

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS DE ESTEROIDES EN AGUA RESIDUAL MEDIANTE
EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE) Y CROMATOGRAFÍA DE
GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS (GC-MS)**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

PRESENTA

NATALIA RUBIO HERNÁNDEZ



CD. MX.

2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:

Profesor: Francisco Rojo Callejas

VOCAL:

Profesor: Luis Alejandro Díaz Flores

SECRETARIO:

Profesor: Elizabeth Reyes López

PRIMER SUPLENTE:

Profesor: Claudia Inés Rivera Cárdenas

SEGUNDO SUPLENTE:

Profesor: Elba Rojas Escudero

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO 102, DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO, FACULTAD DE QUÍMICA,
UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

M. EN C. FRANCISCO ROJO CALLEJAS

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C. ELBA ROJAS ESCUDERO

SUSTENTANTE:

NATALIA RUBIO HERNÁNDEZ

TABLA DE CONTENIDO

0. ÍNDICE DE ABREVIACIONES.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. OBJETIVOS.....	5
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	5
2.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	5
2.3 JUSTIFICACIÓN.....	5
3. ANTECEDENTES.....	6
3.1 ESTEROIDES.....	6
3.2 AGUAS RESIDUALES EN EL VALLE DEL MEZQUITAL.....	8
3.3 ESTEROIDES EN AGUAS RESIDUALES Y SUS EFECTOS.....	10
3.4 FORMACIÓN DE DERIVADOS PARA ANÁLISIS INSTRUMENTAL.....	11
3.4.1 Reacciones y reactivos para formación de los derivados.....	12
3.5 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS).....	14
3.5.1 Fundamentos físicos de la EFS.....	16
3.5.2 Cartuchos de EFS.....	17
3.5.3 Etapas de la EFS.....	21
3.6 CROMATOGRAFÍA DE GASES.....	25
3.6.1 Instrumentación en CG.....	27
3.7 ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	31
3.7.1 Instrumentación.....	32
3.8 CROMATOGRAFÍA DE GASES – ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	34
3.8.1 Usos y aplicaciones.....	35
3.8.2 Cuantificación por CG – EM.....	36
3.8.3 Validación de métodos.....	37
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	40
4.1 EQUIPOS Y MATERIALES.....	40
4.2 REACTIVOS.....	41
4.3 MUESTRAS DE AGUA RESIDUAL.....	42
4.4 PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES ESTÁNDAR.....	42
4.5 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS).....	43
4.6 FORMACIÓN DE LOS DERIVADOS SILILADOS.....	44
4.7 ANÁLISIS POR CG – EM.....	44

4.8	CURVA DE CALIBRACIÓN POR ESTÁNDAR EXTERNO.	45
4.9	PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.	45
4.10	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS.	46
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	48
5.1	ANÁLISIS POR CG – EM.	48
5.2	OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.	50
5.3	FORMACIÓN DE LOS DERIVADOS SILILADOS.	53
5.4	CURVA DE CALIBRACIÓN POR ESTÁNDAR EXTERNO.	58
5.5	PREPARACIÓN Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.	59
5.6	PARÁMETROS ESTADÍSTICOS.	64
6.	CONCLUSIONES.	68
7.	BIBLIOGRAFÍA.	70
8.	ANEXOS.	75
8.1	ANEXO 1.	75
8.2	ANEXO 2.	76
8.3	ANEXO 3.	80
8.4	ANEXO 4.	82

0. ÍNDICE DE ABREVIACIONES.

AMCM	Área Metropolitana de la Ciudad de México
BSA	N,O-Bis(trimetilsilil)acetamida (por sus sigla en inglés)
CG	Cromatografía de Gases
CG – EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
BSTFA	N.O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (por sus siglas en inglés)
DER	Desviación Estándar Relativa
DMF	N,N-dimetilformamida
EFS	Extracción en Fase Sólida
ELL	Extracción Líquido – Líquido
EM	Espectrometría de Masas
Fr	Factor de respuesta
HMDS	Hexametildisilazano (por sus siglas en inglés)
LD	Límite de Detección
LC	Límite de Cuantificación
M ⁺	Ión molecular
MSTFA	N-trimetilsilil-N-metil trifluoroacetamida (por sus siglas en inglés)
NIST	Instituto Nacional de Normas y Tecnología (por sus siglas en inglés)
PB	Pico base
ppb	Partes por billón
ppm	Partes por millón

rpm	Revoluciones por minuto
SIM	Monitoreo Selectivo de Iones (por sus siglas en inglés)
TMS	Trimetilsilil
TMCS	Trimetilclorosilano (por sus siglas en inglés)
tr	Tiempo de retención

1. INTRODUCCIÓN

En el planeta se generan diferentes contaminantes, en su mayoría, son tratados para evitar el daño a los ecosistemas, pero algunos son ignorados debido al poco conocimiento que se tiene sobre ellos. Un claro ejemplo de lo antes mencionado son los esteroides.

Existen diferentes tipos de esteroides, los sintéticos y los naturales. El estradiol y el estriol son estrógenos naturales, son producidos principalmente por los ovarios y por la placenta de la mujer durante el embarazo. El etinilestradiol y el mestranol son dos compuestos sintéticos derivados del estradiol, su principal uso es en pastillas anticonceptivas. Estos compuestos son desechados del cuerpo humano en un 70% por orina y 30% por heces, debido a su estructura son desechados de forma libre, es por esto por lo que se pueden encontrar en el agua del drenaje o cualquier tipo de agua residual ¹.

