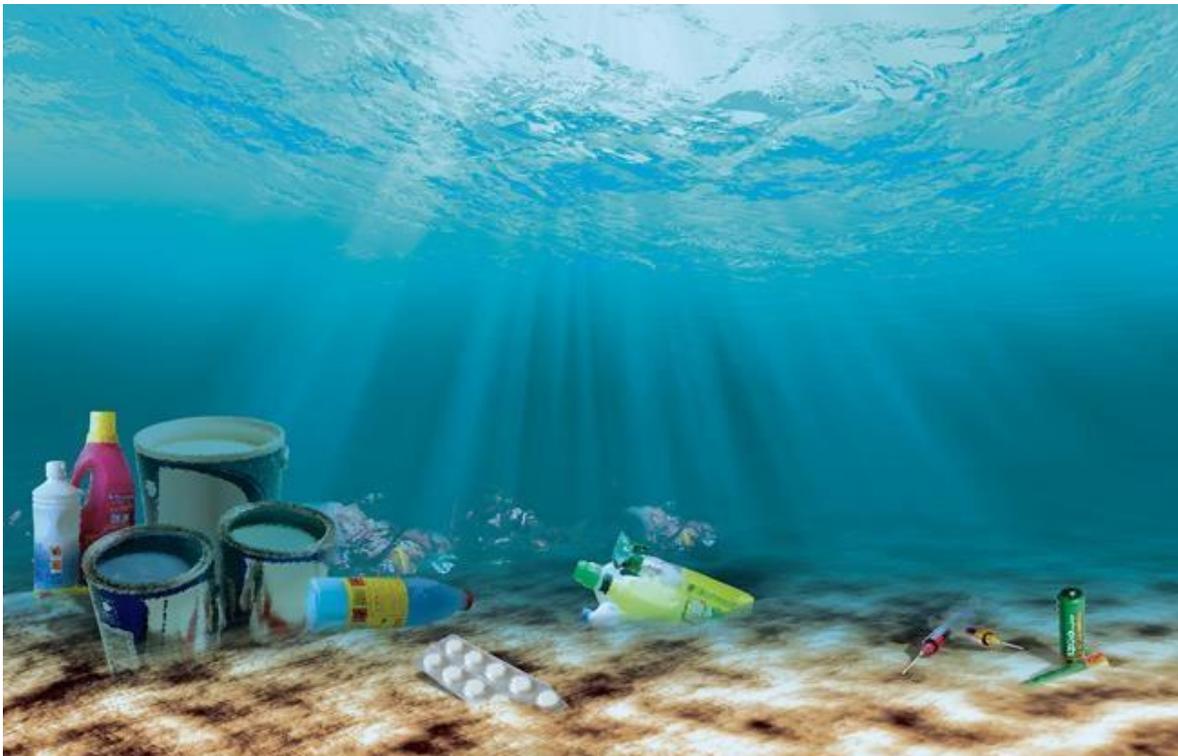


Figura 1. Aguas residuales urbanas y efluentes hospitalarios.

Estos son definidos por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) como agentes exógenos que interfieren en la producción, liberación transporte, metabolismo, unión o liberación de hormonas naturales en el cuerpo, responsables de mantener la homeostasis y la regulación del desarrollo de procesos biológicos.

Los EDCs son un extenso grupo de compuestos de origen natural y antropogénico asociado con diversas patologías en humanos como: cáncer de próstata, desórdenes del tracto reproductivo, bajo recuento de espermatozoide y cáncer de mama mientras que en organismos acuáticos se han detectado problemas como feminización infertilidad y hermafroditismo [2,4].

En este plano varios tipos de EDCs se han encontrado en el medio ambiente, aspecto considerado como una problemática de gran importancia, es por ello por lo que varias investigaciones comenzaron a centrarse en la exposición ambiental a estos compuestos [6]. Dentro de este grupo se encuentran los esteroides de origen natural como también una amplia variedad de compuestos sintéticos como pesticidas compuestos bromados retardantes de llamas, filtros ultravioletas, ftalatos, parabenos etc. [5,6].

Son encontradas en las aguas, ya que naturalmente el hombre las contiene, se producen en células específicas de los testículos, la corteza adrenal, ovarios y placenta. Los testículos serían los encargados de secretar, principalmente, testosterona (andrógenos), la corteza adrenal produce la aldosterona, cortisol y la DHEA (dehidroepiandrosterona), los ovarios producen los estrógenos que engloban el estradiol, 4-androsteno-3, 17-diona y la progesterona, y por último estaría la placenta que también secreta estradiol y progesterona, pero además produce otra sustancia, el estriol [8]. Igualmente existen hormonas sintéticas de amplio uso, entre las que se incluyen las píldoras anticonceptivas [9]. Tanto los estrógenos como los andrógenos se introducen al medio ambiente a través de los efluentes de aguas residuales de las plantas de tratamiento, donde no son eliminados completamente [9], y actúan como disruptores endocrinos [12].

Las hormonas estrogénicas naturales, son un grupo de compuestos sintetizados y secretados por humanos y animales de características lipofílicas bajo peso molecular y biológicamente activos. Los estrógenos derivan del colesterol, el cual contiene en su estructura cuatro anillos de carbono, tres ciclos hexanos y un ciclo pentano conformando la estructura principal de las hormonas esteroideas y sus derivados.

Así tenemos, por ejemplo: 17β -estradiol (E2), estrona (E1) y estriol (E3) Figura 2. Por otra parte, el 17α etinilestradiol (EE2), es el único estrógeno utilizado en las formulaciones de píldoras anticonceptivas, que son el método más utilizado en países del entorno europeo donde millones de mujeres hacen uso diario de este compuesto [13].

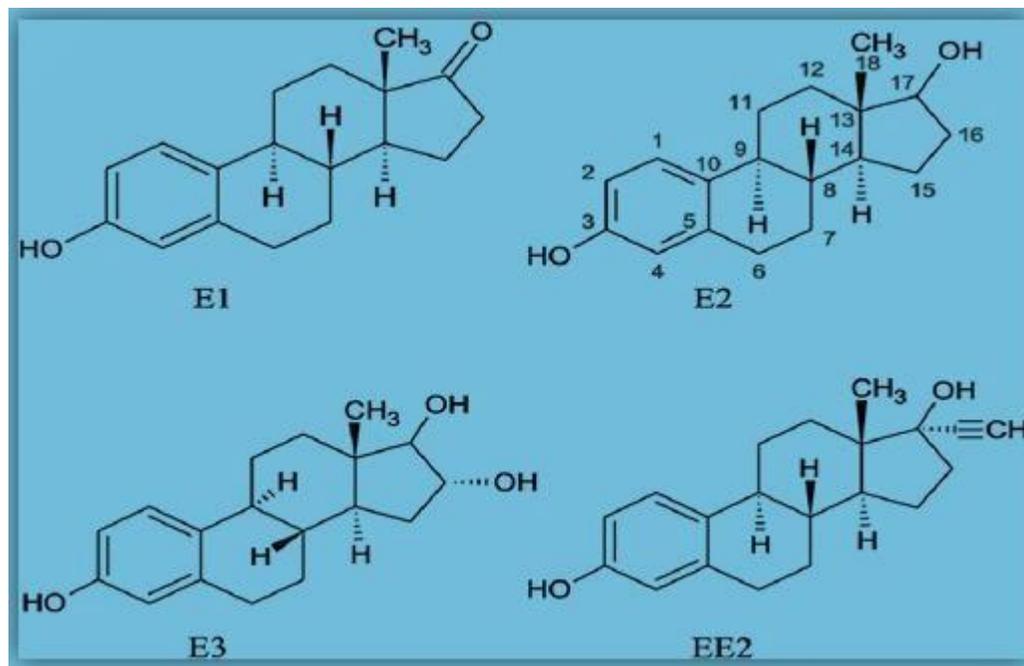


Figura 2. Estructura principal de las hormonas esteroideas.

Los estrógenos han sido utilizados para uso clínico en humanos, como para tratar los síntomas del climaterio en mujeres [14]. También han sido considerados promotores del crecimiento en humanos y animales, por lo que, fueron administrados en Estados Unidos por aproximadamente 50 años, para mejorar la eficiencia en la producción de carne animal [15], aunque actualmente no se utilizan tratamientos con hormonas sexuales en animales productores de leche en ese mismo país. E2 tiene un alto potencial endocrino, siendo el estrógeno más biopotente encontrado en matrices medio ambientales [17]. E2 es transformado en el organismo a E1, generando un equilibrio entre ellos, a su vez, ambos son metabolizados en el hígado.

La importancia general de estos estrógenos como factor de riesgo, se debe a que han sido asociados con el desarrollo de diversas enfermedades, en el caso de los peces, se han informado problemas como alteraciones sexuales, daños en el desarrollo y crecimiento, deficiencia renal, necrosis e incluso la muerte. Mientras que en humanos su atención se enfoca principalmente por sus efectos carcinogénicos **[18, 19]**.

La fuente de emisión de estrógenos hacia el medio ambiente proviene principalmente desde la industria farmacéutica y veterinaria (en la manufacturación de formulaciones que contienen hormonas, incluyendo los anticonceptivos), aguas residuales (excreción de drogas y/o sus metabolitos por humanos y animales), eliminación de drogas expiradas desde hogares (pequeña escala) y hospitales (mucho mayor escala). Estos compuestos confluyen en las plantas de tratamientos de aguas residuales, donde no son completamente removidos desde las aguas servidas, a causa de los ineficientes métodos de depuración para este tipo de compuestos **[20]**.

Se ha logrado determinar que las concentraciones de los estrógenos en afluentes y efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales y de los recursos hídricos superficiales van a concentraciones en partes por trillón (ppt), teniendo variabilidad en los valores si estas hormonas se encuentran en forma conjugada o libre al ser excretada en orinas o heces. Aun a estas bajas concentraciones pueden afectar el medio acuático **[32]**. Falta regular aún las máximas concentraciones de estas hormonas en aguas superficiales donde la legislación europea en el 2012 propuso incorporar 15 productos químicos a una lista de 33 contaminantes que deben ser monitoreados y controlados en aguas superficiales en la Unión Europea (EU), que son el diclofenaco, EE2 y E2 **[22]**.

Los tratamientos de aguas residuales empleando métodos convencionales no son del todo satisfactorios, al punto que se ha detectado que muchos compuestos persisten sin alteración alguna aún después de aplicar tratamientos terciarios **[33]**.

Por tal razón, es importante identificar y evaluar la eficiencia de otras tecnologías para el tratamiento de aguas, con el fin de proponer alternativas que permitan

minimizar la presencia de CE's un bajo costo económico, energético y ambiental. Además, debemos ser conscientes de que los contaminantes disruptores endocrinos, productos farmacéuticos y de cuidado personal poseen una amplia gama de propiedades químicas y, por lo tanto, el éxito de su eliminación varía mucho en función de sus propiedades particulares. Es así como los métodos de tratamientos para la eliminación de CE se pueden clasificar en tres categorías: fisicoquímicos, biológicos y avanzados **[35]**.

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 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) **[23] [35]**.

Según los datos bibliográficos mostrados en la tabla I, estos compuestos se pueden clasificar como hidrofóbicos, ya que sus constantes de partición octanol/agua, están entre 2,67 y 4,31 lo que nos indica que, para una extracción cuantitativa, se debería usar una fase sorbente con características apolares, que tenga adecuada afinidad para todos estos analitos en forma simultánea. **[53]**.

Por otra parte, con respecto a los valores de pKa, todos mayores a 9,6 nos indican que son compuestos que se comportan como ácidos débiles **[3]** por lo que, se encontrarán principalmente en su forma protonada en un amplio intervalo de pH, mientras que estarán en su forma disociada solo a valores de pH altamente alcalinos

La presión de vapor como la constante de Henry muestran que son compuestos no volátiles tanto puros como en solución, por lo que, en el tratamiento de muestra estos son estables en soluciones acuosas pudiéndose aplicar extracciones en solución y no en el espacio cabeza de la muestra, como también estos compuestos pueden ser

tratados con corrientes de nitrógenos en metodologías que incluyan llevar a sequedad soluciones en la que estos estén contenidos sin problemas de pérdidas del analito **[20]**.

Tomando en cuenta sus solubilidades en agua que van desde los 3,6 a 441 mgL⁻¹ muestran que, a pesar de tener características principalmente hidrófobas, pueden solubilizarse sin problemas en agua a concentraciones de ngL⁻¹ hasta los µgL⁻¹, más aún los respectivos metabolitos, que son metabolizados en la forma de compuestos hidroxilados para mejorar la solubilidad en orina **[11]**.

Es por lo anterior que estas propiedades son muy importantes tanto en la preparación de muestra como en la determinación analítica, ya que en etapas como separaciones, extracciones, limpieza o ionización, determinará el transporte, la forma y distribución del analito entre las distintas fases, por lo tanto, un buen control de los parámetros en que influyen estas propiedades determinará la calidad de la metodología analítica.

Debido a que los estrógenos poseen una baja presión de vapor, que va desde los $1,42 \cdot 10^{-7}$ a $4,5 \cdot 10^{-11}$ mm Hg para E1, E2, EE2 y E3 , es necesario llevar a cabo una etapa de derivatización química para producir compuestos de mayor volatilidad y poder determinarlos por GC-MS **[20]**.

La sililación es la metodología más común y versátil usada para derivatizar compuestos orgánico que contienen átomos de hidrógeno activo (Ej. -OH, NH, -NH₂, -SH, -COOH) resultando productos de reducida polaridad (menos interacciones dipolo-dipolo), mejorando la volatilidad e incrementando la estabilidad térmica necesaria para una óptima sensibilidad y resolución de varios compuestos en mezclas para análisis por GC-MS

Tabla I. Compuestos estrogénicos y propiedades químicas.

Compuesto	Masa molecular [g/mol]	pKa	LogKo/w	Presión de Vapor [mmHg]	Constante de Henry [atm.m ³ /mol]	Solubilidad En agua [mg/L ⁻¹]
Estrona(E1)	270.4 d	10.25 a	3.624 d	1.42 x10 ⁻⁷ c 2.3 x10 ⁻¹⁰ c	3.8 x10 ⁻¹⁰ c	30 b
17βestradiol (E2)	272.4 d	10.27 a	4.14 d	1.26 x10 ⁻⁸ c 2.3 x10 ⁻¹⁰ c	3.64 x10 ⁻¹¹ c	3.6 b
Estriol (E3)	288.4 d	10.25 a	2.527 d	1.97 x10 ⁻¹⁰ c 6.7 x10 ⁻¹⁵ c	1.33 x10 ⁻¹⁰ c	441 b
17α-etinilestradiol EE2	296.4 d	10.24 a	4.106 d	2.67 x10 ⁻⁹ c 4.5 x10 ⁻¹¹ c	79.4 x10 ⁻¹² c	11.3 b

Referencias: a) [3] b) [11] c) [20] d) [53].

El objetivo principal de este estudio es desarrollar una técnica para la preconcentración simultánea de 17β-estradiol (E2), estrona (E1) y estriol (E3) y el 17αetinilestradiol (EE2), utilizando como fase sorbente la lámina de corcho, esto a partir de muestras de acuosas y su determinación por (GC-MS). Figura 3.



Figura 3. Esquema general para el objetivo de este estudio.

1.1 Preparación de la Muestra.

Estudios han reportado la presencia de estrógenos en diferentes matrices a concentraciones del orden de ngL^{-1} y hasta de μgL^{-1} . La determinación analítica de estos compuestos químicos ha variado de acuerdo con la tecnología e implementación disponible por parte de los investigadores. Actualmente, las metodologías que utilizan cromatografía logran determinar los estrógenos en forma individual [16].

Las hormonas 17β -estradiol, 17α -etinilestradiol y estriol se han determinado en diversas matrices como el suelo [36], aguas superficiales costeras [37], aguas residuales [38,17,44], agua de río [39], sedimento fluvial [17], leche [40,51], carne [41], orina y cabello [42].

Se han aplicado diferentes técnicas modernas de preparación de muestras para el aislamiento de los analitos de estas muestras, incluida la extracción en fase sólida [43] [37] [41] [17] [32] [44] [45] [50], stir-bar extracción por sorción [26] [46], microextracción en fase sólida [48] [49], microextracción de barra de fibra hueca y disolvente [51] y polímero microextracción de fibra hueca revestida [52].

El Pretratamiento de la muestra, varía principalmente de acuerdo con el tipo de matriz y concentración en que están contenidos estos compuestos. Para muestras como agua potable, agua de río y agua residual, en general se requiere de una etapa de extracción, aguas de río han sido acidificadas entre pH 2,5 y 3 con ácido clorhídrico concentrado para prevenir la actividad bacteriana, principalmente sobre los estrógenos conjugados. [14, 17], adicionalmente son filtradas por membranas de celulosa $0,45 \mu\text{m}$ [20] o fibra de vidrio [6] para eliminar partículas que puedan taponar dispositivos de extracción como la extracción en fase sólida.

Para la extracción de estos compuestos desde su matriz original, se han utilizado varias técnicas analíticas, que se caracterizan por contribuir con los principios de la química verde, usando pequeñas cantidades de disolventes orgánicos en etapas de acondicionamiento, extracción y limpieza, las técnicas más utilizadas corresponden

a la extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME) y extracción por sorción en barra de agitación (SBSE).

La extracción en fase sólida es una potente y simple técnica de extracción y/o limpieza de muestras, rápida y económica. Esta se basa en la partición selectiva, de uno o más compuestos entre dos fases, una de las cuales es un sólido adsorbente. La segunda fase suele ser un líquido, pero también puede ser una emulsión, un gas o un fluido supercrítico. SPE permite la preconcentración de la muestra con un riesgo mínimo de pérdida o contaminación Figura 4. El componente de interés resulta retenido en una fase sólida que puede ser de diferentes características abarcando un amplio espectro de polaridades. Los contaminantes de la matriz son eluidos en una etapa de lavado posterior disminuyendo el efecto matriz. Esta técnica ha sido utilizada en diversos estudios [6, 21, 23, 24, 25] siendo la más utilizada para la determinación de estrógenos desde muestras líquidas.

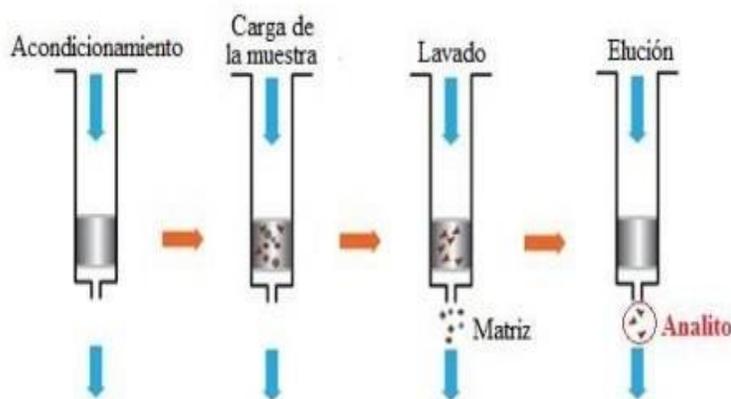


Figura 4. Esquema de extracción en fase sólida (SPE).