En México no existe una norma que regule el tratamiento de esteroides en aguas residuales, sin embargo, en otros países se ha demostrado que concentraciones pequeñas de éstos llegan a afectar la reproducción de algunos peces ya que son compuestos capaces de crear un desequilibrio hormonal en humanos y animales ^{13,14}.

Debido a lo anterior, surgió el interés por encontrar una metodología analítica para determinar la concentración de cuatro esteroides (estradiol, estriol, mestranol y etinilestradiol) en agua residual de cuatro canales diferentes del Valle del Mezquital, Hidalgo. La mayor dificultad técnica que se presenta en el análisis de esteroides en agua residual es que estos compuestos se encuentran presentes en concentraciones bajas y las matrices que los contienen presentan interferencias de distinta naturaleza. Con esta información y basados en la literatura, la técnica más utilizada para el análisis de estos compuestos es la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG – EM), como una técnica sensible que permite separar mezclas complejas y detectar cantidades bajas, del orden de ppm (mg/L) o incluso de ppb ($\mu\text{g/L}$) y la técnica de la Extracción en Fase Sólida (EFS), que permite eliminar

las interferencias en la muestra y concentrar los analitos de interés para su posterior análisis ³¹.

Este trabajo se dividió en dos etapas; la primera etapa consistió en seleccionar los parámetros óptimos de la extracción en fase sólida y de la formación del derivado sililado. En segundo término, se estableció un programa de temperatura para la separación y determinación de los estándares de los analitos de interés. Esta metodología, se aplicó en el análisis confiable de los cuatro esteroides.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general.

Desarrollar una metodología analítica para la determinación de esteroides en aguas residuales del Valle del Mezquital mediante las técnicas de Extracción en Fase Sólida (EFS) seguido de Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (CG – EM).

2.2 Objetivos particulares.

- ❖ Establecer los parámetros para la extracción de esteroides mediante la técnica EFS.
- ❖ Optimizar los parámetros que influyen en la reacción para formar el derivado sililado de cada esteroide.
- ❖ Establecer las condiciones óptimas para separar e identificar por CG – EM los cuatro compuestos de interés.
- ❖ Aplicar la metodología optimizada en muestras de aguas residuales.
- ❖ Aplicar el método de calibración externa para la cuantificación de los cuatro compuestos de interés por estándar externo.

2.3 Justificación.

Actualmente existen reportes sobre diferentes metodologías para el análisis de esteroides en aguas residuales utilizando las técnicas de EFS y CG – EM, en el presente trabajo se pretende mejorar la técnica utilizando microondas como fuente de energía para la reacción de formación del derivado sililado; desarrollando un método más rápido, económico y eficaz.

3. ANTECEDENTES

3.1 Esteroides

Los esteroides son moléculas orgánicas derivadas del núcleo lanosterol (figura 1) y cuyas estructuras se basan en un sistema de anillos tetracíclicos. Los cuatro anillos presentes en la estructura se designan como A, B, C y D, iniciando por la parte inferior izquierda.

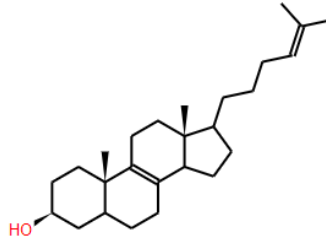


Figura 1. Estructura de lanosterol.

La principal función de los esteroides en el cuerpo humano es producir hormonas, las hormonas funcionan como mensajeros químicos y son secretadas por las glándulas endócrinas. Existen dos tipos de hormonas esteroidales: las hormonas sexuales y las hormonas adrenocorticales ¹.

Las hormonas sexuales controlan diferentes procesos como la maduración, la reproducción y el crecimiento de los tejidos. Un ejemplo de estas hormonas son el estradiol (figura 2) y el estriol (figura 3); estos compuestos son las dos hormonas femeninas más importantes, son sintetizadas en los ovarios y son responsables del desarrollo de las características sexuales femeninas y de la regulación del ciclo menstrual ¹.

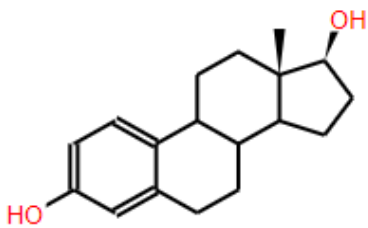


Figura 2. Estructura del 17β-estradiol.

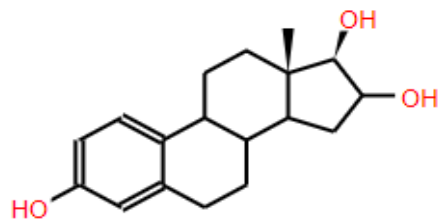


Figura 3. Estructura del estriol.

Por otra parte, las hormonas adrenocorticales son secretadas por las glándulas adrenales que se encuentran localizadas en los riñones; tienen diferentes funciones como controlar la inflamación de los tejidos, la regulación del metabolismo de la glucosa, entre otros.

Además de los cientos de esteroides naturales existen también los esteroides sintéticos, principalmente se han sintetizado en la búsqueda de nuevos fármacos. Entre los esteroides sintéticos más utilizados están los anticonceptivos orales. La mayoría de los anticonceptivos contienen estrógenos sintéticos como el etinilestradiol (figura 4) y el mestranol (figura 5) ¹.

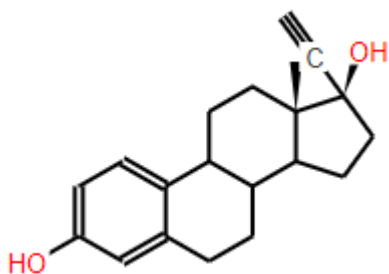


Figura 4. Estructura del etinilestradiol.

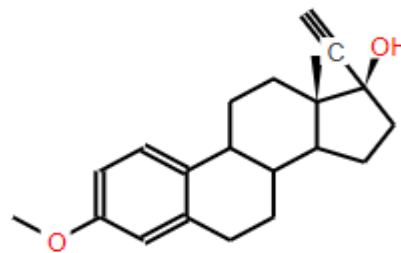
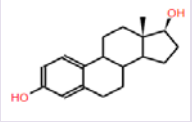
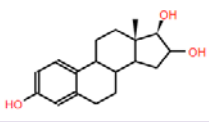
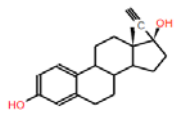
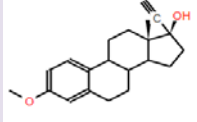


Figura 5. Estructura del mestranol.

Además de ser utilizados en anticonceptivos tienen otros usos como: prevenir o reducir los síntomas de la menopausia, tratar enfermedades relacionadas con el déficit de hormonas femeninas, endometriosis, sangrados intermenstruales, esterilidad funcional, etc.

A continuación, se muestran algunas de las propiedades físicas y químicas más importantes de los cuatro esteroides analizados en este trabajo (tabla 1).

Tabla 1. Propiedades físicas y químicas del estradiol, estriol, etinilestradiol y mestranol ².

Esteroides	Estradiol	Estriol	Etinilestradiol	Mestranol
Estructura química				
Fórmula Condensada	C ₁₈ H ₂₄ O ₂	C ₁₈ H ₂₄ O ₃	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	C ₂₁ H ₂₆ O ₂
Peso Molecular (g/mol)	272.38	288.28	296.40	310.43
Punto de Fusión (°C)	176-180	280-282	182-183	153-155
Punto de Ebullición (°C)	562	650	598	568

Nota: Los valores para el punto de ebullición son estimados por el método de SE Stein.

3.2 Aguas residuales en el Valle del Mezquital.

Las aguas residuales pueden clasificarse dependiendo de su origen:

Las aguas residuales domésticas o aguas negras son las provenientes de la descarga sanitaria, del aseo personal, de la cocina o de la limpieza de la casa. Las aguas blancas son aquellas que vienen de la lluvia. Las aguas industriales son las que proceden de fábricas e industrias. Finalmente, las aguas residuales agrícolas son las que provienen de las labores agrícolas en zonas rurales ³.

El agua residual proveniente de la Área Metropolitana de la Ciudad de México (o AMCM) es dirigida al Valle del Mezquital, ésta es reutilizada para riego principalmente y para recargar mediante infiltraciones el Acuífero del Valle del Mezquital ⁴.

El AMCM cuenta con tres canales que llevan el agua fuera de esta región; el Gran Canal de Desagüe, el Emisor Poniente y el Emisor Central o Profundo ⁵. Esta agua llega al del Valle del Mezquital para ser reutilizada, este proyecto es conocido como el más grande y el más viejo en el mundo en donde se usa el agua residual para riego sin ser tratada ⁶. Debido a que la economía en el del Valle del Mezquital depende mucho de la agricultura, los campesinos utilizan el agua proveniente del AMCM para regar los cultivos de tomate, maíz, frijol, col, cilantro, rábano, chile verde y alfalfa ⁷.

Esta agua es descargada en los tres canales antes mencionados, de los cuales el Emisor Profundo es el único que se encuentra totalmente cubierto y descarga aproximadamente la mitad del total de las aguas residuales del AMCM, esta agua tarda en llegar al Valle del Mezquital aproximadamente un día. En la figura 6, se muestra en el área sombreada gris la zona donde se utiliza el agua negra para riego sin tener ningún tipo de tratamiento previo. Posteriormente, el agua se almacena en la presa Endhó con un tiempo de residencia promedio de tres meses, en la presa el agua residual es sometida a un tratamiento primario por sedimentación ⁸; este consiste en dejar el agua de la presa estática, para que los sólidos que posee se separen y se dirijan al fondo, mientras mayor sea el tiempo de reposo mayor será el asentamiento y consecuentemente la turbidez será menor, haciendo el agua más transparente ⁹. Después de pasar por el proceso de sedimentación el agua es utilizada en el norte del Valle para riego. El exceso de agua de riego es distribuido en diferentes canales de drenaje y manantiales del río Tula ⁸.