Otra técnica que se ha utilizado, aunque no tan ampliamente como SPE, es la microextracción en fase sólida (SPME), esta técnica se comenzó a desarrollar en el año 1989 [27], Figura 5, tiene la ventaja de prácticamente no utilizar disolventes orgánicos, ya que, en determinadas aplicaciones en HPLC, se usa desorción en línea con pequeñas cantidades de disolvente.

SPME permite la preconcentración de los analitos mediante la exposición de una fibra de sílice fundida, recubierta con una película de Polidimetilsiloxano (PDMS) u otro sorbente apropiado, directamente en la muestra, o en el espacio cabeza por un tiempo determinado, luego la desorción del analito se realiza normalmente mediante desorción térmica directamente en el inyector de un cromatógrafo de gases. La evolución de SPME en el último tiempo ha sido notable, para mejorar la capacidad de esta técnica, se han propuesto diferentes polímeros y de espesor variable [28]. Se han descrito diversos sorbentes para su uso como polidimetilsiloxano (PDMS), polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB) y poliacrilato (PA), dependiendo de la polaridad del analito. Uno de los inconvenientes de SPME es la pequeña cantidad de PDMS que se usa como recubrimiento (alrededor de 0,5 μL), lo que implica que una extracción cuantitativa sea obtenida para compuestos de una muy baja polaridad; lo que implica que un número limitado de compuestos puedan extraerse mediante esta técnica con PDMS como fase sorbente. Sin embargo, se ha logrado la determinación de compuestos estrogénicos desde muestras de orina y leche mediante esta técnica [29].

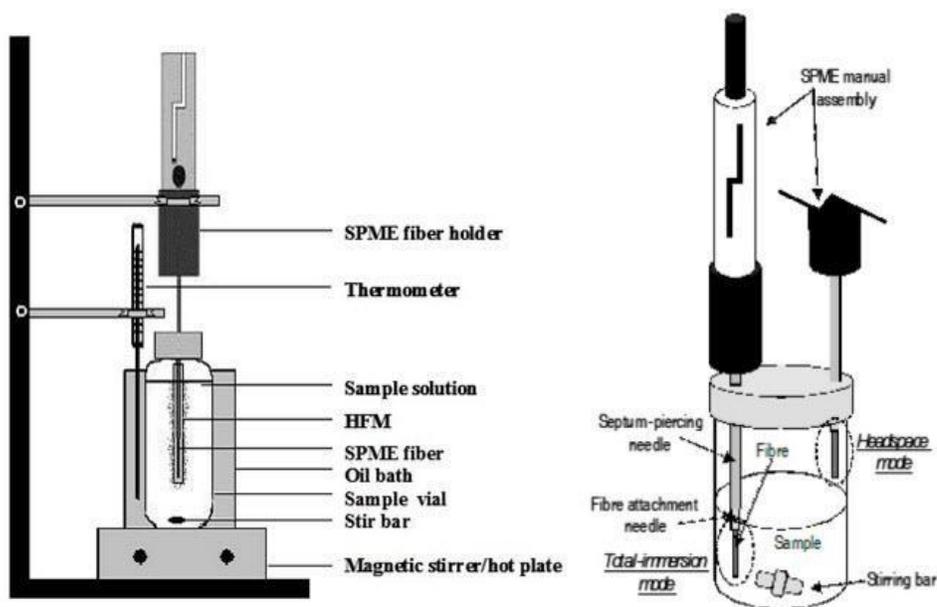


Figura 5. Esquema microextracción en fase sólida (SPME) por ID y head space.

En 1999 la extracción por sorción en barra de agitación (SBSE), Figura 6 fue introducida como una novedosa técnica de preparación de muestra. Aquí los analitos son extraídos desde la matriz, generalmente acuosa, a una fase líquida no miscible, preferentemente de PDMS, debido a que sus propiedades la hacen una fase estacionaria termoestable y con buenas propiedades de difusión. La técnica de SBSE se basa en los principios de la SPME, aunque en vez de utilizar una delgada fibra como material sorbente (0,5 μL de PDMS), ésta consiste en una barra de agitación recubierta con material sorbente equivalente a cantidades desde los 50-300 μL de PDMS, por lo cual se mejora la eficiencia, ya que, se favorece el equilibrio de partición PDMS-agua, alcanzando al menos una sensibilidad 100 veces mayor que SPME. Esta técnica permite la extracción cuantitativa de analitos con una constante de partición octanol/agua (K_{OW}) mayor que 500 [33], mientras SPME permite una extracción cuantitativa de compuestos con un K_{OW} de 105 en adelante. SBSE ha sido utilizada en la extracción de diversos compuestos químicos como también para hormonas estrogénicas [26, 30 ,31].

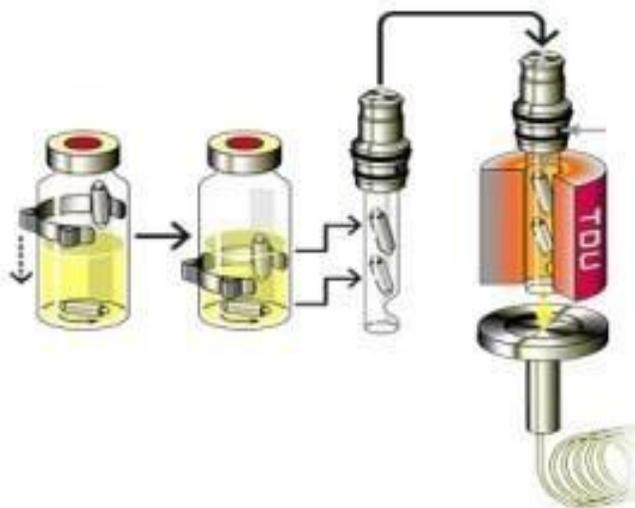


Figura 6. Esquema extracción por sorción en barra de agitación (SBSE).

Las desventajas de esta técnica de extracción son que comercialmente solo es producida con PDMS como material sorbente, una velocidad de agitación sobre los 600 rpm puede causar daño físico en la fase, debido al contacto directo de la barra con el fondo del vial de extracción [36], la relación área volumen no es muy favorable y cada unidad tiene un alto costo.

Hace algunos años basándose en la tecnología de biorreactores rotatorios [54] [55], se desarrolló la técnica de (RDSE), con la finalidad de mejorar aquellas desventajas de las mencionadas técnicas de extracción. Esta consiste en un disco de teflón con una mini barra magnética en su interior, inicialmente cubierto con una fase sorbente de PDMS, nylon o de octadecyl (C18) inmovilizada en una de sus superficies. Este dispositivo se ha modificado utilizando una lámina de corcho fijada en la superficie plana del disco de teflón, con cinta doble de contacto o camisa como muestra la Figura 7 [56].

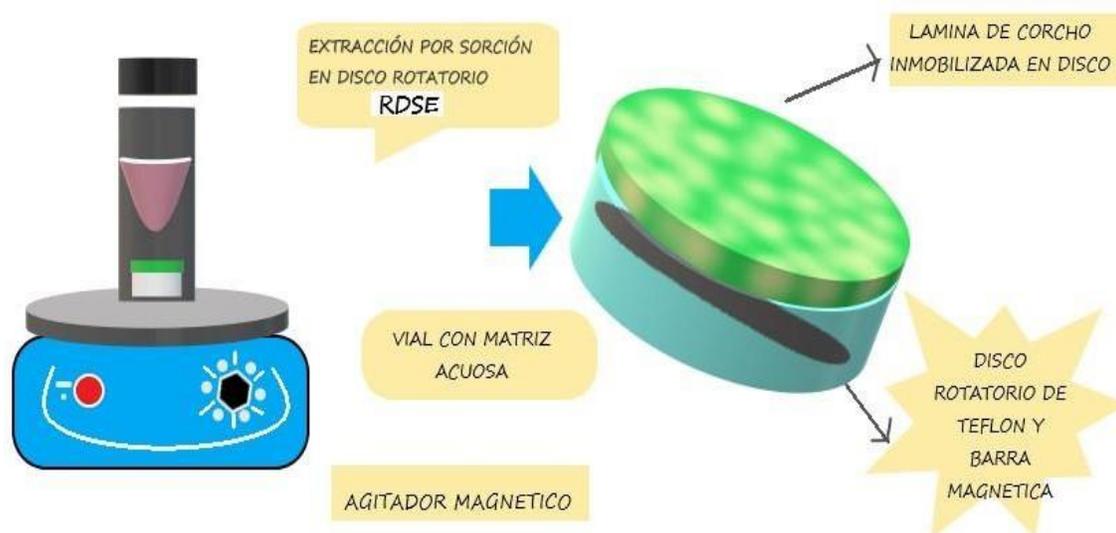


Figura 7. Microextracción por sorción en disco rotatorio utilizando corcho laminar.

El disco tiene una fase con alta razón superficie/volumen y puede rotar a más altas velocidades comparada con la barra de agitación utilizada en SBSE, sin que esta se dañe, ya que únicamente estará en contacto con la muestra y no con el fondo del vial, como se muestra en Figura 8.

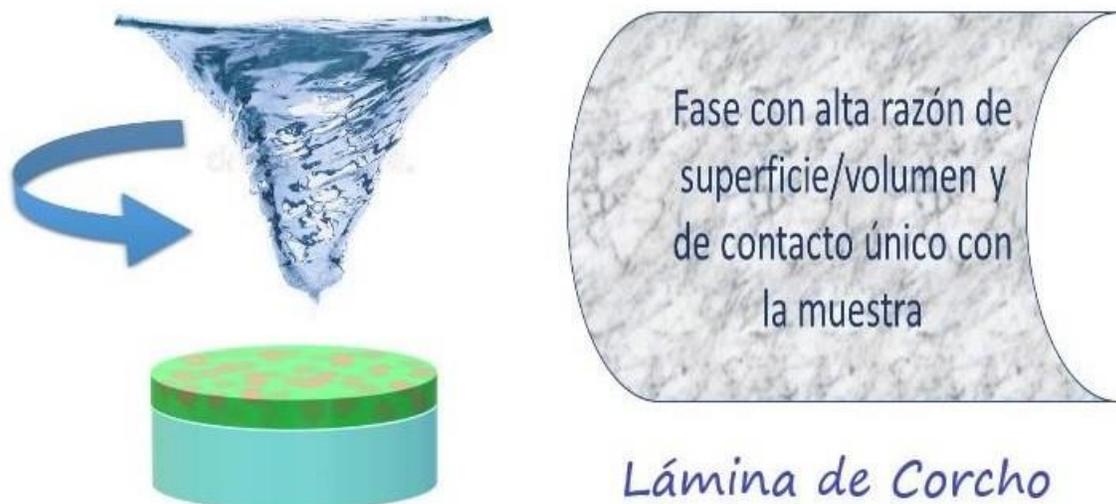


Figura 8. Disco de teflón y corcho laminar como fase de extracción.

El PDMS es una fase sorbente que ha demostrado funcionar de manera adecuada para compuestos químicos de baja polaridad, sin embargo, existen otras fases que extraen eficientemente compuestos de polaridad intermedia, como Oasis HLB y divinilbenceno-estireno.

Ya existen trabajos previos con la técnica del RDSE, aplicada en una gran variedad de determinaciones analíticas como pesticidas, triclosán, PAHs, nonilfenol, antiinflamatorios, hormonas, entre otros y además desarrollados en diversas matrices como agua, plasma y orina [63] [64].

1.2. Corcho: Propiedades y antecedentes.

Del corcho conocemos que es la corteza del alcornoque (*Quercus súber*) y es un material natural, renovable y biodegradable. Material compuesto principalmente por biopolímeros hidrófobos:

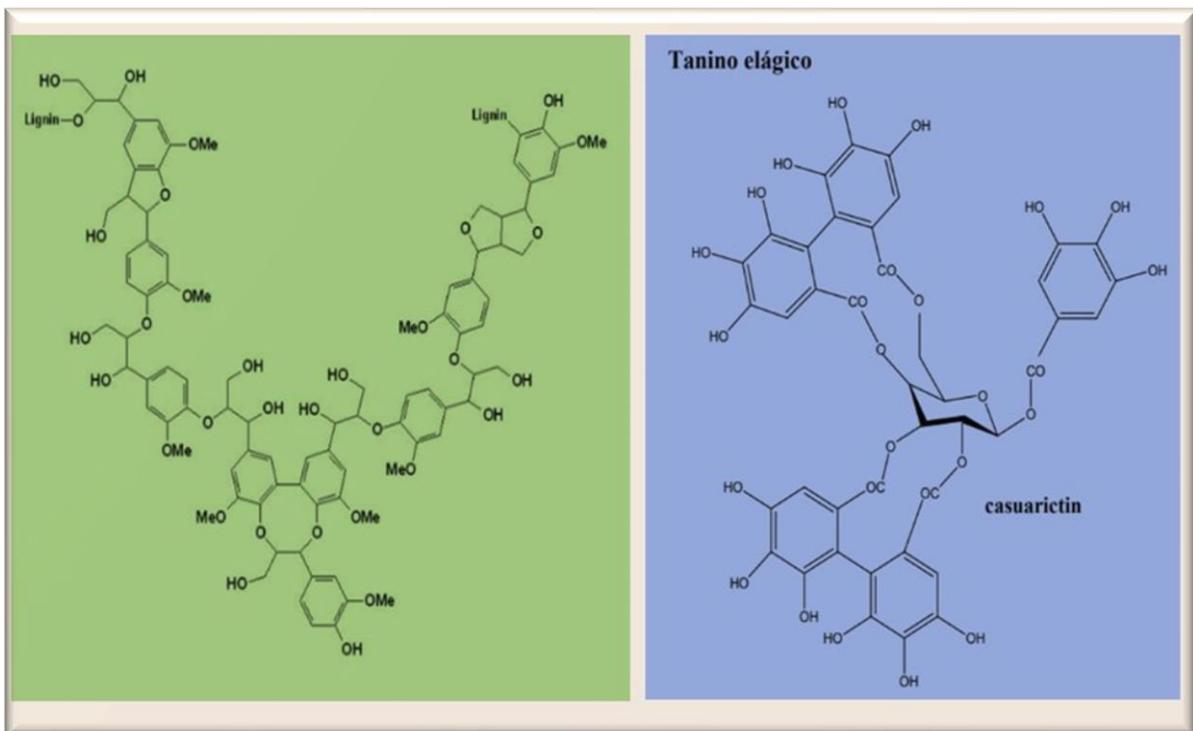


Figura 9. Fragmento de molécula de lignina y tanino.

Suberina (40%), lignina (24%) y polisacáridos (20%) (celulosa y hemicelulosa), ceras y otros compuestos (15%) [60][61] Figura 9.

La suberina es una macromolécula de alcoholes grasos acoplados a ésteres, ácidos grasos y diácidos, ácidos grasos hidroxilados y glicerol, qué incluye también ácido ferúlico y eventualmente otros componentes fenólicos. El contenido de suberina varía según la especie, es decir 40% en *Quercus súber*, 29% en *Quercus cerris*, 53% en *Pseudotsuga menziesii*, 5% en *Calotropis procera*, 45% en *Betula pendular*, 48% en *Fagus Sylvatica* y 43% en *Castanea sativa* [62].

Pocos son los trabajos realizados con este sorbente entre los que destaca la cuantificación mediante cromatografía de gases monitorización-espectrometría de

masa (GC-SIM-MS) para la determinación de PAHs, mediante la técnica de SPME de inmersión directa (DI-SPME), técnica adecuada para los PAHs, ya que tienen baja volatilidad. La eficiencia del corcho se comparó con otras fibras comerciales Figura 10, donde fue superior, excepto para los analitos menos volátiles, de todos modos, hay que señalar que la fibra de corcho extrajo todos los compuestos de PHAs lo que no fue posible con las otras fases [58].

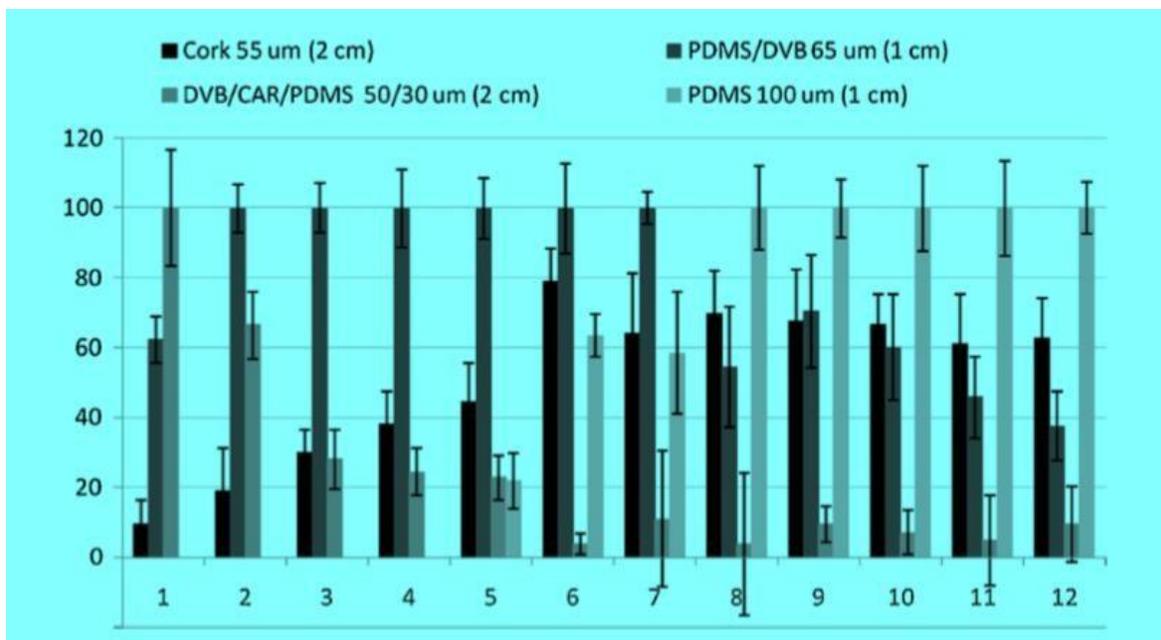


Figura 10. Comparación de las respuestas obtenidas utilizando diferentes fibras (Corcho, DVB / CAR / PDMS y PDMS) en análisis de PAHs en aguas de río por DI-SPME. [58]

Analitos: 1.-Acenaftileno; 2.-Fluoreno; 3.-Fenantreno; 4.-Antraceno; 5.-Pireno; 6.- Benzoantraceno 7.-Criseno; 8.- Benzo (b) fluoranteno; 9.-Benzo (k) fluoranteno; 10.-Benzo(a) pireno 11.-dibenzo (a, h) a, 2,3, [c, d] pireno; 12.-benzo (g, h, i) perileno.