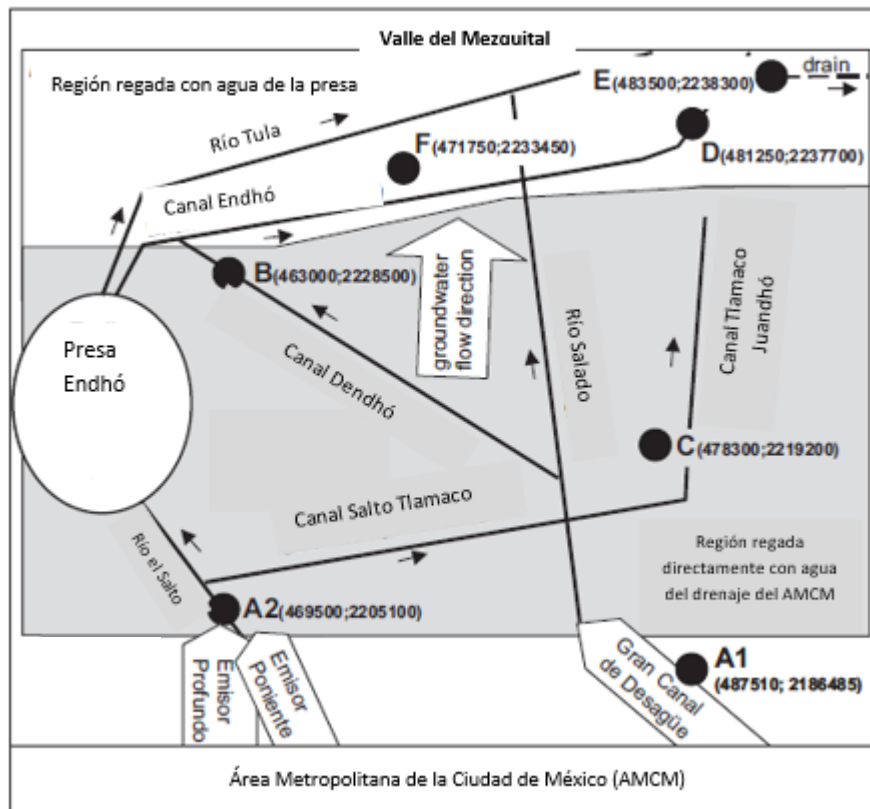


Figura 6. Representación esquemática del flujo del agua del AMCM al Valle del Mezquital.⁸

Algunos de los canales de drenaje que contienen esta agua, se encuentran los analizados en este trabajo. El canal Tlamaco – Juandhó, Dendhó, Sifón Bojay y el canal Cerro de la Cruz. La localización exacta de los cuatro canales se puede consultar en el anexo 1.

3.3 Esteroides en aguas residuales y sus efectos.

Las principales vías de acceso de productos farmacéuticos al medio ambiente son a través de la excreción humana, la eliminación de los productos no utilizados y por el uso agrícola. Se ha detectado una amplia gama de productos farmacéuticos en aguas superficiales y subterráneas, asociada con la eliminación de las aguas residuales. Estos residuos farmacéuticos son transportados a los cuerpos de agua por diferentes rutas: las plantas de tratamiento de aguas residuales actúan como una puerta de entrada de estos productos a los cuerpos de agua, porque muchos de

estos compuestos no son realmente removidos en sus procesos y, además, porque muchos residuos farmacéuticos veterinarios son descargados directamente al ecosistema ¹⁰.

Las aguas residuales contienen microorganismos patógenos como son virus, bacterias y parásitos. El riego con aguas residuales sin tratar, trae como consecuencias daños a la fauna y a la salud humana; representando un riesgo mayor en niños y personas mayores los cuales presentan enfermedades constantes como diarreas^{11,12}.

El tratamiento de aguas residuales está sujeto a las regulaciones y normas locales, estatales y federales del país. Actualmente en México, no existe una norma que establezca el límite permitido de esteroides en estas aguas ¹³.

Se ha demostrado que los esteroides de hormonas sexuales se encuentran presentes en ecosistemas acuáticos, principalmente como resultado de un ineficiente tratamiento de aguas residuales. La concentración de estos compuestos, a pesar de encontrarse en concentraciones muy bajas, es suficiente para inducir respuestas hormonales y alterar la reproducción y el desarrollo de organismos acuáticos y humanos ¹⁴.

3.4 Formación de derivados para análisis instrumental.

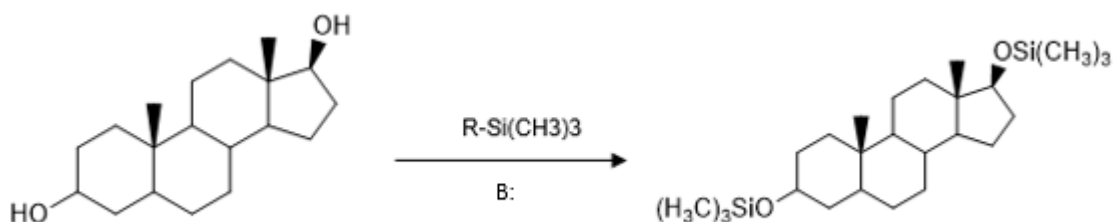
Para que un analito pueda ser determinado por Cromatografía de Gases, se requiere que sea volátil. La formación de los derivados logra que los compuestos altamente polares sean volátiles para que puedan eluir a una temperatura adecuada sin presentar descomposición térmica ¹⁵.