En otro caso se utilizó el corcho como recubrimiento en la microextracción por adsorción en barra (BAME) en la determinación de Benzofenona, triclocarban y parabenos en muestras acuosas por HPLCeDAD.

Algunas ventajas del procedimiento BAmE son el volumen de sorción reducido, que puede ser de 30 a 100 veces menor que el eluato en SPE, no es necesario el secado del volumen final del disolvente con corriente de nitrógeno. Esta técnica acoplada al corcho se ha utilizado para compuestos polares y de polaridad intermedia [57] [58].

Las barras de BAmE se aplicaron con éxito para la extracción de parabenos, benzofenonas y triclocarban en muestras de agua, donde de obtuvieron recuperaciones entre 65% y 123% y con una DSR del 3 al 22%, Figura 11.

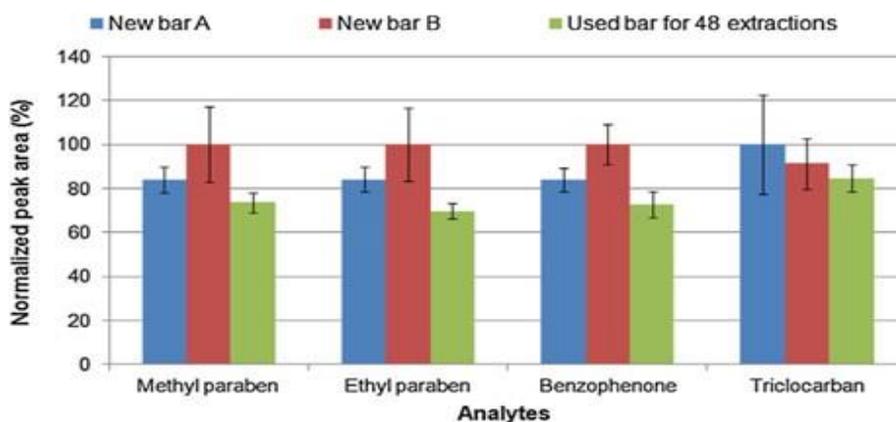


Figura 11. Reproducibilidad en la producción de las barras BAmE con corcho y evaluación de la eficacia de la barra utilizada. Condiciones BAmE: 15 mL de agua ultra pura enriquecida con 600 mg L⁻¹ de analitos, muestra de pH de 5.5, 25% de NaCl, tiempo de extracción de 1.5 h desorción líquida con 250 mL de ACN: MeOH (50:50, v / v) durante 30 min. [59].

1.3 Determinación y cuantificación de la muestra.

Para nuestro estudio, una vez lista la muestra se aplicó la metodología analítica propuesta donde destaca la cromatografía de gases acoplada al espectrómetro de masa (GC-MS), siendo esta una de las técnicas más utilizadas para la determinación de este tipo de analitos en matrices acuosas, al ofrecer mayor especificidad y sensibilidad a pesar de la complejidad de la muestra y características de los analitos como son su baja volatilidad o elevado peso molecular.

El detector selectivo de masa MSD es un sistema de detección cromatográfico, pero además es un dispositivo "vidente" que a través de un espectro de masas (junto con los índices de retención cromatográfico) permite elucidar la estructura del analito.

La GC-MS ofrece límites de detección mucho más bajos que la LC-MS, siendo esta técnica muy eficiente en selectividad ayudando a evitar falsos positivos en matrices complejas [65].

La GC-MS es un instrumento de alta sensibilidad y bajos límites de detección en muestras complejas, pero se vio inicialmente condicionada en el análisis de compuestos de baja volatilidad como los esteroides, pero esto fue solucionado mediante reacciones de sililación utilizando agentes derivatizante en compuestos orgánicos que contengan hidrógenos activos (grupo -OH de los estrógenos) obteniendo así productos de baja polaridad y de mayor volatilidad acompañado de una estabilidad térmica lo que es muy favorable para análisis por GC-MS. Además, se mejoran las propiedades de espectrometría de masa mediante la producción de patrones de fragmentación específicos.

Estas hormonas pueden ser sililadas mediante reactivos como: N, O-bis-(trimetilsilil)- trifluoroacetamida (BSTFA) o N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) Figura 12, y haciendo uso además de catalizadores para favorecer la reacción de derivatización, como el caso de la N, N-dimetilformamida o piridina [66].

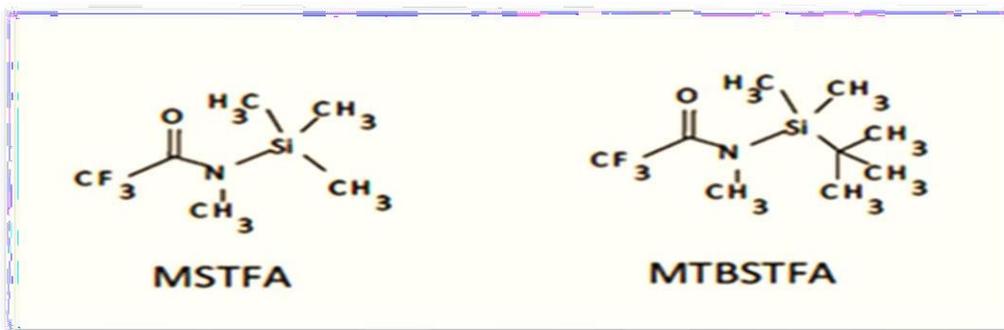


Figura 12. Reactivos utilizados como derivatizantes en la extracción de hormonas estrogénicas.

1.4 Analitos modelo.

Las hormonas fueron seleccionadas como analito modelo para este estudio, primeramente, por su efecto nocivo sobre los organismos expuestos aun a muy bajas concentraciones (ngL⁻¹) y debido a las propiedades fisicoquímicas de estos compuestos, donde se ve favorecida su interacción con la fase, incrementando la eficiencia de la extracción. Esto lo podemos observar en trabajos realizados anteriormente, para la extracción de hormonas utilizando como fase: oasis HLB, que tiene un comportamiento similar a la lámina del corcho, donde destaca su propiedad lipofílica-hidrofílica, con resultados de alta eficiencia y recuperaciones de hasta un 86%. Estas hormonas en estudio corresponden a: Estrona (E1); Estradiol (E2); Estriol (E3) y la hormona sintética de uso anticonceptivo 17 α etinilestradiol. Figura13.



Figura 13. Analitos modelo del Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemania).

II. HIPOTESIS

Basándonos en la información bibliográfica, la determinación de los estrógenos, son de gran importancia debido a que las principales fuentes de estos son los efluentes domésticos, los que llegan a las plantas de tratamiento y pueden generar diversos problemas en el ecosistema acuático, afectando considerablemente la salud humana.

Particularmente los compuestos estrogénicos son disruptores endócrinos que están presentes en matrices ambientales y biológicas en concentraciones desde los pgL^{-1} a los μgL^{-1} . Entonces es necesaria su cuantificación para obtener la información de los niveles de exposición a los que se encuentra el ecosistema.

Por lo que postulamos:

“La microextracción por sorción en disco rotatorio (RDSE) Figura 14, utilizando como fase sorbente el corcho laminar y unido a un equipo de cromatografía de gases acoplado a un detector de masas (GC-MS) permitirá la determinación y cuantificación de los compuestos estrogénicos (estrone E1; 17β -estradiol E2; estriol E3 y 17α -etinilestradiol EE2).

Además, el corcho como fase sorbente, al tener una estructura química compleja y variada, donde destaca la suberina como una macromolécula de alcoholes grasos acoplados a ésteres, compuestos fenólicos, lignina y polisacáridos, entre otros, ofrecerá una alta posibilidad de afinidad o enlace con los analitos.”



Figura 14. Proceso de extracción en agitación magnética a 2000 rpm (Metodología RDSE).

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General.

Desarrollar un método analítico verde para la determinación de hormonas, desde aguas residuales provenientes de distintos sectores de la región metropolitana, mediante extracción por sorción con disco rotatorio (RDSE) utilizando corcho como fase sorbente y optimizando este proceso, para su posterior determinación y cuantificación mediante cromatografía gaseosa acoplada a un detector de masas (GC-MS).

3.2 Objetivos Específicos.

- ✚ 1.- Implementar un proceso de derivatización para las hormonas en estudio con el fin de optimizar un método con (GC-MS) y en lo posible aumentar su sensibilidad en la detección de masas.
- ✚ 2.-Identificar los compuestos en modalidad full scan a través de estándares mediante (GC-MS).
- ✚ 3. Desarrollar un método cromatográfico para los analitos, por medio del monitoreo selectivo de iones (SIM).
- ✚ 4.-Optimizar variables químicas e hidrodinámicas que podrían influir en la extracción de estos compuestos por RDSE, con corcho como fase sorbente, desde las matrices acuosas.
- ✚ 5.-Determinar las propiedades analíticas del método incluyendo su ecoeficiencia.
- ✚ 6.-Aplicar el método desarrollado para la determinación de los analitos en muestras reales.
- ✚ 7.-Analizar e interpretar resultados

IV. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.

4.1. Reactivos.

- Acetato de etilo, acetona y metanol grado HPLC, Merck (Darmstadt, Germany).
- H₂O (Milli-Q). (Millipore, Bedford, MA, USA)
- Agente derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) Sigma Aldrich (Milwaukee, WI, USA).
- Piridina, Merck (Darmstadt, Germany)
- Nitrógeno extra puro $\geq 99,995\%$, Linde (Santiago, Chile).
- Helio extra puro $\geq 99,9999\%$, 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).
- Estándar "surrogate": (20,21)-¹³C₂-17 α -etinilestradiol (99%) de 100 mgL⁻¹ Cambridge Isotope Laboratories, Inc (USA).
- Estándar interno: 3,3', 4,4'-Tetraclorobifenil (PCB 77), Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany)

4.3. Materiales.

Fase sorbente: hoja de corcho aglomerado con granos de 0.5 mm a 1mm (Corchos Chile.Ltda) Santiago.

- Jeringas de Inyección Hamilton de 10, 50, 100 y 1000 μ L.
- Discos de teflón con cavidad y planos de 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 μ m, Rilab.

4.4. Instrumentos y Equipos.

Se utilizó un cromatógrafo de gases Thermo Scientific Trace 1300 (Milán, Italia) acoplado a un detector selectivo de masas Thermo Fisher Scientific ISQ (Austin, TX, EE. UU.) (GC-MS) para optimizar los procesos y analizar las muestras reales. La columna capilar de sílice fundida utilizada fue un RTX-5MS Restek (Bellefonte, PA, EE. UU.) (30 m 0.25 mm i.d; 0,25 mm de espesor de película) recubierto con 5% de fenilo y 95% metilpolisiloxano

El vaso de precipitados que contiene la muestra y el disco giratorio se colocó en un agitador multicanal Lab Companion MS-52 M con diez posiciones y una velocidad de rotación entre 30 y 2000 rpm (Jeio tech Co., Ltd., Geumcheon-gu, Seúl, Corea).

Se empleó un mezclador de vórtice KMC-1300V (Vision Scientific Co., Ltd., Corea) y un evaporador de bloque de calor analógico (VWR, EE. UU.) Durante el proceso de evaporación del extracto.

Se utilizó el software estadístico (Statgraphics Centurion XV para Windows; Manugistics, Rockville, MD, EE. UU.) Para el análisis de varianza (ANOVA).

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.
- Refrigerador, GM-B471 UVB, LG
- Estufa WTC Binder.
- Vortex mixer KMC-1300V.
- Bloque de calor VWR, U.S.A.

Microscopio con focal Zeiss LSM 780 espectral con un diodo láser de 405 nm y un 25 \times / 0.5 objetivo.

Espectrómetro Nicolet iS5 FTIR equipado con un divisor de haz KBr / Ge y un Detector de sulfato de triglicina deuterado de alto rendimiento.

V. METODOLOGÍA

5.1 Identificación de analitos modelo mediante GC-MS.

Se utilizaron estándares de 1mgL^{-1} de cada una de las hormonas para realizar inicialmente un barrido de masas completo (modalidad scan) en un rango de 50-550 m/z seleccionando dos iones representativos de alta abundancia para cada hormona. Y luego se realiza un monitoreo selectivo de iones (SIM) con los iones seleccionados en modalidad scan. Siendo el ion de mayor abundancia para cuantificar (target ion) y el de menor abundancia para confirmación más acertada de los compuestos (qualifier ion).

Se utilizaron aguas residuales, Figura 15 provenientes de las plantas de tratamiento de la región metropolitana: Efluente compuesto Planta Mapocho Trebal.

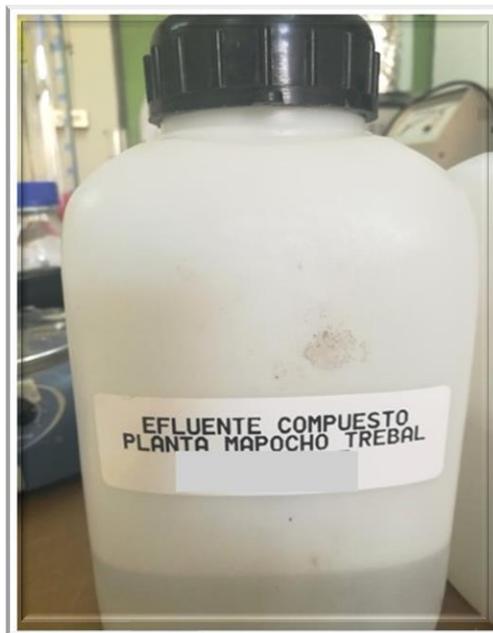


Figura 15. Muestra de efluente proveniente de planta mapocho trebal de la Región Metropolitana.

Como blanco para el estudio utilizaremos agua ultra pura enriquecida con una concentración de analito conocida, se utilizará para ello estándares de alto grado de pureza ($\geq 99\%$).

5.2 Condiciones GC-MS.

En la tabla II, se resumen las condiciones cromatográficas, así como del espectrómetro de masa optimizadas.

Tabla II. Condiciones cromatográficas y de espectrómetro de masas.

Cromatógrafo de Gases	Espectrómetro de Masas
Volumen de inyección: 2 μL	Tipo de Fuente: Ionización Electrónica (EI)
Modo Inyección: Splitless	
Temperatura del inyector: 250°C	Analizador: Cuadrupolo Simple (ISQ)
Rampas de calentamiento:	Temperatura línea de transferencia: 300°C
$C_0 = 75^\circ\text{C} \times 1 \text{ min}$	Temperatura de la fuente: 300°C
$C_1 = 250^\circ\text{C} \text{ a } 25^\circ\text{C min}^{-1} \times 1 \text{ min}$	Tiempo de permanencia: 0,2 s x cada m/z.
$C_2 = 300^\circ\text{C} \text{ a } 10^\circ\text{C min}^{-1} \times 4 \text{ min}$	Solvent delay: 7 min
Gas de Arrastre: Helio (He)	
Flujo: 1 ml min^{-1}	
Tiempo de análisis: 18 min	

5.3 Derivatización Analitos modelo.

La derivatización de los analitos es el proceso previo a su respectivo análisis por GC-MS. El volumen de 5 mL obtenido en la desorción se evaporó a sequedad a una T° de 40-45 °C y por medio de una corriente de nitrógeno. Al eluato seco se agregó 50 µL de derivatizante N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA) y 50 µL de piridina. Esto se sometió a temperatura de 80°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.

Se realizaron las optimizaciones de las variables que se considera puedan interferir directamente en la extracción de los analitos en estudio: pH, fuerza iónica y volumen de solvente de elución, para caso de las variables químicas; así también velocidad de agitación, volumen de muestra y perfil de extracción para el caso de variables hidrodinámicas.

5.4.1 Variables Químicas.

5.4.1.1 pH.

Para este estudio no fue necesario modificar el pH, ya que en las mediciones realizadas a las muestras después del proceso de extracción, dieron valores con rangos entre 7.39 a 7.55. Pues está demostrado que, en la extracción de hormonas, la señal es constante, con un máximo entre pH 2 a 8 [64] y disminuye a un pH más alto, debido a la desprotonación del grupo –OH, que forma un anión y disminuye su interacción con la fase sorbente. Entonces las formas no disociadas se extraen mayormente.

Esto es consistente con el valor de pKa que fueron cercanos a 10 en todas las hormonas estudiadas.

5.4.1.2 Fuerza Iónica.

Algunos modificadores de matriz como solventes o sales son utilizados en algunos casos para influir en la eficiencia de un proceso de extracción o mejora la eficiencia de la extracción de un analito dependiendo su polaridad. Estudios previos han demostrado que ni el metanol, ni el NaCl afectan o favorecen la extracción de hormonas [61], esto por que poseen una polaridad intermedia.

5.4.1.3 Volumen de solvente y desorción.

Una vez extraídos los analitos en el corcho laminar, nuestra fase seleccionada, es necesario desorberlos con un solvente óptimo y determinar el volumen necesario del mismo. Esto ya fue definido en trabajos anteriores en la determinación de hormonas, pero utilizando otras fases [64] y se evaluó la eficiencia con respecto al área relativa a diferentes tiempos y volúmenes de solvente definiéndose al metanol como solvente y 5 mL el volumen necesario para la desorción, dejando establecido como tiempo óptimo para la desorción 15 minutos.

5.4.1.4 Fase sorbente (corcho laminar).

En este caso la fase sorbente, fue tratada inicialmente con un volumen de 5mL de MeOH, por 10 min a 2000 rpm. Este volumen es reciclado y se realiza el mismo procedimiento con H₂O ultra pura, en las mismas condiciones. Además, se trabajó también en la elección entre corcho laminar, corcho pulverizado y tamizado y el tipo de disco a utilizar, esto es entre disco plano y disco con cavidad Figura 16.

El área de la fase es un factor importante para una sorción eficiente, así cuando el área es mayor facilita el transporte de masa desde la matriz a la fase, y se incrementa significativamente la cantidad de analito extraído, a diferencia de una fase con área menor, cómo en el caso del disco con cavidad.



[a]

[b]

Figura 16.- a) Disco con cavidad conteniendo fase en polvo.

b) Disco con cavidad y plano con fase laminar.

El diámetro de la fase laminar de corcho en un disco con cavidad se reduce a 10 mm, mientras que en disco plano alcanza los 15 mm que ofrece mayor área de adsorción.

5.4.2 Variables Hidrodinámicas.

Con el corcho laminar como fase sorbente optimizada y estándares de hormonas, se realizaron las siguientes optimizaciones.

5.4.2.1 Perfil de extracción.

Se realizó un experimento univariado con volúmenes de 20 mL de agua MilliQ en cada caso y concentraciones de estándar también constantes y se varió los tiempos de extracción en rangos desde 15 min a 120 min.