Utilizando esta técnica, los compuestos que contienen grupos funcionales con hidrógenos activos como -SH, -OH, -NH y -COOH son los de mayor interés debido a la tendencia que tienen a formar enlaces de hidrógeno intermoleculares. Estos enlaces de hidrógeno pueden afectar la volatilidad de los compuestos que los

contienen. Las reacciones de formación de los derivados aumentan la volatilidad del compuesto, reduce la adsorción del analito en el sistema cromatográfico, mejora su respuesta al detector, mejora la resolución y la simetría de las señales ¹⁶.

3.4.1 Reacciones y reactivos para formación de los derivados.

Existen cuatro tipos de reacciones de derivatización: esterificación, acilación, alquilación y sililación. La sililación es la reacción utilizada durante este trabajo. La reacción consiste en la introducción de un grupo diferente en una molécula sustituyendo el hidrógeno activo, esto permite reducir la polaridad de los compuestos, aumentar la volatilidad y aumentar la estabilidad térmica dando por resultado picos cromatográficos angostos y simétricos ^{17, 18}.



Esquema 1. Reacción de formación del derivado sililado en un esteroide.

Durante la formación del derivado existen diferentes parámetros que deben ser controlados ya que influyen en la reacción, algunos de ellos son el efecto de los reactivos sililantes en los analitos, los efectos del disolvente, los efectos de la temperatura y los efectos del tiempo de reacción, para evitar la formación de productos no deseados ¹⁷.

Un reactivo para formar un derivado es la sustancia que permite modificar químicamente un compuesto para convertirlo en otro que tenga propiedades adecuadas para el análisis. Estos reactivos deben cumplir con ciertos objetivos para la formación del derivado ¹⁶:

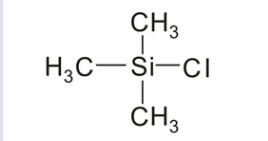
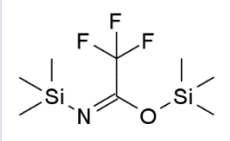
- El reactivo debe producir más del 95% del derivado.
- No debe producir ningún reordenamiento o alteraciones estructurales de los compuestos durante la formación del derivado.
- No debe contribuir a la pérdida de muestra durante la reacción.
- Debe producir un derivado que no interactúe con la fase estacionaria.
- Debe formar un derivado estable con respecto al tiempo.

Para los esteroides, los reactivos sililados son de los más utilizados para formar un derivado, entre estos se encuentran: Hexametildisilazano (HMDS, por sus siglas en inglés), Trimetilclorosilano (TMCS, por sus siglas en inglés), N-Trimetilsililimidazol (TMSI, por sus siglas en inglés), N,O-Bis(trimetilsilil) acetamida (BSA, por sus siglas en inglés), N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA, por sus siglas en inglés), N-trimetilsilil-N-metil trifluoroacetamida (MSTFA, por sus siglas en inglés). Estas sustancias reaccionan para formar derivados trimetilsilil éteres y trimetilsilil ésteres

19.

A continuación, se muestra en la tabla 2 las propiedades fisicoquímicas más importantes de los dos reactivos sililantes utilizados en este trabajo.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas del TMCS y BSTFA.²

Reactivo sililante	TMCS	BSTFA
Estructura química		
Fórmula Condensada	C ₃ H ₉ SiCl	C ₈ H ₁₈ F ₃ NOSi ₂
Peso Molecular (g/mol)	108.64	257.40
Punto de fusión (°C)	-40	-10
Punto de ebullición (°C)	57	45-50
Densidad (g/cm³)	0.856	0.697

En algunos casos, es posible utilizar una mezcla de reactivos sililantes para mejorar la formación del derivado. La mezcla de BSTFA con TMCS es utilizada generalmente para el análisis de esteroides, ya que en combinación con el disolvente adecuado, como N,N-dimetilformamida (DMF), reaccionan con los grupos hidroxilo ácidos de los esteroides para formar el derivado ¹⁷.

3.5 Extracción en Fase Sólida (EFS).

La Extracción en Fase Sólida es la técnica más utilizada en la preparación de muestras, por ejemplo, para limpiar la muestra, para concentrar el o los analitos y para remover los analitos de la matriz, además de ser una técnica eficiente. Esta técnica recibe su nombre debido a que el material mediante el cual pasa la muestra es un sólido ²⁰.

La EFS es el proceso de preparación de muestra, se lleva a cabo entre la colección de la muestra y el análisis mediante la técnica deseada, como la CG. Para entender la EFS, se puede partir de la Extracción Líquido – Líquido (ELL) ésta consiste en que la muestra se agita junto con un disolvente de extracción que es inmiscible con la muestra líquida, al ser agitada toda la mezcla se separa en dos fases y la mayoría de los analitos habrán quedado en la fase del disolvente de extracción. Después de cierto tiempo se establece un equilibrio entre las dos fases el cual se describe mediante el coeficiente de partición, que es la relación de concentraciones para el analito en ambas fases; para el caso de la EFS se utiliza una fase polimérica y no un líquido de extracción ²¹.

El proceso de la EFS se da mediante un intercambio de adsorción – desorción de los analitos en la superficie del material activo del cartucho, donde se establece un equilibrio entre la concentración del analito en la fase estacionaria y la fase móvil ²².

La extracción, en la mayoría de los casos es realizada en un colector de EFS (figura 7). Los componentes del colector son: una cubierta resistente a productos químicos, un recipiente de vidrio, un medidor de vacío, una válvula de purga de vacío, válvulas

de control de flujo, agujas para guiar el disolvente y una gradilla de plástico para sostener los tubos colectores ²³.

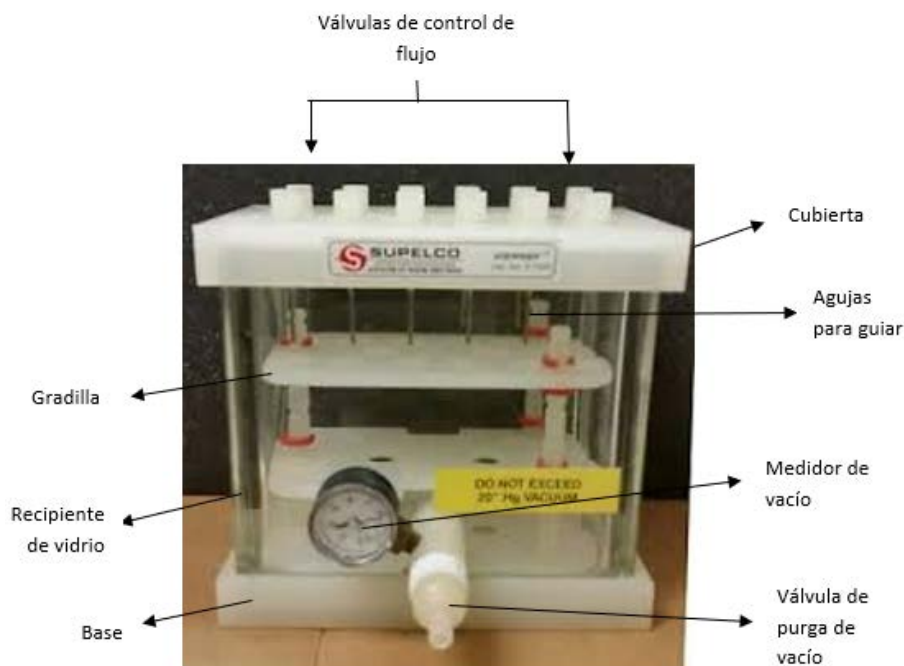


Figura 7. Colector de SPE.

Al realizar una EFS se obtienen ventajas que no se logran obtener con otras técnicas de extracción. A continuación, se mencionan algunas de estas.

- La fase sólida evita que los analitos adsorbidos se descompongan por lo que pueden ser almacenados sin variar su concentración ²¹.
- Mediante la EFS se pueden extraer un amplio intervalo de compuestos orgánicos en diferentes tipos de muestras como las biológicas ²⁴.
- Menor consumos de disolventes y reactivos por lo que se genera una menor cantidad de residuos en comparación con la Extracción Líquido – Líquido ²⁴.
- Permite la concentración de sustancias a nivel de trazas ²⁵.
- Permite extraer analitos a pesar de encontrarse a nivel de trazas en la muestra ²⁴.
- “Limpia” la muestra de impurezas ²⁴.

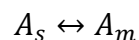
Los instrumentos analíticos utilizados para la determinación de compuestos en matrices complejas requieren que las muestras se encuentren libres de interferencias que pudieran dañarlo; por ejemplo, si la matriz es de agua residual, es necesario extraer los analitos y eliminar las interferencias de la muestra, la EFS permite realizar este procedimiento dando como resultado el cuidado al equipo y picos cromatográficos definidos ²¹.

3.5.1 Fundamentos físicos de la EFS.

Al terminar el proceso de acondicionamiento del cartucho y carga de la muestra, las interacciones entre los analitos y la fase sólida del cartucho se ven alteradas por el lavado con volúmenes de disolvente orgánico, esto conduce a la desorción de los analitos de la fase sólida.

Dependiendo de la naturaleza de la fase sólida será el mecanismo de retención de solutos que rija el proceso de adsorción – desorción durante la EFS.

La EFS puede considerarse como una extracción sólido – líquido, en la cual existe un equilibrio entre la concentración del analito en la fase sólida A_s y la fase líquida A_m .



Ecuación 1. Equilibrio en una extracción líquido-sólido.

Cuando el analito es retenido en la columna el equilibrio se desplaza hacia la izquierda, mientras que al finalizar la extracción debe estar desplazado hacia la derecha ²⁵.

Este equilibrio es caracterizado por una constante de equilibrio $K(X)$ que describe la relación entre la concentración de la especie X en la fase estacionaria ($C_{x,s}$) y la fase móvil ($C_{x,m}$) ²⁶.

$$K(x) = \frac{C_{x,s}}{C_{x,m}}$$

Ecuación 2. Constante de equilibrio K(X).

3.5.2 Cartuchos de EFS.

En 1970 se introdujeron los cartuchos adsorbentes desechables lo que aumentó el uso de esta técnica. Estos cartuchos contienen poros que permiten el procesamiento de la muestra.