5.4.2.2 Volumen de muestra y velocidad de extracción.

Paralelo al perfil de extracción y con el tiempo de extracción óptimo (45 min), fueron realizados experimentos univariado para cada caso. Por ejemplo, utilizando diferentes volúmenes de matriz, de 20 - 60 mL y manteniendo las concentraciones de analitos constantes (5ppb), la extracción fue realizada durante 45 min.

Para la optimización de la velocidad de extracción, se midió volúmenes de muestra de 20 mL para todos los casos y concentración de analitos constante. Las extracciones se realizaron a diferentes velocidades en rangos de 0 a 2000 (rpm).

5.5 Pretratamiento de la fase y del disco.

El corcho laminar seleccionado para este trabajo, es granular y procesado, lo cual otorga una porosidad importante en su estructura y posiblemente podría contener partículas o sólidos adheridos a su superficie, que pueden interferir en el proceso, especialmente generando ruidos en el análisis de GC-MS. Tanto los discos de teflón y las láminas de corcho fueron sometidas a limpieza por ultrasonido, Figura 17 inicialmente con volúmenes de H₂O MilliQ durante 3 sesiones de 60 minutos cada una y luego con metanol igualmente 3 sesiones, pero de 30 minutos esta vez.



Figura 17. Fase de corcho laminar sometido a limpieza por ultrasonido.

Este proceso se realizó hasta la desaparición del color amarillo lixiviado, para luego secar la fase de corcho en un horno a 50°C durante 30 min. Antes de la extracción al disco que contiene la fase de sorción se colocó en el interior de un vaso de precipitado y se acondicionó con metanol y H₂O MilliQ con agitación de 2000 rpm durante 5 min. Se llevaron a cabo ensayos en blanco para evaluar una posible contaminación de los componentes solubles del corcho y de la cinta de doble cara que fija la fase al disco.

5.6 Caracterización de la lámina de corcho.

Independientemente de la especie de corcho, sus componentes principales son siempre proporciones variables de suberina, lignina y polisacáridos (celulosa) [62],

que se han descrito como sustancias absorbentes para compuestos orgánicos. La hoja de corcho utilizada en esta aplicación se caracterizó por microscopía de escaneo láser confocal (CLSM), con espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FTIR) y microscopía electrónica de barrido (SEM). Esta caracterización fue necesaria porque se utilizó un corcho aglomerado (procesado) por primera vez en este estudio. En este contexto, es importante eliminar la presencia de otros aditivos utilizados en el proceso de aglomeración. Con la evidencia dada, podemos confirmar la ausencia de aditivos y la aparición de interacciones de sorción entre analito y componentes de corcho.

5.7 Reutilización de la Fase.

Para nuestro trabajo no se ha reutilizado la fase de corcho laminar, por ser un material de fácil adquisición, muy bajo costo y biodegradable. Aun así, sabemos que existen fibras comerciales que se pueden reutilizar 50-100 veces, mientras que las fibras de corcho (molido) se podrían utilizar hasta 40 veces [58] en procedimientos de extracción, es decir tiene una vida relativamente corta, pero debemos considerar que el acoplamiento de la fase en el disco es fácil, económico rápido y reproducible.

5.8 Validación del método analítico.

Para validar el método de determinación de hormonas en muestras acuosas, es necesario obtener las propiedades analíticas, las cuáles se mencionan a continuación:

5.8.1 Precisión.

Para determinar la precisión o grado de concordancia de un grupo de datos obtenidos, entre sí, se planteó en este caso un estudio de repetibilidad y reproducibilidad y así determinar la dispersión de estos datos en referencia a su valor medio. Se expresa la precisión como la desviación estándar relativa (%RSD) de los datos obtenidos.

Para este caso se realizaron cálculos en ensayos de intradía (n=6) y ensayos de interdía (n=3) para repetibilidad y reproducibilidad respectivamente, utilizando hormonas a una concentración de 100 ngL⁻¹ en muestras de aguas residuales afluentes.

5.8.2 Exactitud.

En la metodología propuesta, se determinó la exactitud a partir de las recuperaciones relativas, también se expresa como error relativo cuando comparamos la cercanía de un valor de referencia aceptado y el valor obtenido de la medición. Se aplica la metodología a un número de muestras de efluente y afluentes por duplicado y enriquecidas a una concentración final de 100 ngL⁻¹.

5.8.3 Límite de detección del método (LOD).

Fue obtenido por análisis de GC-MS en modo SIM para aumentar la sensibilidad y la selectividad y relacionando el área analítica de la señal del analito en una matriz de agua afluente enriquecida con diferentes concentraciones de los analitos y el ruido del fondo. Los valores obtenidos de la concentración que corresponde al ruido de fondo se multiplican x 3 y así obtenemos el valor del límite de detección.

5.8.4 Límite de cuantificación del método (LOQ).

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

5.8.5 Curva de Calibración.

La curva se obtuvo a partir del área cromatográfica de muestras de efluentes enriquecida con multi estándar de hormonas a una concentración de 2 a 20 ppb. Se realiza para cada caso la concentración de cada analito vs área en base a la ecuación de la recta que se muestra en Ecuación 1 donde m y n son coeficientes de la pendiente e intercepto respectivamente.

$$Y = mX + n$$

5.8.6 Sensibilidad.

Para obtener la sensibilidad de la metodología que hemos propuesto, será a partir de la pendiente de la curva de calibración. También puede ser calculada teóricamente a partir de la ecuación 2:

5.9 Aplicación de la metodología en muestras reales.

Se analizaron por medio de esta metodología muestras reales de efluentes y afluentes de una planta de tratamiento de la región metropolitana, que fue de un compuesto de 24 h envasada y reservada en refrigeración a 4°C. Previo a su análisis, ésta muestra fue filtrada y centrifugada para eliminar la mayor cantidad de sedimentos posibles Figura 18.

Se realizaron 5 experimentos por duplicado, con volúmenes de 20 mL en cada caso y enriquecida con multi estándar de hormonas a cuatro niveles de concentración, realizando la extracción a 2000 rpm y durante un tiempo de 45 min, mediante la técnica de RSDE con el corcho laminar como fase sorbente. Posteriormente se realiza la desorción, evaporación y derivatización de los compuestos y así ser analizados en el GC-MS y determinar la presencia y concentración de hormonas.

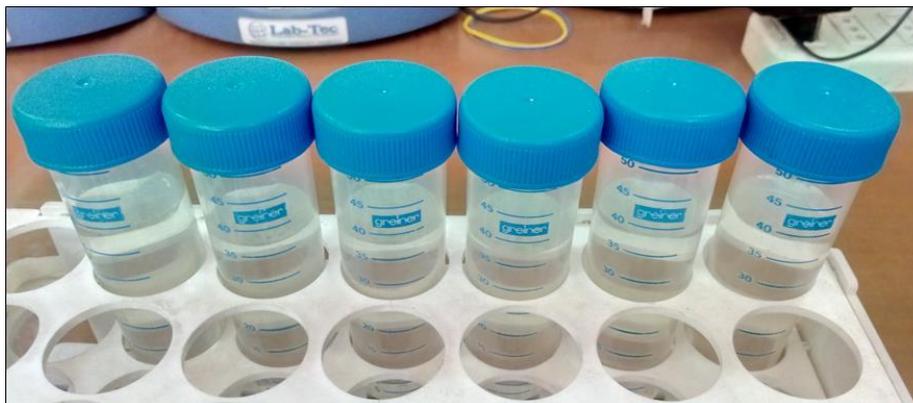


Figura 18. Matriz efluente y afluente, filtrado y centrifugado previo al análisis.

5.10 Eco-escala analítica.

Para evaluar las metodologías de análisis en el contexto de la química verde, es algo muy complejo debido al gran número y diversidad de analitos, matrices y criterios analíticos. Un enfoque muy interesante para la evaluación de la metodología verde es la Eco-escala analítica [67], dado por su valor máximo de 100 puntos y para cada paso del proceso de la metodología, se asignan puntos de penalización. La característica de la puntuación basada en la evaluación de las diferentes etapas del proceso analítico se da como muestra la tabla III.

Tabla III. Eco-escala analítica = 100 total de puntos de penalización.

> 75	METODOLOGÍA VERDE	EXCELENTE
> 50	METODOLOGIA VERDE	ACEPTABLE
< 50	METODOLOGIA VERDE	INADECUADA

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1 Caracterización de la lámina de corcho.

La Figura 19 muestra una imagen de fluorescencia de una sección transversal de la muestra por microscopía de escaneo laser confocal (CLSM) utilizando un plano de fluorescencia máxima, las células son aproximadamente de 40 – 50 μm de diámetro y la fluorescencia se observa en todas las paredes celulares que mantienen una estructura casi intacta.

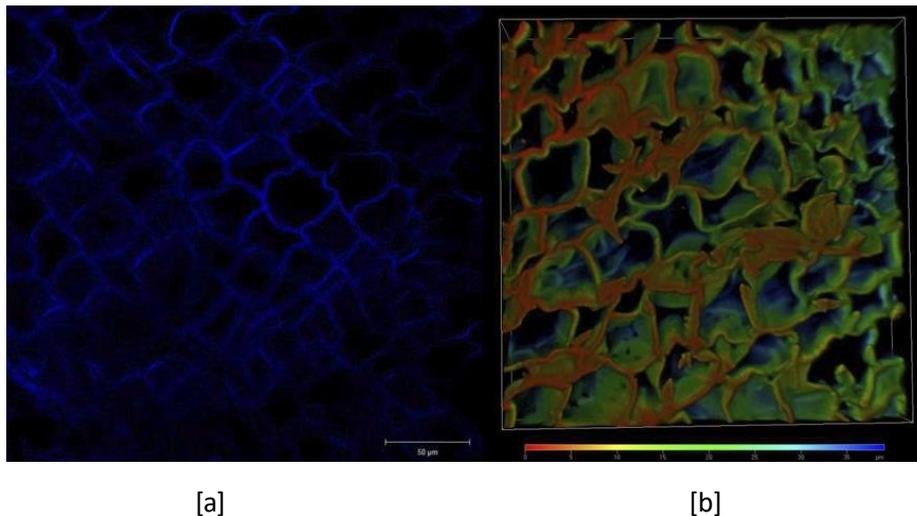


Figura 19.- [a] plano máximo de fluorescencia con λ exc = 405 nm.

[b] representación tridimensional del análisis de la sección transversal de la muestra a 40 μm de profundidad.

Los resultados obtenidos por MCR-ALS se muestran en la Figura 20, donde los tres componentes están bien distinguidos y localizados en la pared celular de las muestras los componentes tienen espectros de emisión diferentes con máximos a 469.9 nm, 444.1 y 512.8 nm. La señal de fluorescencia más alta se observó para el Componente 1 de MCR, que podría asociarse con suberina de acuerdo con la señal en 469,9 nm [49], mientras que la lignina podría ser el componente 3 de MCR debido a las dos bandas observadas a 512 y 568 nm, que se han observado en otros compuestos lignocelulósicos [50] y el reactivo estándar Kraft lignina. El componente 3 de MCR podría asociarse con componentes extractivos o celulosa.

Sin embargo, algunos autores también han atribuido la fluorescencia a 441 nm a la sucina. MCR-ALS permitió la descomposición de una mezcla de espectros de varios compuestos, en contraste con las imágenes obtenidas solo por CLSM.

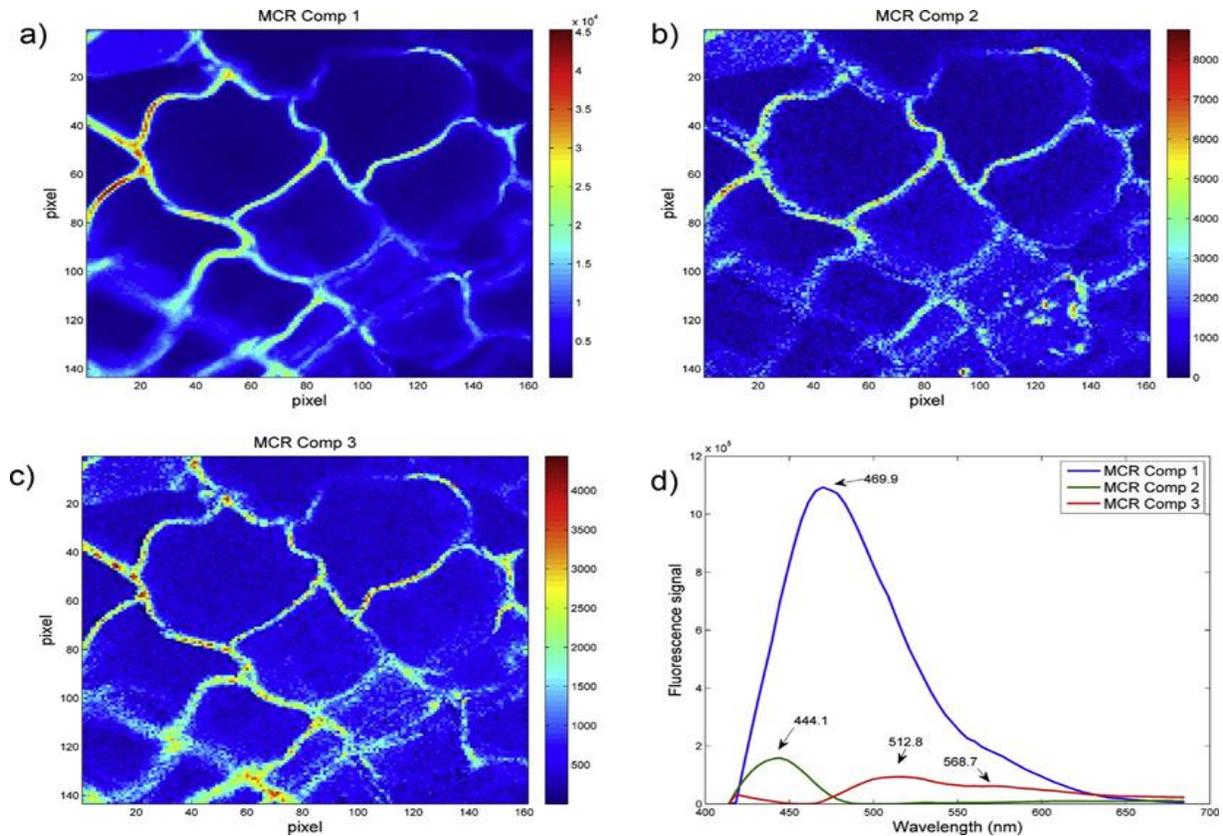


Figura 20. Análisis de imagen multivariante de una microzona en una muestra (106,94 x 94,98 μm) a través de MCR-ALS: mapas de concentración relativa del componente MCR 1 (a), el componente MCR 2 (b) y el componente MCR 3 (c).

Espectros de emisión pura de cada componente (d).

Se realizaron mediciones en diferentes áreas de la lámina de corcho como se observa en la Figura 21, con espectroscopia infrarroja transformada de Fourier (FTIR).

Se observó una banda de estiramiento OH a 3363 cm^{-1} y dos bandas afiladas a 2919 y 2851 cm^{-1} en la región de estiramiento CH; Estas bandas se asignan a polisacáridos, suberina y lignina. La intensa banda de estiramiento de CO a 1736 cm^{-1} es característica de los grupos éster; por lo tanto, la banda puede atribuirse principalmente a suberina. Las regiones aromáticas a 1508 y 1464 cm^{-1} corresponden a lignina y suberina. Las regiones a 1157 y 1032 cm^{-1} incluyen contribuciones de grupos metoxi de lignina, celulosa, hemicelulosa y grupos éster de suberina.

La similitud entre este espectro y los reportados para corcho natural [70] confirma la ausencia de aditivos en el proceso de aglomeración.

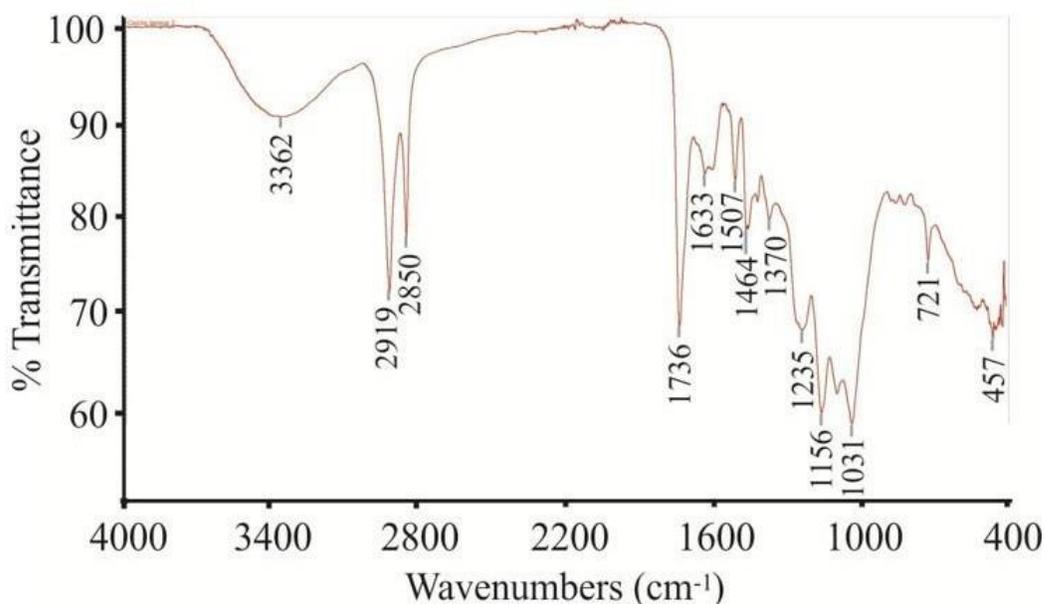


Figura 21. Espectro FTIR de lámina de corcho.

Y por último el análisis SEM en la Figura 22, muestra una distribución homogénea en la superficie de la lámina de corcho y una morfología porosa. La Figura 4b y c muestran dos tipos de estructuras porosas. Las áreas más oscuras se atribuyen a suberina debido a las cadenas de carbono más largas en su composición química estructural y las estructuras porosas más brillantes pueden corresponder a la lignina por la presencia de otros elementos como silicio, hierro magnesio y azufre.