El cartucho (figura 8) consiste en una columna o cartucho de plástico que contiene cierta cantidad de un polímero (desde 100 hasta 500 mg) de diferente polaridad, con un tamaño de partícula del orden de 40 a 60 μm ²⁷.

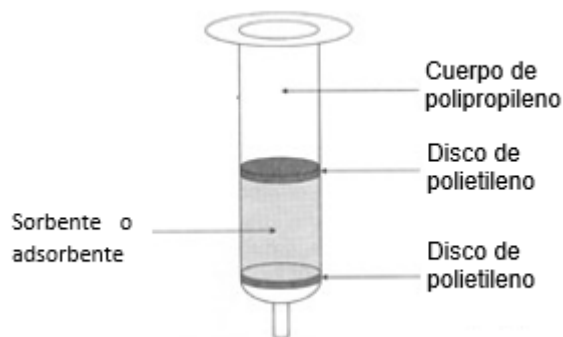


Figura 8. Cartucho de SPE ²⁷.

La muestra es cargada en el cartucho y pasa a través de éste de tres diferentes formas: mediante un émbolo (presión positiva), aplicando vacío (presión negativa) o por centrifugación ²⁸.

Los compuestos neutros no polares se retienen utilizando disolventes polares en columnas no polares, como C₈ y C₁₈ (tabla 3) estas columnas se acondicionan con agua y algún disolvente orgánico; los analitos neutros no polares se extraen con disolventes orgánicos como metanol o metanol/agua en diferentes proporciones.

En el caso de compuestos iónicos la extracción se consigue modificando la fuerza iónica y el contenido del disolvente orgánico del medio.

Los compuestos ácidos se retienen en columnas intercambiadoras de aniones si el pH del medio es dos unidades mayores que el valor del pka del ácido y la extracción se consigue disminuyendo el pH del medio por debajo de su pka, incrementando la fuerza iónica o utilizando un disolvente orgánico.

En el caso de los compuestos básicos se retienen en columnas intercambiadoras de cationes si el pH del medio es dos unidades menores que el valor del pka de la base y la extracción se consigue aumentando el pH del medio por encima de su pka, aumentando la fuerza iónica o utilizando disolventes orgánicos ²⁹.

Existen diferentes materiales para el adsorbente de los cartuchos, la elección de éste dependerá de la naturaleza química de los analitos de interés; la tabla 3 presenta los diferentes tipos de cartuchos disponibles comercialmente.

Tabla 3. Tipos de cartuchos, abreviación y propiedades de extracción de cartuchos más comunes ²¹.

Cartucho	Abreviación	Propiedades
Octadecil	C ₁₈ , ODS	No polar
Octil	C ₈	No polar
Etil	C ₂	No polar
Fenil	Ph	No polar
Ciclohexil	Ch	No polar
Cianopropil	CN (ciano)	No polar/polar
Propanodiol	2OH (diol)	Polar/no polar
Silica	Si	Polar
Alúmina	Al	Polar
Florisil	Fl	Polar
Dietilaminoetil	DEA	Intercambio débil de anión/polar
Aminopropil	NH ₂	Intercambio débil de anión/polar
Carboxietil	CBA	Intercambio débil de catión
Ácido propilsulfónico	PRS	Intercambio fuerte de catión
Propil trimetilamonio	SAX	Intercambio fuerte de anión

La extracción de los esteroides (hormonas sexuales y compuestos sintéticos relacionados) de aguas residuales, son generalmente realizadas mediante una EFS. Debido a que son compuestos neutros ligeramente polares, se sabe que es posible utilizar diferentes tipos de cartuchos y discos de naturaleza no polar.

A continuación, se muestran los resultados obtenidos por diferentes autores (tabla 4) al realizar la EFS de esteroides con fases y disolventes de distinta naturaleza.

Tabla 4. Cartuchos/discos, disolventes de acondicionamiento y disolventes de elución utilizados para la EFS de los esteroides.

Cartucho	Acondicionamiento	Elución
1. Disco C ₁₈	Metanol y agua	Metanol- agua (85:15 % v/v)
2. LichrolutW-EN	Hexano, acetona, metanol	Acetona
3. Cartucho C ₁₈	Metanol y agua	Metanol-agua
4. Cartuchos C ₁₈ , Oasis HLB, Strata CN, Strata Si	Acetato de etilo, metanol y agua	Acetato de etilo, acetona, metanol,
5. Oasis HLB	Hexano, acetato de etilo, metanol y agua	Hexano, acetato de etilo y metanol

1. Disco C₁₈.

El autor Kelly utilizó discos y cartuchos con la misma fase estacionaria, C₁₈. Se encontró que los discos permitieron quitar interferencias de la muestra que con cartuchos no se habían eliminado. Por lo que se concluyó que el uso de estos discos más los disolventes utilizados permitieron una extracción eficiente y reproducible, con recobros del 90% ³⁰.

2. LichrolutW – EN.

Para los cartuchos LichrolutW-EN, Ternes y colaboradores, obtuvieron recobros entre 70% y 75%, los autores lo atribuyen a dos factores, que no hubo una adsorción completa en el cartucho utilizado y que hubo pérdidas debido al paso de limpieza que realizaron con silica gel ³¹.