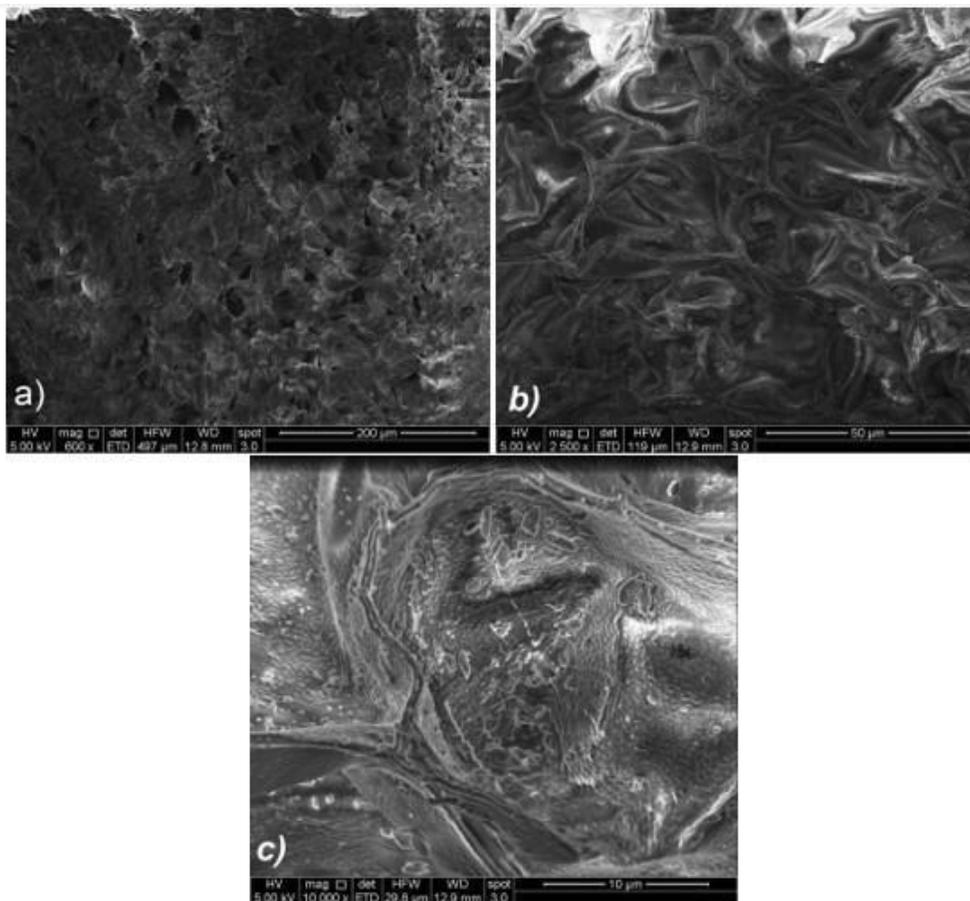


Figura 22. Micrografías SEM de lámina de corcho: a) 600 x, b) 2500 X, c) 10000 x

6.2 Identificación de los analitos mediante GC-MS.

Mediante la implementación de una metodología de derivatización, ya antes utilizada en el laboratorio de Química Ambiental [64-65] se lograron identificar las hormonas modelo, para este estudio: E1, E2, E3 y EE2, además del Surrogate y PCB(estándar interno). El procedimiento consiste en reconstituir la muestra con 50 μL de agente derivatizante MSTFA y 50 μL de Piridina como catalizador. Después de esto, se lleva a derivatización a 80°C por 30 minutos. Posteriormente se inyecta por separado los estándares de cada hormona a una concentración de 5 μg^L⁻¹ y así se obtiene el tiempo de retención y espectro de masa completo para cada molécula y posteriormente se selecciona los iones en modalidad (SIM) Tabla IV.

Siendo estos datos necesarios para cuantificar e identificar la presencia de hormonas en muestras reales y en las optimizaciones realizadas.

Tabla IV.- Tiempo de retención de iones seleccionados para modalidad SIM.

Analitos	Tiempo de retención [min]	ION de cuantificación [m/z]	ION cualificador [m/z]
E1	14.98	342	257
E2	15.20	416	285
E3	16.57	504	345
EE2	16.01	425	440

Luego de esto, se prepara un multiestándar que contenga las cuatro hormonas con la finalidad de obtener el cromatograma completa en modalidad selectiva de iones (SIM). Figura 23.

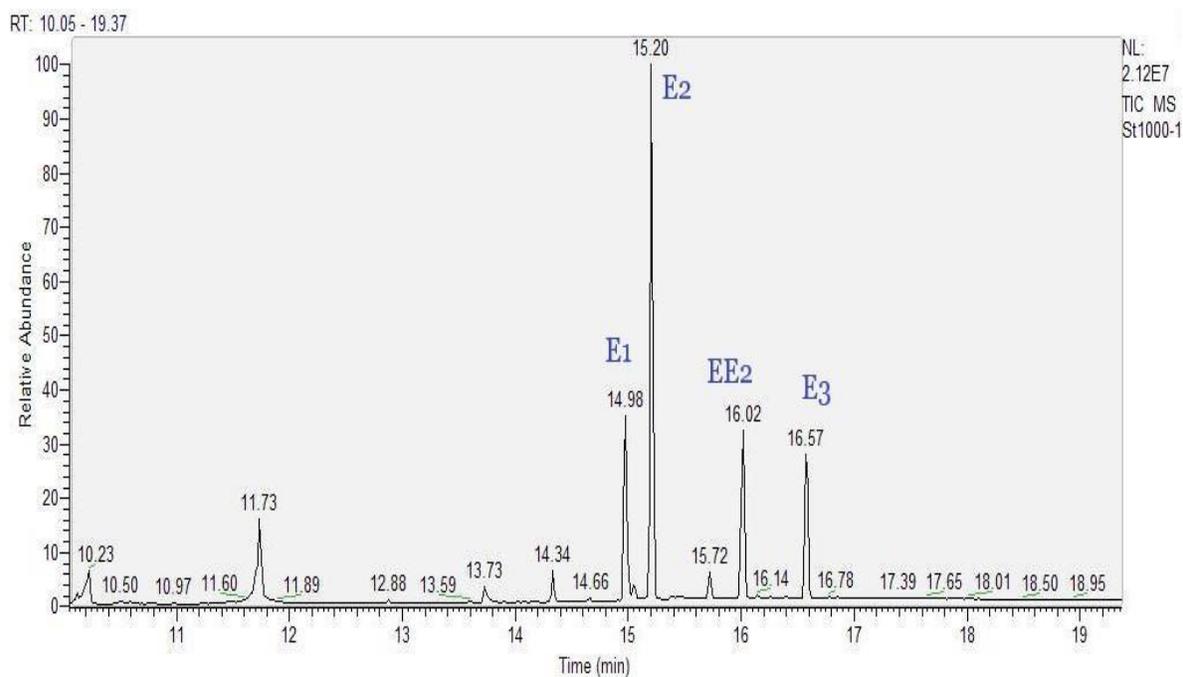


Figura 23. Cromatograma GC-MS modalidad SIM de estándares de hormonas.

6.3 Optimización del proceso de derivatización.

En este estudio de extracción de hormonas con lámina de corcho no fue necesario realizar una optimización de derivatización ya que se selecciona esta condición que fue optimizada previamente en otros estudios de extracciones de varias hormonas incluidas las aquí estudiadas [E1, E2, E3 y EE2] utilizando otras fases [64] por lo que aquí se detalla lo más relevante de ese proceso.

Los derivatizantes trimetil sililados (MSTFA y BSTFA) son frecuentemente utilizados como agentes de sililación, pero como la hormona EE2 contiene un grupo "etnil" y su grupo hidroxilo en carbono 17 esto produce que los derivatizantes por sí solos no cumplan su función, Figura 24. Se hace necesario el uso de un solvente catalítico como la Piridina [55] genera la formación de un solo producto de derivatización evitando compuestos monosililados EE2 y E1, éste último se forma debido a que la forma EE2 en el proceso de derivatización puede perder un grupo etnil.

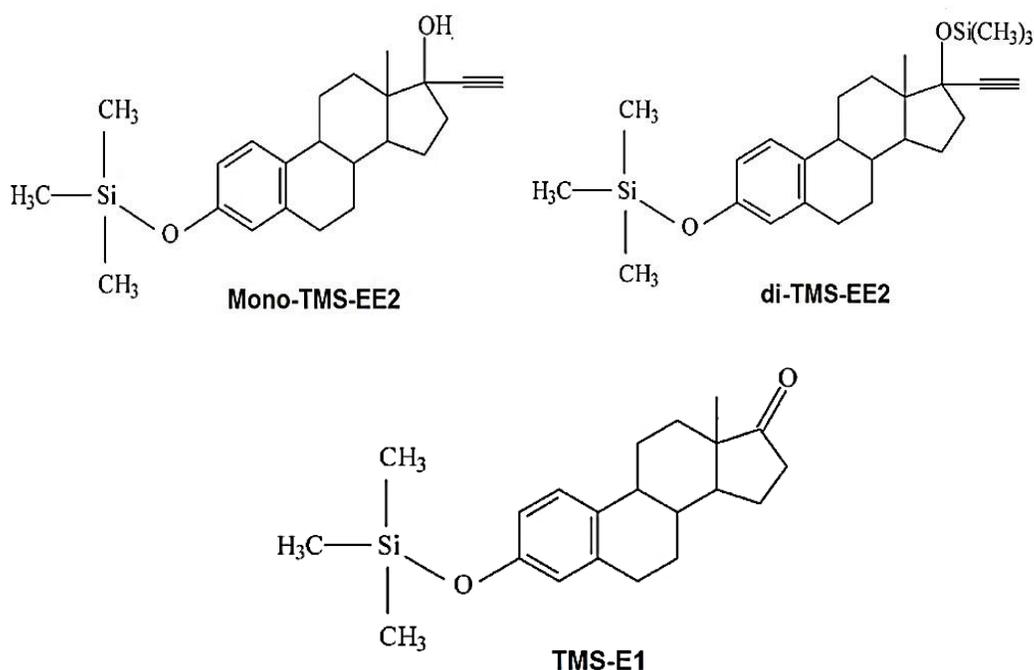


Figura 24. Estructuras de los productos obtenidos en la derivatización de EE2 con MSTFA y sin Piridina.

Como resultado de esta metodología se observó que los metabolitos hidroxilados presentan menor sensibilidad con respecto al resto por lo que se realizaron diferentes pruebas alternando valores de temperatura y tiempo en el proceso de derivatización: 45 min y 80 °C; 30 min y 90 °C; 30 min y 80 °C. El volúmen de Piridina y MSTFA se mantuvieron al ser validadas en estudios anteriores [64] [68] (50 µL piridina y 50 µL MSTFA). Se presume que las hormonas al tener la mayoría 3 grupos hidroxilo necesitarían una mayor temperatura o mayor tiempo de derivatización. En este trabajo citado quedó establecido que el tiempo y temperatura óptima para una completa derivatización fueron 30 min y 80°C respectivamente [64].

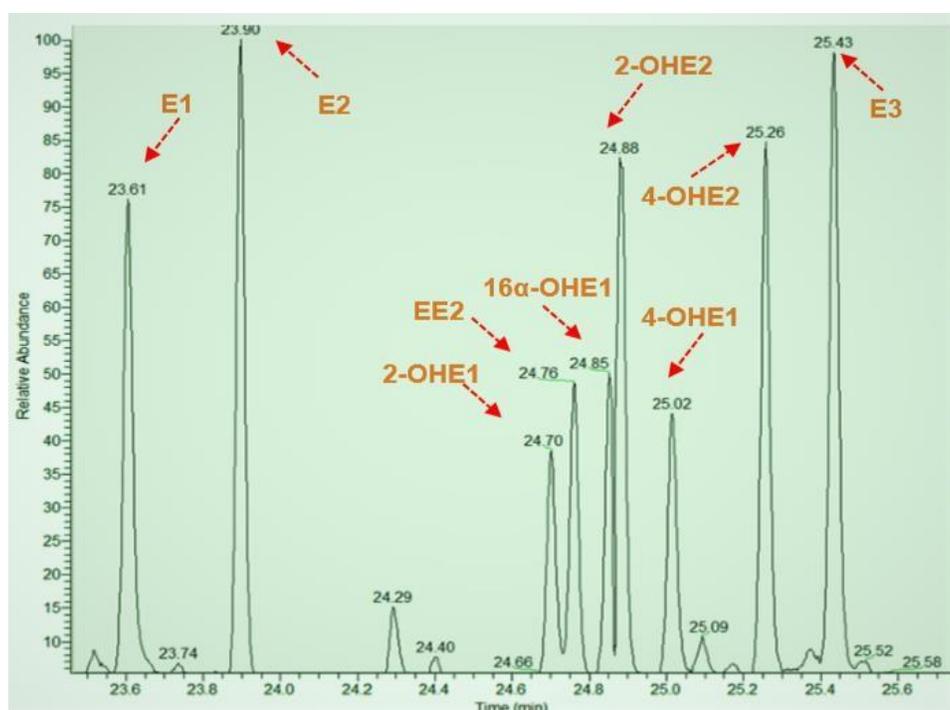


Figura 25. Cromatograma full scan de estándar de 5 mgL⁻¹ de 9 hormonas derivatizadas [64].

En estos ensayos de derivatización que incluyó también otras hormonas diferentes a las aquí estudiadas, Figura 25 extraída de referencia [64] hubo incremento del tiempo y temperatura, con lo que aumenta el área relativa de las hormonas, lo que podría explicarse debido a la presencia de hasta 3 grupos hidroxilo en sus estructuras y necesitarían mayor tiempo para una completa derivatización.

Por lo tanto, se seleccionó 30 min como tiempo y 80 °C de temperatura, habiendo obtenido en estos rangos las mayores áreas relativas una sensibilidad incrementada de los compuestos hidroxilados en el equipo.

6.4 Optimización de variables químicas e hidrodinámicas del proceso de extracción.

6.4.1 Variables Químicas.

6.4.1.1 Fase Sorbente.

El corcho laminar al tener una estructura compleja y variada posee una alta afinidad de enlace con analitos de mediana polaridad, ya demostrado en extracciones con PHAs [58] y Parabenos [59] y ahora con compuestos estrogénicos es necesario optimizar la fase en términos de: área o superficie, tamaño, y su presentación en polvo o laminar.

En este caso se utilizó discos de teflón con cavidad para incluir allí el polvo resultante del corcho molido y tamizado #200, este va a ser cubierto por una lámina de fibra de vidrio para evitar fuga de la fase y sostenida por una camisa de teflón propia del disco. Por otra parte, utilizamos un disco plano de teflón al cual adherimos la lámina del corcho con cinta de doble contacto. Con estos dispositivos listos se realizó una extracción en distintos discos, manteniendo constante el volúmen de la muestra (H2OMilliQ) y la velocidad en 2000 rpm. La extracción se realizó desde 20 mL de muestra (H2O MilliQ) a la que se adicionó 100µL de multiestándar de 1ppm y con lo que se llegó a una concentración de 5ppb.

Como resultado obtuvimos una recuperación muy diferenciada por parte del corcho laminar en comparación con el corcho molido, Figura 26.



Figura 26. Recuperaciones de corcho en lámina [CL] y corcho molido [CM].

También se realizaron optimizaciones en corcho laminar en disco plano y corcho laminar en disco con cavidad sostenido por una camisa, directamente en muestras de H₂O ultra pura MilliQ dopadas con estándares de hormonas. El volumen de muestra se mantuvo en 20 mL y a cada vial se adicionó 100µL de estándar de hormonas de 1ppm y esta vez se utilizó un estándar sustituto (surrogate): (20,21)-¹³C₂-17α-ethinylestradiol del cual se agregó 100 µL obteniendo una concentración de 5 ppb.



Figura 27. Recuperaciones de analitos en muestras de H₂O MilliQ con disco plano y disco con camisa.

Para el proceso de extracción se mantuvo el tiempo de 45 min. Como podemos observar en la Figura 27, al realizar extracciones a partir de H₂O MilliQ, las recuperaciones más notables se dieron con el corcho laminar en disco plano ya que en el disco con cavidad al disminuir la superficie de la fase Figura 28, afecta evidentemente la capacidad de retener la mayor concentración de analitos.



Figura 28. Fase laminar de corcho en disco plano y con cavidad.

6.4.1.2 Optimización pH.

El estudio del pH en la extracción de compuestos estrogénicos es muy determinante, debido a que estos compuestos adquieren diferentes estructuras químicas a valores de pH por sobre o bajo su valor de pKa, lo que influye en la adsorción en la fase sorbente.

Se han realizado estudios previos para identificar el pH en que existe una mayor recuperación de estos analitos en otras fases, Figura 29. En este estudio se muestra el efecto del pH a la muestra de la señal analítica [64].

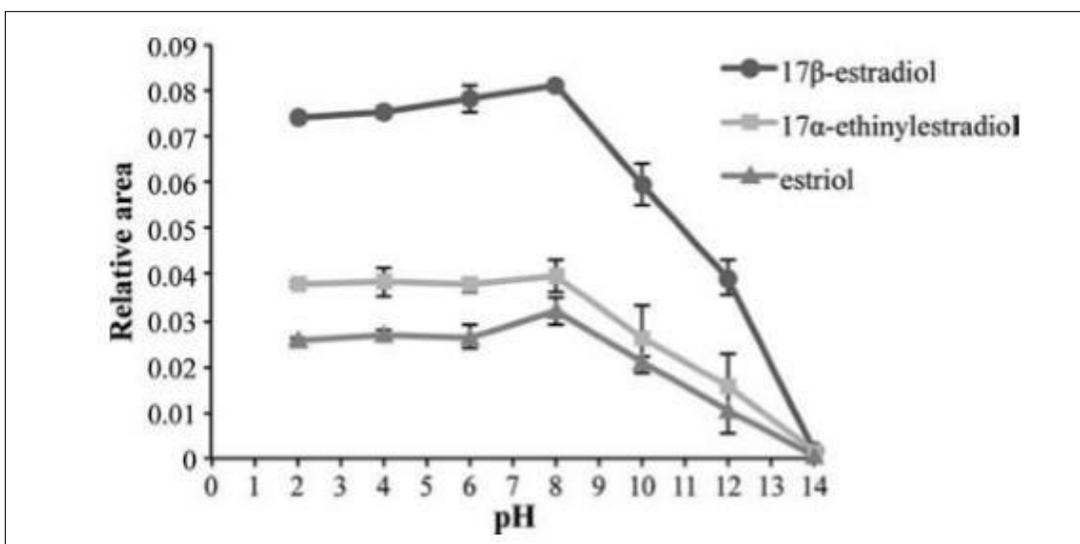


Figura 29. Efecto del pH en la extracción del 17β-estradiol, 17α -ethinylestradiol, y estriol (n =3).

Es una señal casi constante con un máximo en un rango de pH 2-8 y la disminución de la recuperación a un pH más alto, debido a la desprotonación del grupo hidroxilo dando origen a un anión con lo que disminuye la interacción del analito con el sorbente sólido, lo que se justifica por el valor de pKa de los analitos cercanos a 10 en todos los casos.

En la medición de pH realizados a la matriz después del proceso de extracción, se obtuvo valores entre 7.39 a 7.55, por lo que no fue necesario en nuestro caso, adicionar algún reactivo para modificar el pH, ya que en ese rango se vería favorecida la interacción de los analitos con el corcho laminar. Tabla V.

Tabla V. Medición de pH desde extracto acuoso.

Tiempo de extracción (min)	pH
15	7.39
30	7.47
60	7.43
90	7.39
120	7.55

Para nuestro experimento se mantuvo la velocidad de rotación en 2000 rpm, 20mL de muestra y tiempo de extracción 45 min.

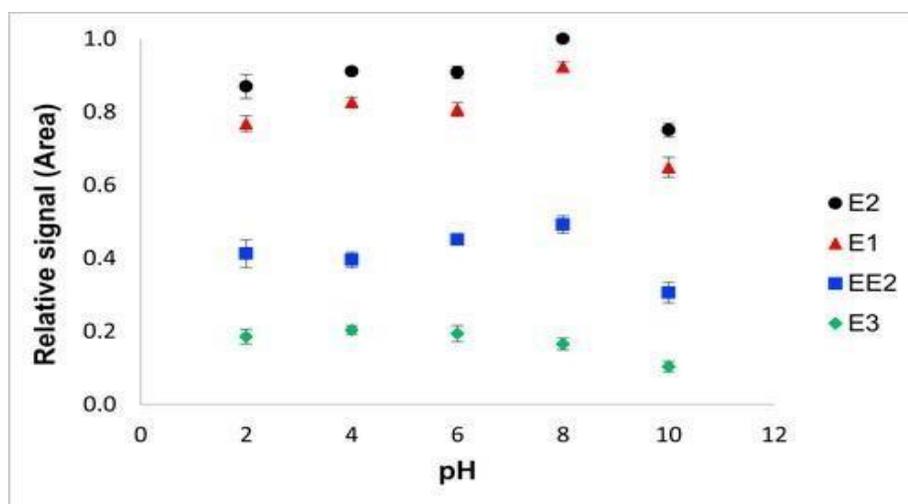


Figura 30. Efecto del pH sobre la respuesta analítica de las hormonas.

El efecto del pH sobre la extracción se muestra en la Figura 30, como se observa la respuesta de los analitos es alta y casi constante hasta pH8 y la recuperación empieza a disminuir a medida que aumenta el pH hasta valores extremos donde la interacción del analito con la fase sorbentes es mínima, justificándose este comportamiento como se mencionó anteriormente debido a los valores de pKa de estos analitos

6.4.1.3 Optimización del volumen de solvente de elución y desorción.

Ya retenidos los analitos en la fase de corcho laminar se debe eluir con un bajo volumen de disolvente para favorecer la metodología verde de manera rápida y cuantitativa para esto se selecciona el metanol para eluir los analitos desde la fase.

El volumen, solvente y tiempo de desorción fueron establecidos mediante ensayos en de estudios anteriores [64] definiéndose los parámetros como indica la tabla VI.

Tabla VI. Condiciones óptimas seleccionadas para la desorción.

Solvente	Volumen (mL)	Tiempo (min)
Metanol CH ₃ OH	5	15

La elución se desarrollará en una sola etapa durante 15 minutos utilizando un solvente de alto poder de elución como el metanol que en corto tiempo puede vencer las fuerzas intermoleculares que mantienen los analitos unidos a la fase, además por ser un disolvente polar prótico que puede formar puentes de hidrógeno con los analitos a eluir y por ser miscible en el agua, no se dificulta su entrada para disolver estos compuestos.

6.4.1.4 Estudio de efecto Matriz.

En el análisis de diversos compuestos mediante cromatografía de gases y GC-MS es común encontrarse con variaciones en la respuesta, inducida por componentes en la matriz, en general estos fenómenos se caracterizan por aumentar la señal cromatográfica de algunos de los compuestos en estudio. Para la determinación del efecto matriz se prepararon curvas de calibración en solvente, afluente y efluente. Su elaboración se logra con una mezcla de hormonas (multiestándar) de 1ppm del cual se agregaron diferentes volúmenes a extractos secos para conseguir diferentes concentraciones como se detalla en la tabla VII.

Tabla VII. Preparación de curvas de calibración en solvente, afluente y efluente.

MUESTRAS	CONCENTRACION ppb
AF1	0
AF2	
EF1	
EF2	
AF4	0,5
AF5	
EF4	
EF5	
AF7	1
AF8	
EF7	
EF8	
AF9	1,5
AF10	
EF9	
EF10	
ST1	0,5
ST2	1,0
ST3	1,5

Se utilizó estándar interno PCB de 1ppm 20 µL adicionados al extracto junto con los 50 µL de piridina y 50 µL del derivatizante. Cada una de las curvas está constituida por cuatro niveles de calibración y el volumen de la matriz efluente y afluyente, se mantuvo constante a 20 mL.

En este estudio el efecto matriz se expresó por medio del porcentaje de efecto matriz (%EM), que consiste en determinar la relación entre la respuesta como área en matriz y la respuesta como área en solvente. Se calculó y expresó el efecto matriz para cada compuesto mediante la ecuación:

$$EM\% = 100 \times [(pendiente\ matriz / pendiente\ solvente)] - 100$$

Si suponemos que las pendientes de las curvas de calibración del disolvente y matriz (efluente y afluyente) son iguales, entonces no habrá efecto matriz y el coeficiente de la pendiente será =0 es decir la señal del analito en la matriz y en disolvente será la misma. Pero si las pendientes de las curvas difieren entre sí, existe un efecto matriz.

Un valor de efecto matriz superior a 100% indica un aumento en la señal cuando se analiza el compuesto en la matriz. Cuando el valor es inferior a 100%, la señal del analito en la matriz es menor o se encuentra suprimida en comparación con la señal del analito en disolvente. Ilustramos el efecto matriz calculado [- 100] para cada compuesto así podemos identificar las tendencias del efecto matriz como la supresión o la intensificación general. Tabla VIII.

Tabla VIII. Evidencia de efecto matriz para efluente y afluyente.

EFECTO MATRIZ	Afluyente	Efluente	Afluyente	Efluente
E1	50	53	-50	-47
E2	49	62	-51	-38
E3	49	59	-51	-41
EE2	54	68	-46	-32

Como resultado se obtuvieron efectos matrices en muestras de aguas residuales afluentes y efluentes, ya que se evidencia una supresión de la señal (valores negativos) que fue superior en el afluente como se esperaba, Figura 31 y 32.

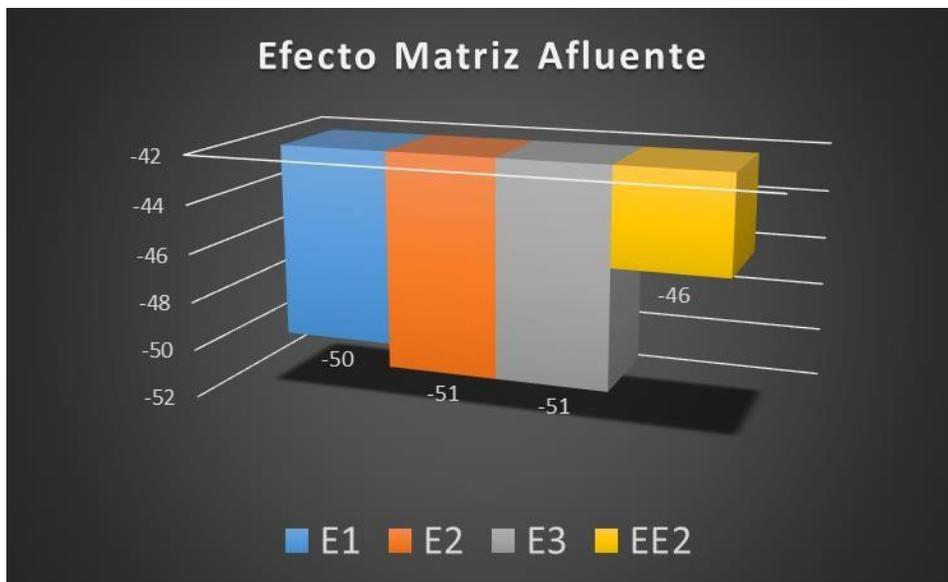


Figura 31. Efecto matriz de hormonas en afluente.

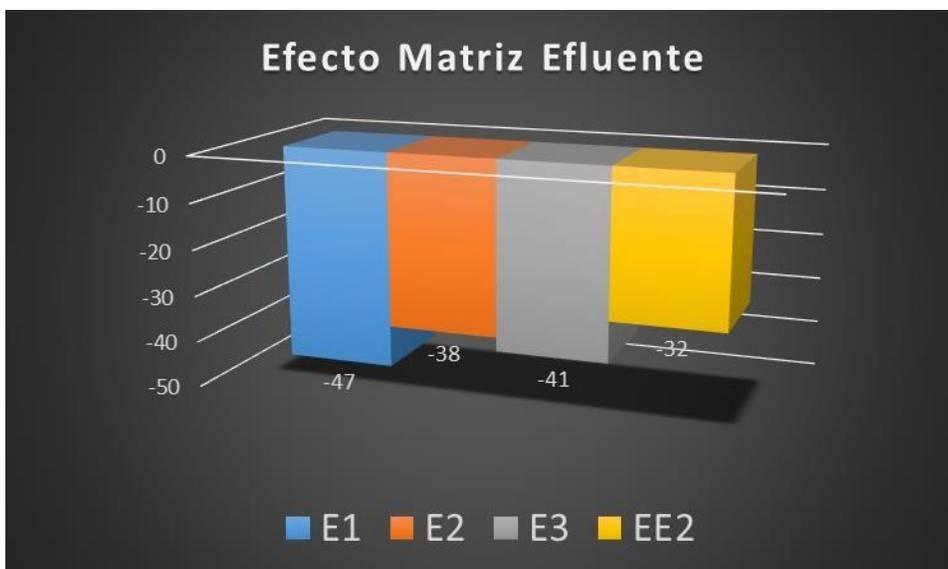


Figura 32. Efecto matriz de hormona en efluente.

6.4.2 Variables Hidrodinámicas.

Así entonces para definir las variables hidrodinámicas idóneas se realizaron una serie de experimentos univariado en donde todas estas variables fueron probadas en niveles bajos y altos, entonces para el volúmen de muestra los valores fueron de 20 a 60 mL para el tiempo de extracción de 20 a 120 min y para la velocidad de agitación de 0 a 2000 rpm. Se utilizó como muestra H₂O MilliQ enriquecida con estándar de hormonas hasta una concentración de 5 μ L⁻¹. En el caso del volúmen al ser variable, se mantuvo la misma concentración, pero se verá incrementa la masa en las soluciones.

Tanto la velocidad del disco y el volúmen de la muestra influye directamente en los resultados de un proceso de extracción, ya que sin la ayuda de un mecanismo que favorezca la agitación, la extracción solo dependería de la velocidad de agitación del analito en la fase acuosa, generando tiempos de extracción muy largos, poco efectivos comparados con metodologías actuales.

Los volúmenes de la muestra afectan la eficacia de la extracción y el tiempo de equilibrio que está relacionado con el equilibrio termodinámico de partición, el cual se ve afectado al modificar la relación volumétrica (orgánico-acuoso). En la tabla IX se muestra el diseño experimental para su optimización.

Tabla IX. Diseño experimental para estudio de variable volumen (mL).

EXPERIMENTO UNIVARIADO (Extracción)				
VARIABLE: VOLUMEN (mL)				
VOLUMEN (mL)	Conc/ ppb	tiempo(min)	velocidad (rpm)	réplicas
20	5	45	2000	x 2
30	5	45	2000	x 2
40	5	45	2000	x 2
50	5	45	2000	x 2
60	5	45	2000	x 2

El equilibrio de extracción se ha visto más favorecido con volúmenes de muestra más pequeños dando lugar a una extracción más rápida debido a que la probabilidad de contacto del analito con la superficie del corcho laminar se ve favorecida cuando se disminuye el volumen de la muestra.

Este efecto tiene una implicación adicional desde una perspectiva analítica: se incrementa la velocidad de la determinación, pero se disminuye la sensibilidad del analito debido a su masa y por lo tanto disminuye el factor de preconcentración. Se establece entonces que 20 mL de muestra favorece a una extracción rápida y el factor de preconcentración, Figura 33.

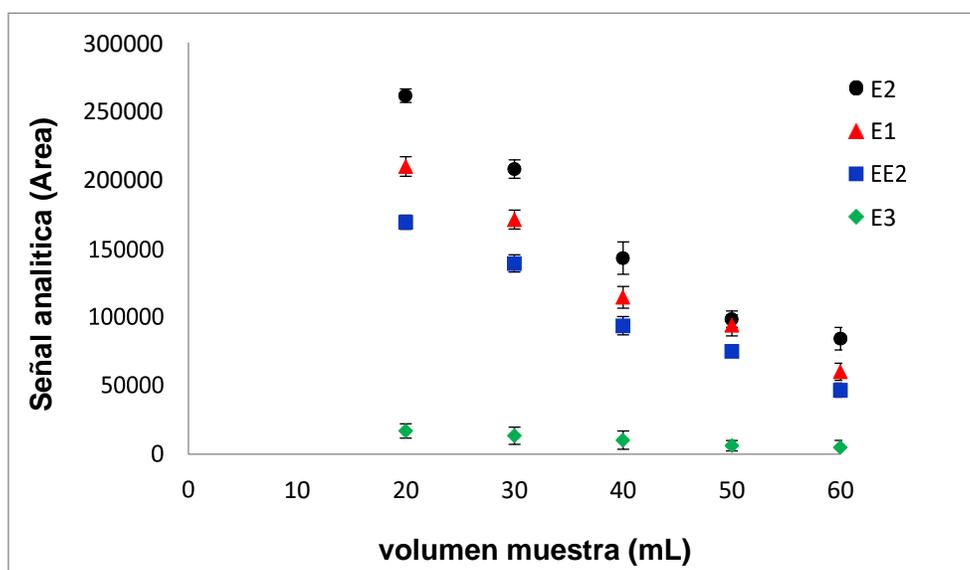


Figura 33. Efecto del volumen de la muestra en la respuesta analítica.

Del tiempo de extracción también depende la eficiencia de la transferencia de masa del analito, y en forma simultánea de la velocidad de rotación del dispositivo. Se determinó para el tiempo experimentos univariados por duplicado. Tabla X.

Tabla X. Perfil de extracción de hormonas para variable tiempo (min).

EXPERIMENTO UNIVARIADO (Extracción)				
VARIABLE: tiempo (min)				
VOLUMEN (mL)	Conc/ ppb	tiempo(min)	velocidad (rpm)	réplicas
20	5	15	0	X2
20	5	30	250	X2
20	5	45	500	X2
20	5	75	1000	X2
20	5	90	2000	X2
20	5	120	2000	X2

Los resultados se pueden observar en la Figura 34. El perfil del tiempo de extracción demostró que en 45 min se alcanzó el equilibrio de partición entre la fase de sorción y la solución muestra. Por lo tanto, se seleccionó ese tiempo como el óptimo para el proceso de extracción.

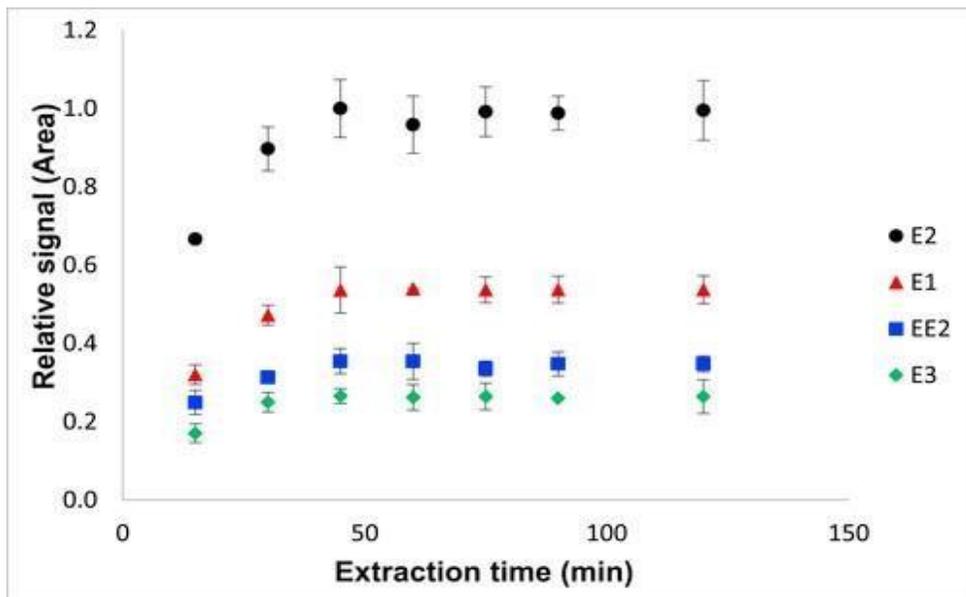


Figura 34. Perfil de extracción de hormonas por RDSE.

Así mismo la velocidad la velocidad es una variable de gran importancia en el proceso de extracción que condicionaría la difusión del analito desde la fase acuosa a la fase laminar en periodos de tiempo determinados. A mayor velocidad el equilibrio de partición se alcanza más rápido desde que la velocidad de transferencia del analito hacia la fase aumenta y disminuye a la capa de agua estacionaria presente entre la solución acuosa y la fase sorbente. Se trabajó a diferentes velocidades con el diseño que se muestra en tabla XI.

Tabla XI.- Diseño experimental para estudio de variable velocidad (rpm).

EXPERIMENTO UNIVARIADO (Extracción)				
VARIABLE: VELOCIDAD (rpm)				
VOLUMEN (mL)	Conc/ ppb	tiempo(min)	velocidad (rpm)	réplicas
20	5	45	0	X2
20	5	45	250	X2
20	5	45	500	X2
20	5	45	1000	X2
20	5	45	2000	X2

Igualmente, una mayor velocidad de rotación del disco generó un aumento de la señal analítica y por lo tanto una mayor recuperación de compuestos estrogénicos. Se deduce que el equilibrio de extracción puede ser alcanzado en un tiempo inferior debido a que el flujo turbulento y la velocidad de rotación del disco reduce el espesor de la capa de agua estacionaria, lo que se traduce en la transferencia de analitos desde la fase acuosa a la fase de sorción. Figura 35.

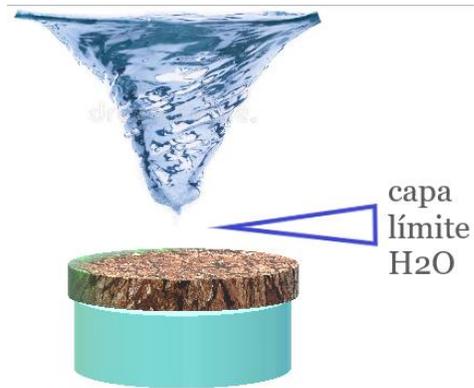


Figura 35. Efecto de la velocidad del disco en el espesor de la capa de agua.

A 2000 rpm se llegó al flujo más turbulento hacia el disco Figura 36. Y la respuesta analítica fue la máxima, consistente con el hecho de que la etapa de determinación del proceso de extracción es la difusión del analito a través de la capa límite de agua y favorece a una rápida retención del analito en la fase de sorción.

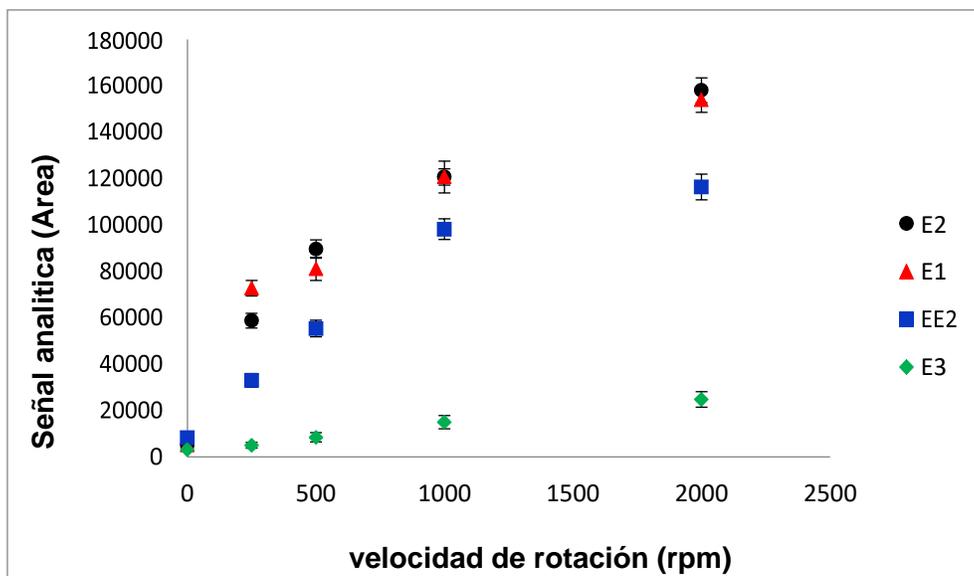


Figura 36. Efecto de la velocidad de rotación del disco en la respuesta analítica.

6.5 Resumen de las variables optimizadas en la metodología.

Tabla XII. Variables estudiadas y las condiciones optimizadas de las mismas.

VARIABLES ESTUDIADAS CONDICIONES OPTIMIZADAS	
FASE SORBENTE (laminar o polvo)	CORCHO LAMINAR
DISCO DE TEFLON (RSDE): plano o con cavidad	DISCO PLANO
TIEMPO DE EXTRACCIÓN	45 min
VOLUMEN DE MUESTRA	20 mL
pH MUESTRA	2 - 8
% MeOH	5 mL
DESORCIÓN	5 mL MeOH ; 15 min ; 2000 rpm
AGENTE DERIVATIZANTE	MSTFA
TIEMPO Y VOLUMEN DE DERIVATIZANTE	30 min ; 50 μ L ; 80 °C

VII. Validación del Método.

Con el fin de obtener una adecuada identificación y cuantificación de las hormonas estudiadas se definieron los parámetros de calidad de la extracción y método cromatográfico. La linealidad se estudió mediante la inyección de la matriz (Afluente y Efluente) fortificadas a diferentes niveles de concentración (0 -10 μgL^{-1}) para E1 y E2, y desde (0 – 20 μgL^{-1}) para EE2 y E3, tabla XIII.

Tabla XIII. Matriz dopada a diferentes niveles de concentración.

Matriz enriquecida: Afluente y Efluente: Conc: ppb			
E1	2	5	10
E2			
EE2	10	15	20
E3			

Se detallan los coeficientes de correlación (r^2) la precisión del método, las recuperaciones, LOD y LOQ. La precisión del método basado en estudios de repetitividad y reproducibilidad, expresada por términos de desviación estándar relativa (%RSD) se evaluó para cada compuesto utilizando diferentes discos de extracción intradía (n=6) y para interdía(n=3) fortificando la matriz efluente con 100 ngL^{-1} . La repetibilidad media y reproducibilidad fueron inferiores a 16% y los valores de recuperación en un rango de entre 63 y 89%.Tabla XIV.

Tabla XIV. Características analíticas del método: linealidad, rango dinámico LOD, LOQ y recuperación absoluta.

Hormona	Linealidad (r ²)	Rango dinámico (ngL ⁻¹)	LOD (ngL ⁻¹)	LOQ (ngL ⁻¹)	Recuperación absoluta(%)
E1	0.991	10 - 500	3	10	89 ± 5
E2	0.996	19 - 500	6	19	86 ± 6
E3	0.989	62 - 500	19	62	63 ± 7
EE2	0.999	54 - 500	16	54	83 ± 5

De manera similar a las características de otras técnicas de microextracción tales como microextracción en fase sólida (SPME) y SBSE, recuperaciones absolutas por sobre el 60 % son bastante satisfactorias para RSDE, considerando que esta técnica se basa en el equilibrio de partición en lugar de una extracción exhaustiva.

Los LOD y LOQ del método se determinaron los criterios de 3- α y 10- α respectivamente utilizando 10 muestras en blanco. El rango de estos valores va desde 3 a 19 y 10 a 62 ngL⁻¹ respectivamente. Aunque el factor teórico de preconcentración fue 200, una estimación real de la preconcentración o factor de enriquecimiento (%EF) fue entre 126 y 178 calculado considerando la recuperación absoluta para cada analito por separado. Tabla XV.

Tabla XV. Características analíticas del método: factor de enriquecimiento y precisión.

Hormona	EF (%)	Precisión (% RSD)	
		Intradía n=6	Interdía n=3
E1	178	6	8
E2	172	5	9
E3	126	8	16
EE2	166	2	6

7.1 Análisis de muestra real por GC-MS.

Una vez optimizado y validado el método se aplicó a muestras reales de aguas, afluentes y efluentes obtenidas de una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) en Santiago de Chile, Figura 37 (cromatogramas en modo SIM de hormona en muestra real enriquecida, afluente y efluente). Esta PTAR es una de las dos más importantes de la región metropolitana, siendo la muestra un compuesto de 24 h tomada en botellas plásticas y almacenadas a 4 ° C, luego filtradas y centrifugadas para eliminar sedimentos.

En la tabla XVI, se muestra las concentraciones de hormonas que se encuentran tanto en afluente como en efluente en ngL⁻¹.

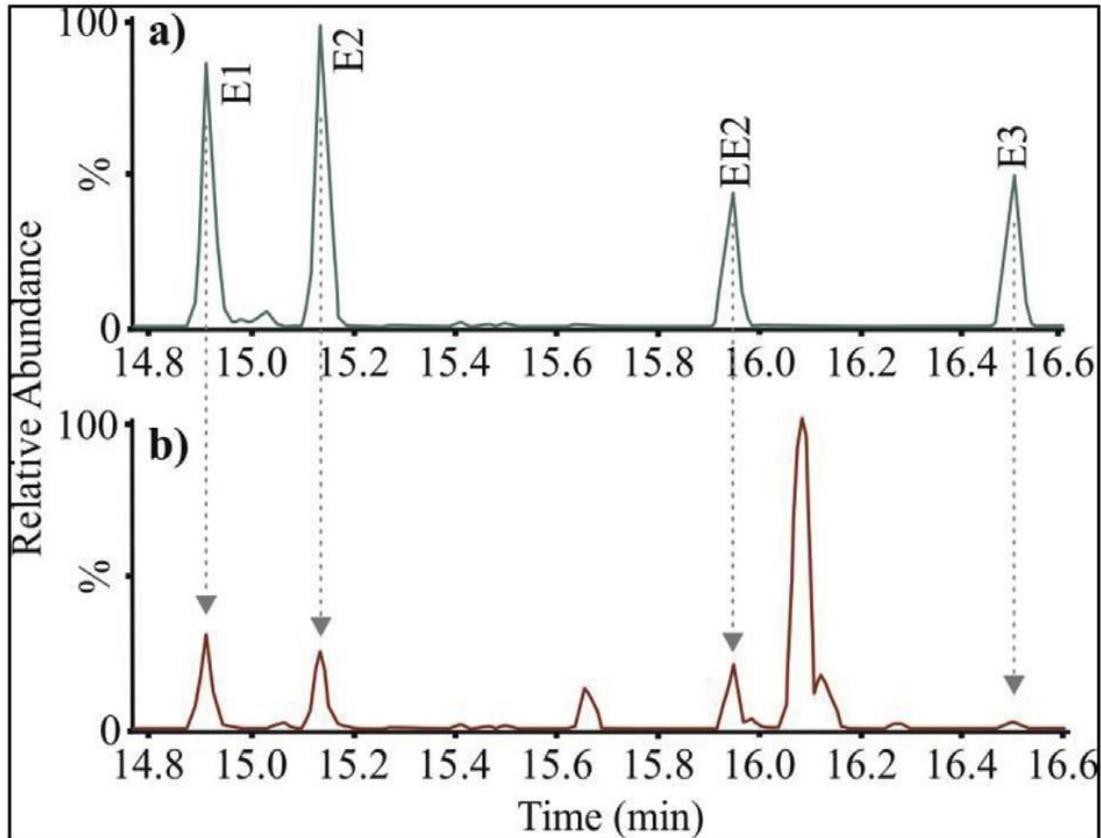


Figura 37. Cromatogramas obtenidos en modo SIM para (a) solución estándar y (b) muestra real enriquecida.

Tabla XVI. Concentración de hormonas determinadas en muestras reales.

HORMONA	Conc (ngL ⁻¹)	
	EFLUENTE	AFLUENTE
E1	16 ± 1	15 ± 1
E2	48 ± 4	< LOQ
E3	< LOQ	< LOD
EE2	< LOD	< LOD

La cuantificación se realizó por medio de peak de muestras de la matriz en cuatro niveles de concentración de hormonas. En un estudio previo por extracción en fase sólida y LC-MS, se encontraron concentraciones similares para E1 y E2 en muestras de aguas residuales en Santiago, Chile [69]. La presencia de una pequeña fracción de algunos analitos en los efluentes de la planta de tratamiento confirma que los procesos actuales de la planta no eliminan completamente este tipo de compuestos que están clasificados como contaminantes emergentes y la planta de tratamiento de aguas residuales no elimina o retiene estos compuestos sin descuidar también los metabolitos resultantes de la transformación de los compuestos originales.

7.2 Eco-escala analítica.

La eco-escala analítica propuesta por Galuszka en 2012 [67] nos ayuda a evaluar que tan verde es una metodología analítica según la asignación de puntos de penalización en los parámetros del proceso analítico, donde a un análisis verde ideal se le asigna 100 puntos.

La cuestión principal que se puede pedir de un método analítico verde es: " como evaluar diferentes procedimientos y parámetros, para elegir el más verde". Hay pautas generales para evaluar diferentes procedimientos que por lo general consideran varias etapas un determinado método, por ejemplo: cantidad de reactivo, peligrosidad, consumo de energía y deshechos.

La evaluación así, parte de las distintas etapas de nuestra metodología RDSE:

- a) Tratamiento: el corcho laminar es tratado con metanol y agua (cuatro veces en cada caso) durante 30 min bajo sonicación y luego un secado en horno a 50°C durante 30 min.
- b) Acondicionamiento: se realiza con 10 mL metanol inicialmente y luego con 10mL agua ultra durante 5 min y a 2000 rpm.
- c) Proceso de microextracción: el disco de teflón con la lámina de corcho adherida se introduce en un vial con 20 mL de muestra, se agita a 2000 rpm durante 45 min y a temperatura ambiente.

- d) Desorción: que se realiza con 5 mL de MeOH durante 15 min y a 2000 rpm para luego de esto, los extractos son evaporados a sequedad con nitrógeno a temperatura ambiente.
- e) Derivatización: aquí se reconstituye el extracto con 50 µL de Piridina y 50µL de MSTFA [N-metil-N-(trimetilsilil)- trifluoroacetamida] a 80 °C durante 30 min.
- f) Análisis: inyectando en GC-MS

Tabla XVII. Puntos de penalización para la metodología desarrollada.

Reactivos, Energía y Deshechos	Puntos de Penalización
MeOH	4
MSTFA	2
Piridina	4
Sonic-40	2
GC-MS	3
Emisión de vapores y gases	3
TOTAL	18

Eco-escala analítica= 82

El resultado obtenido fue 82 puntos y se muestra en la tabla XVII pudiendo afirmar así que la metodología desarrollada para determinar compuestos estrogénicos mediante RDSE y utilizando corcho laminar como fase de sorción, es una excelente técnica verde.

7.3 Comparación entre lámina de corcho y otras fases comerciales utilizando RDSE.

Distintos materiales sintéticos comerciales han sido utilizados habitualmente como fase de sorción, tales como: Oasis HLB, C18, nylon y divinilbenceno estireno. Su uso está condicionado de acuerdo con la característica del analito y del tipo de dispositivo de extracción. Los resultados obtenidos en la extracción de hormonas por RDSE utilizando corcho como fase sorbente fueron comparados con los obtenidos con las otras fases sintéticas, en las mismas condiciones para así demostrar su eficiencia en la extracción a partir de una muestra acuosa. Los resultados los podemos observar en la Figura 38.

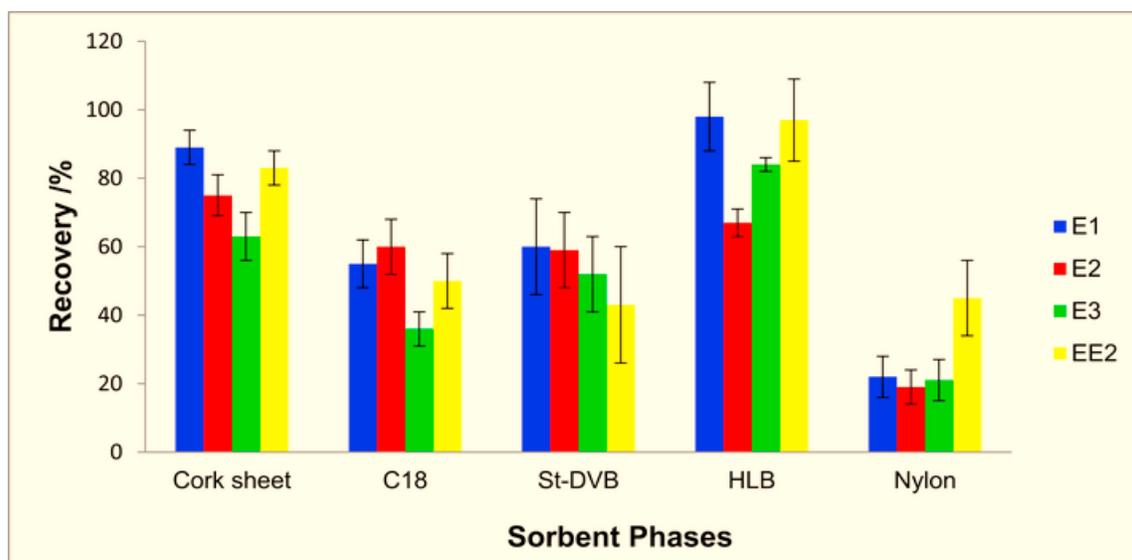


Figura 38.- Recuperación absoluta de hormonas utilizando diferentes fases de sorción en RDSE.

Los resultados de recuperación muestran que el corcho implica una mayor eficiencia de absorción que C18, St-DVB y nylon (entre 19 y 45%) para todos los analitos.

La lámina de corcho logra recuperaciones similares al Oasis HLB, la fase sintética más comúnmente utilizada y versátil, ya que se aplica para analitos de polaridades diferentes. En el caso de Oasis HLB las recuperaciones fueron entre 67 y 98%, mientras que el corcho alcanzó entre 63 y 89%. Un análisis de varianza (ANOVA)

unidireccional, muestra que no se detectan diferencias significativas entre la eficiencia de extracción de la lámina de corcho en comparación con Oasis HLB (nivel de confianza 95%). Por el contrario, la eficiencia de extracción tanto de la lámina de corcho como del Oasis HLB son significativamente más altos (95% nivel de confianza) que los alcanzados por St-DVB, C18 y Nylon para E1, E3 y EE2. Por lo tanto, la lámina de corcho demostró ser una alternativa a las fases sintéticas mencionadas anteriormente, presentando la ventaja de lograr recuperaciones similares, pero con un costo menor. Además, el corcho aporta una calidad ecológica a la técnica de microextracción RDSE, ya que es un material natural, biodegradable y reutilizable.

7.4 Comparación con otros métodos para la determinación de hormonas.

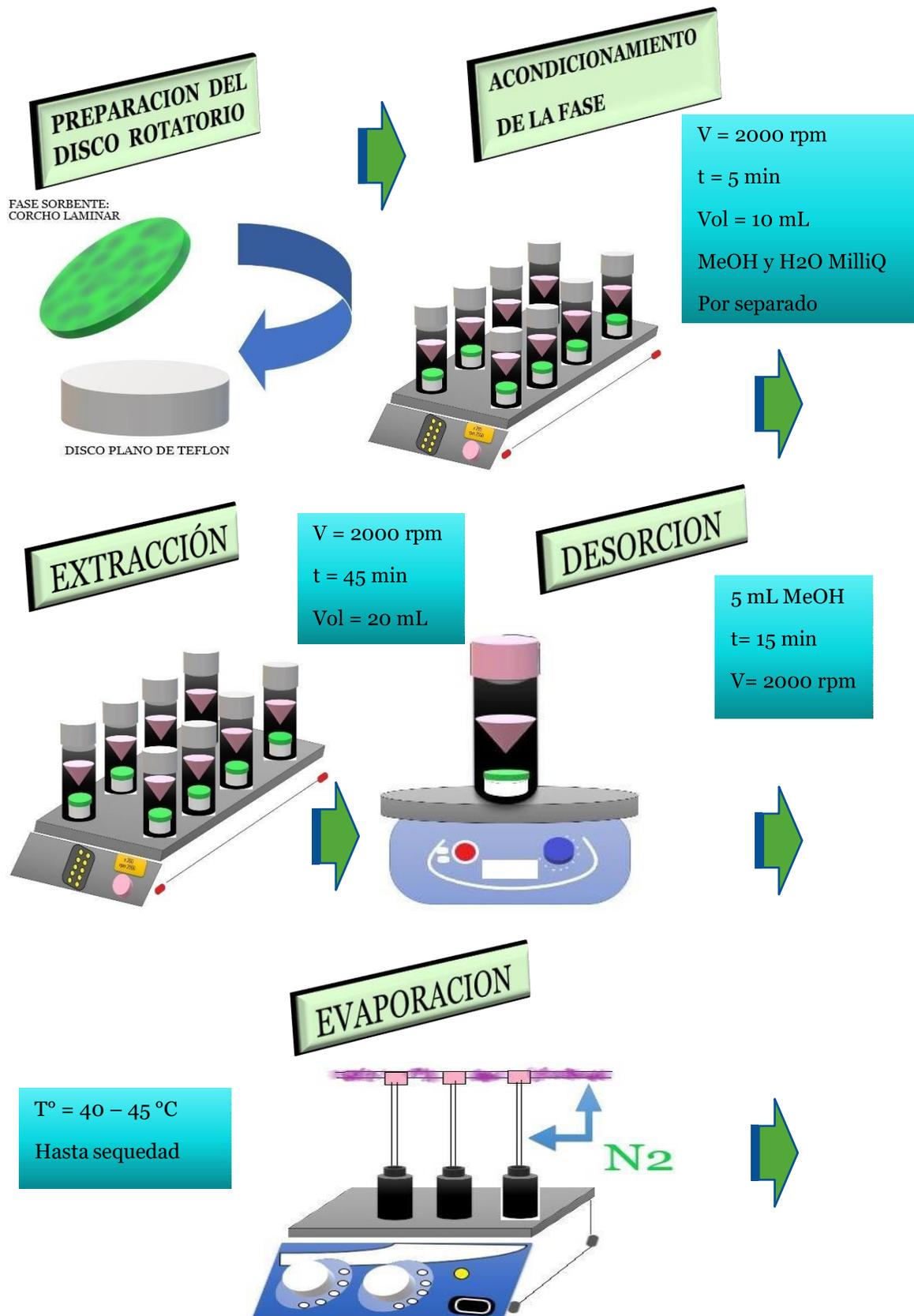
Estas hormonas se han determinado en muestras de agua utilizando diferentes métodos de preparación de muestras. RDSE se ha aplicado previamente en muestras de agua utilizando Oasis® HLB como fase de absorción [64]. Con esta fase de absorción sintética se obtuvo una recuperación ligeramente mayor (78-107%) y una precisión similar (RDS = 8%). El volumen de la muestra y el tiempo de extracción fueron mayores (25 ml y 60 min) con Oasis® HLB, y los límites de detección también fueron mayores, entre 5 y 39 ng L⁻¹.

En comparación con otras técnicas de microextracción, como la microextracción en fase sólida (SPME) con poliacrilato como la fase sorbente [47-49], los tiempos de extracción informados fueron los mismos (45 min) y más altos en algunos casos (entre 60 y 90 min) con límite de detección está entre 7 y 400 ng L⁻¹, que fueron más altos que los obtenidos con el presente método de microextracción (entre 3 y 19 ng L⁻¹).

Además, el poliacrilato mostró bajas recuperaciones (63%) en algunos casos. En el caso de SBSE con polidimetilsiloxano [46], las recuperaciones fueron más bajas, entre 11 y 25%, con una DSR del 8% y entre 55 y 98%, con una DSR de aproximadamente el 15%. Los tiempos de extracción fueron mayores (120 min), los límites de detección estuvieron entre 0.2 y 25 µg L⁻¹, y las muestras en el estudio

fueron de agua pura y ultra pura, en contraste con el método propuesto en aguas residuales. Por otro lado, la microextracción de fibra hueca recubierta con polímero proporcionó características analíticas similares a las del RDSE, sin embargo, se utilizó una fase sintética de polimetilmetacrilato di hidroxilado en lugar del material comercial propuesto en este estudio. Se pueden revisar varios trabajos basados en la extracción en fase sólida con Oasis® HLB como la fase sorbente [45,52] sin embargo, en su mayor parte, los tiempos de extracción son más largos (100–240 min) y tienen un límite de detección más alto (0.3–1 ngL⁻¹).

7.5 Esquema de la metodología desarrollada. Figura 39



RECONSTITUCION

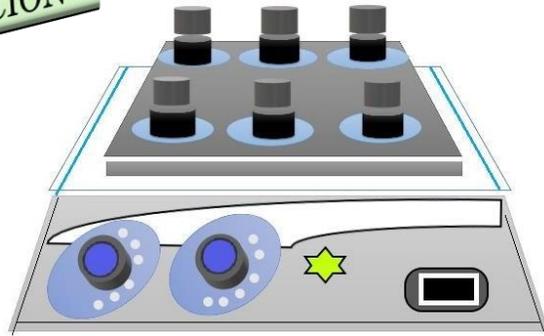
50 µL MSTFA
50 µL PIRIDINA

RECONSTITUIR
VOLUMEN

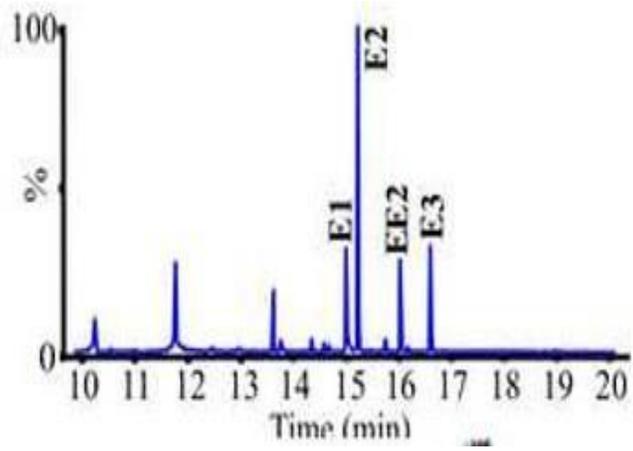


DERIVATIZACION

T° = 80 °C
t = 30 min



Análisis GC-MS



VIII. CONCLUSIONES.

La combinación de RDSE con GC-MS permitió desarrollar una metodología analítica par la determinación de estrógenos desde muestras acuosas, utilizando lámina de corcho como fase sorbente. Así las concentraciones encontradas en aguas residuales obtenidas de una planta de tratamiento de la región metropolitana fueron en un rango de 10 a 62 ngL⁻¹ y recuperaciones entre 63 y 89%.

Importante es señalar que los componentes del corcho como suberina y lignina proporcionan sitios de sorcion para los compuestos orgánicos, con la probabilidad de generar enlaces de hidrógenos con grupos OH⁻ y enlaces $\pi - \pi$. Los resultados obtenidos en comparación con las fibras sintéticas demostraron el gran potencial del corcho, en su capacidad extractora de su superficie, además de ser una fase fácil de obtener, manipular, rápida y de bajo costo. La caracterización de lámina de corcho mostró su similitud con el corcho en polvo, pues no requiere molienda ni tamizado para su uso.

La metodología fue optimizada definiendo el uso de un disco plano de teflón y corcho laminar de 15 mm de diámetro para la extracción ,20 mL de muestra de agua residual, durante 45 min a 2000 rpm. Está demostrado entonces que la lámina de corcho es una fase de absorción verde y natural alternativa para utilizar en los compuestos análogos a los analitos modelos utilizados en este trabajo y que tienen afinidad con este eco material.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- [1] Caldwell, D. J., Mastrocco, F., Anderson, P. D., Lange, R., & Sumpter, J. P. (2012). Predicted-No-Effect Concentrations for the Steroid Estrogens: Estrone, 17 β -Estradiol, Estriol, and 17 α -Ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(6), 1396-1406.
- [2] Matozzo, V., Gagne, F., Marin, M. G., Ricciardi, F., & Blaise, C. (2008). Vitellogenin as a Biomarker of Exposure to Estrogenic Compounds in Aquatic Invertebrates: A Review. *Environment International*, 34, 531-545.
- [3] Tomsíková H., Aufartová J., Solich P., Sosa-Ferrada Z., Santana-Rodríguez J., Nováková L. Trends in Analytical Chemistry 34 (2012) 35-58.
- [4] M. Diaz-Cruz, M. J. López de Alda, R. López, D. Barceló. Journal of Mass Spectrometry, 38 (2003) 917-923.
- [5] K. Kozłowska-Tylingo, J. Namieśnik, T. Górecki. Analytical Chemistry, 40 (2010) 194-201.
- [6] H.-X. Wang, Y. Zhou, Q.-W. Jiang. Microchemical Journal, 100 (2012) 83-94.
- [7] E. Wielogórska, C.T. Elliott, M. Danaher, L. Connolly. Toxicology in Vitro, 29 (2015) 211 - 220.
- [8] GÓMEZ, Gregorio. Bases farmacológicas de la conducta. [En línea]. Copyright, 2011. [Citado el 2 de mayo de 2012].
- [9] VULLIET, Emmanuelle y CREN-OLIVÉ, Cécile. Screening of pharmaceuticals and hormones at the regional scale, in surface and groundwaters intended to human consumption. En: Environmental Pollution. 2011. Vol. 159. p. 2929-2934
- [10] KIM, S. D.; et al. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. En: Water Res. 2007. Vol. 41. p. 1013-1021

- [11] Liu Z., Kanjo Y., Mizutani S. *Science of the Total Environment* 407 (2009) 4975-4985.
- [12] WRITER, Jeffrey; et al. Anthropogenic tracers, endocrine disrupting chemicals, and endocrine disruption in Minnesota lakes. En: *Science of the Total Environment*. 2010. Vol. 409. p. 100–111
- [13] D. Serfaty, R. Gabriel, I. Leclercq. *EMC – Ginecología Obstetricia*, 45 (2009) 1-13
- [14] C. N. Duong, J. S. Ra, J. Cho, S. D. Kim, H. K. Choi, J.H. Park, K. W. Kim, E. Inam, S. D. Kim. *Chemosphere*, 78 (2010) 286-293.
- [15] A.M. Andersson, N. E. Skakkebae. *European Journal of Endocrinology*, 140 (1999) 477-485.
- [16] B. Socas-Rodríguez, M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, A. V. Herrera-Herrera, M. Á. Rodríguez-Delgado. *Trends in Analytical Chemistry*, 44 (2013) 58-77.
- [17] Chen, H.-C., H.-W. Kuo, and W.-H. Ding. 2009. Determination of estrogenic compounds in wastewater using liquid chromatography-tandem mass spectrometry with electrospray and atmospheric pressure photoionization following desalting extraction. *Chemosphere* 74: 508–14. d
- [18] J. Huang, J. Sun, Y. Chen, Y. Song, L. Dong, Q. Zhan, R. Zhang, Z. Abliz. *Analytica Chimica Acta*, 711 (2012) 60-68.
- [19] P.B. DeLaune, P.A. Moore. *Science of the Total Environment*, 444 (2013) 26-31.
- [20] M. Kuster, M. J. López de Alda, D. Barceló. *Trends in Analytical Chemistry*, 23 (2004) 790-798.
- [21] H. Malekinejad, P. Scherpenisse, A. Bergwerff. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54 (2006) 9785-9791

- [22] 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.
- [23] 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
- [24] G.-W. Lien, C.-Y. Chen, G.-S. Wang. *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009) 956-966.
- [25] C. Blasco, C. Van Poucke, C. Van Peterghem. *Journal of Chromatography A*, 1154 (2007) 230-239.
- [26] Almeida, C., and J. M. F. Nogueira. 2006. Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 1303–11. doi: 10.1016/j.jpba.2006.02.037
- [27] J. Pawliszyn. *RSC chromatography monographs*, Royal Society of Chemistry, Cambridge 655, 1999.
- [28] L. Montero, P. Popp, A. Paschke, J. Pawliszyn. *Journal. Chromatography A*, 1025 (2004) 17-26.
- [29] Y. Hu, Y. Fan, G. Li. *Journal of Chromatography A*, 1228 (2012) 205–212.
- [30] X. Huang, D. Yuan, B. Huang. *Talanta*, 75 (2008) 172-177.
- [31] A. Stopforth, B. V. Burger, A. M. Crouch, P. Sandra. *Journal of Chromatography B*, 856 (2007)

- [32] 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
- [33] BOLONG, N.; et al. A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. En: *Desalination*. 2009. Vol. 239. p. 229-246
- [34] TEIJON, Gloria; et al. Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/ CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility. En: *Science of the Total Environment*. 2004. Vol. 408, N° 17, p. 3584-3595.
- [35] 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.
- [36] Beck, J., K. U. Totsche, and I. Kögel-Knabner. 2008. A rapid and efficient determination of natural estrogens in soils by pressurised liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere* 71: 954–60. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.11.062
- [37] Beck, I.-C., R. Bruhn, J. Gandrass, and W. Ruck. 2005. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of estrogenic compounds in coastal surface water of the Baltic Sea. *Journal of Chromatography A* 1090: 98–106. Doi: 10.1016/j.chroma.2005.07.013
- [38] Nelson, J., F. Bishay, A. van Roodselaar, M. Ikonou, and F. C. P. Law. 2007. The use of in vitro bioassays to quantify endocrine disrupting chemicals in municipal wastewater treatment plant effluents. *Science of the Total Environment* 374: 80–90. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2006.11.031

- [39] Duong, C. N., J. S. Ra, J. Cho, S. D. Kim, H. K. Choi, J-H. Park, K. W. Kim, E. Inam, and S. D. Kim. 2010. Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries. *Chemosphere* 78: 286–93. doi: 10.1016/j.chemosphere.2009.10.048
- [40] Socas-Rodríguez, B., M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, A. V. Herrera-Herrera, and M. A. Rodríguez-Delgado. 2013. Chromatographic analysis of natural and synthetic estrogens in milk and dairy products. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 44: 58–77. Doi: 10.1016/j.trac.2012.10.013 o
- [41] Seo, J., H.-Y. Kim, B. C. Chung, and J. Hong. 2005. Simultaneous determination of anabolic steroids and synthetic hormones in meat by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1067: 303–09. Doi: 10.1016/j. chroma.2004.12.063 i: 10.1016/j. chemosphere.2008.09.089
- [42] Liu, W., L. Zhang, L. Fan, Z. Lin, I. Cai, Z. Wei, and G. Chen. 2012. An improved hollow fiber solvent- stir bar microextraction for the preconcentration of anabolic steroids in biological matrix with determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1233: 1–7.
- [43] López De Alda, M. J., and D. Barceló. 2000. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography- diode array detection-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 892: 391–06. Doi: 10.1016/s0021-9673(00)00068-6
- [44] Migowska, N., M. Caban, P. Stepnowski, and J. Kumirska. 2012. 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. *Science of the Total Environment* 441: 77–88. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.09.043

- [45] Wang, H.-X., Y. Zhou, and Q. W. Jiang. 2012. Simultaneous screening of estrogens, progestogens, and phenols and their metabolites in potable water and river water by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Microchemical Journal* 100: 83–94. Doi: 10.1016/j.microc.2011.09.010
- [46] Vo Duy, S., P. B. Fayad, B. Barbeau, M. Prévost, and S. Sauvé. 2012. Using a novel sol–gel stir bar sorptive extraction method for the analysis of steroid hormones in water by laser diode thermal desorption/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry. *Talanta* 101: 337–45. Doi: 10.1016/j.talanta.2012.09.036
- [47] Peñalver, A., E. Pocurull, F. Borrull, and R. M. Marce. 2002. Method based on solid-phase microextraction – High-performance liquid chromatography with UV and electrochemical detection to determine estrogenic compounds in water samples. *Journal of Chromatography A* 964: 153–60. Doi: 10.1016/s0021-9673(02)00694-5
- [48] Carpinteiro, J., J. B. Quintana, I. Rodríguez, A. M. Carro, R. A. Lorenzo, and R. Cela. 2004. Applicability of solid-phase microextraction followed by on-fiber silylation for the determination of estrogens in water samples by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1056: 179–85
- [49] Yang, L., T. Luan, and C. LAN. 2006. Solid-phase microextraction with on-fiber silylation for simultaneous determinations of endocrine disrupting chemicals and steroid hormones by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1104: 23–32. Doi: 10.1016/j.chroma.2005.11.108
- [50] Lu, C., M. Wang, J. Mu, D. Han, Y. Bai, and H. Zhang. 2013. Simultaneous determination of eighteen steroid hormones in antler velvet by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 141: 1796–806. Doi: 10.1016/j.foodchem.2013.04.104
- [51] Xu, X., F. Liang, J. Shi, X. Zhao, Z. Liu, L. Wu, Y. Song, H. Zhang, and Z. Wang. 2013. Determination of hormones in milk by hollow fiber-based stirring extraction bar liquid-liquid microextraction gas chromatography mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 790: 39–46. Doi: 10.1016/j.aca.2013.06.035

- [52] Basheer, C., A. Jayaraman, M. K. Kee, S. Valiyaveetil, and H. K. Lee. 2005. Polymer-coated hollow-fiber microextraction of estrogens in water samples with analysis by gas chromatography- mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1100: 137–43. Doi: 10.1016/j.chroma.2005. 09.039
- [53] Chemicalize [en línea] <<http://www.chemicalize.org>> [consulta: 25 de marzo 2015].
- [54] J. Raba, H. Mottola, *Analytical Chemistry*, 66 (1994) 1485-1489.
- [55] P. Richter, B. López-Ruiz, M. Sánchez-Cabezudo, H. Mottola, *Analytical Chemistry*, 68 (1996) 1701-1705
- [56] C. Almeida, A. Stepkowska, A. Alegre, J.M.F. Nogueira, Determination of trace levels of benzophenone-type ultra-violet filters in real matrices by bar adsorptive micro-extraction using selective.
- [57] M. Kaykhaia, G.W. Dicoskia, R. Smedleya, J. Pawliszyn, P.R. Haddada, *J. Chromatogr.A*1217(2010) 3452– 3456.
- [58] A. N. Dias, Vanessa Simão, Josias Merib, Eduardo Carasek*; Cork as a new (green) coating for solid-phase microextraction: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by gas chromatography–mass spectrometry (36-37)
- [59] A.N. Dias, Ana Cristine da Silva, Vanessa Simão, ~ Josias Merib, Eduardo Carasek. -A novel approach to bar adsorptive microextraction: Cork as extractor phase for determination of benzophenone, triclocarban and parabens in aqueous samples (63-64)
- [60] MA Olivella.PJosé, AOLiveras, J.Eviron.SCI.Health A: Tox. Hazard Subst. Eviron. 46(2011) 824832.
- [61] C.P. Neto, J. Rocha, A Gil, N. Cordeiro, AP Esculcas, S. Rocha, I.Delgadillo, J: DP. De Jesús.
- [62] Bento MF, Pereira H, Cunha MA, Moutinho AMC, Van den Berg KJ, Boon JJ (2001) A study of variability of suberin composition in cork from *Quercus suber* L. using thermally assisted transmethylation GC-MS. *J Anal Appl Pyrol* 57(1): 45–55

- [63] 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, n
- [64] 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.o. 5, pp. 2425–2429, 2011
- [65] 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.
- [66] 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.
- [67] 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.
- [68] M. S. Diaz-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.
- [69] L. Honda, M. Becerra-Herrera, P. Richter, Liquid chromatography–time-of-flight high-resolution mass spectrometry study and determination of the dansylated products of estrogens and their hydroxylated metabolites in water and wastewater, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 7909–7919.
- [70] C. Ortega-Fernández, J.R. Gonzalez-Adrados, M.C. García-Vallejo, R. Calvo-Haro, M.J. Cáceres-Esteban, Characterization of surface treatments of cork stoppers by FTIR-ATR, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 4932–4936.