3. Cartucho C₁₈.

En el artículo de Lu y colaboradores, evaluaron el volumen de disolvente de elución, probaron de 2 mL a 10 mL obteniendo que 5 mL es el volumen ideal para obtener un pico cromatográfico de estradiol con una respuesta alta. También

cambiaron las proporciones de metanol – agua obteniendo como resultado que la proporción (1:4) es la ideal para eluir los diferentes esteroides analizados ²⁵.

4. Cartuchos C₁₈, Oasis HLB, Strata CN, Strata Si.

Lo primero que optimizaron los autores (Liu y colaboradores) fue el tipo de cartucho, sabiendo que el C₁₈ es el más utilizado para la extracción de los esteroides, la elución fue realizada con metanol obteniendo bajos porcentajes en la extracción. Los cartuchos de -CN obtuvieron mejores resultados con recobros entre 60% y 80%, sin embargo, el cartucho Oasis HLB obtuvo recobros entre el 57% y 118%. El disolvente de elución elegido fue el acetato de etilo, aunque con metanol también obtuvieron buenos resultados ³².

5. Oasis HLB.

Utilizando esta metodología, Andrási y colaboradores, obtuvieron resultados con recobros altos, la cantidad de contaminantes son eliminados o disminuyen significativamente ³³.

3.5.3 Etapas de la EFS.

La EFS consiste en cargar una muestra líquida en una fase sólida (previamente acondicionada) que es generalmente un cartucho que contiene el adsorbente capaz de retener los analitos que se desean analizar, eliminar los compuestos interferentes, limpiar los analitos deseados y finalmente eluirlos con disolventes adecuados ³⁴.

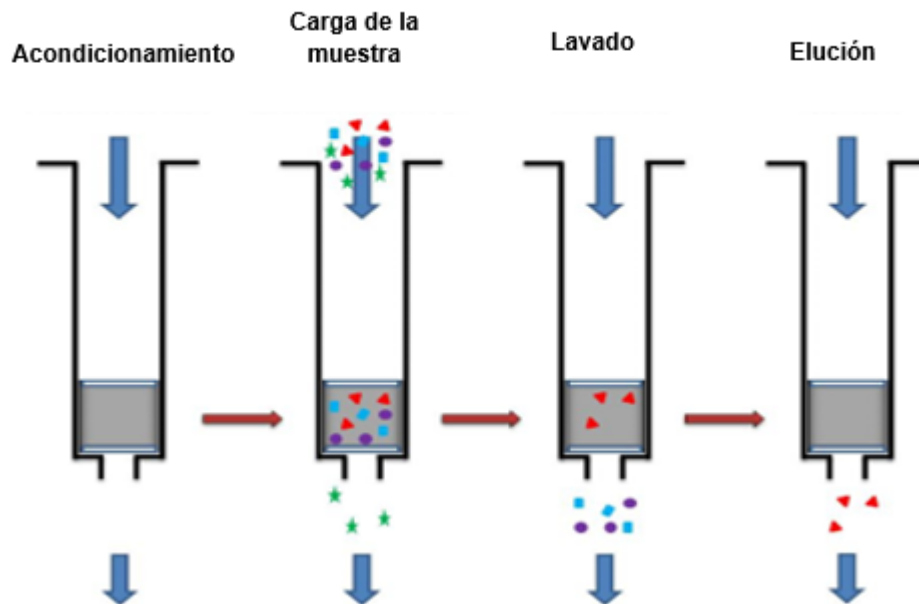


Figura 9. Etapas de la EFS ³⁵. En donde los puntos rojos son los analitos y el resto son interferencias.

- Acondicionamiento.

Durante la primera etapa, el acondicionamiento consiste en pasar disolventes orgánicos a través de la columna para activarla aumentando la superficie efectiva del área.

La activación del adsorbente permite las interacciones entre éste y la muestra ³⁵.

Los disolventes utilizados deben pasar a través del sólido en la columna en donde los analitos serán retenidos ²⁵.



Figura 10. Acondicionamiento de cartucho en EFS ³⁵.

- Carga de la muestra.

Al cargar la muestra algunas de las impurezas pasan sin ser retenidas y el resto quedan adsorbidas en el adsorbente. Los analitos de interés también deben quedar en el adsorbente.

Para obtener una máxima eficiencia de extracción es importante controlar el caudal de la muestra ³⁴.



Figura 11. Carga de la muestra en EFS ³⁵.

- Lavado.

Este paso permite que los disolventes eliminen compuestos que puedan interferir, mientras que no afecta a los analitos que están en el adsorbente.

El lavado minimiza las interferencias que puedan quedar al cargar la muestra o evitar que éstas pasen al momento de la elución, se pueden hacer uno o más lavados dependiendo del tipo de muestra ²¹.

Los disolventes de lavado deben ser 100% afines con las impurezas y 0% con el analito, para mejorar la eficiencia del lavado se puede utilizar mezcla de disolventes ³⁴.



Figura 12. Lavado en EFS ³⁵.

- Elución.

Finalmente se busca un disolvente apropiado que permita eliminar la interacción entre el analito y la fase polimérica para poder eluirlo.

El disolvente debe de tener una interacción máxima con el analito y mínima con las impurezas para que no eluyan y permanezcan en el adsorbente. Se debe de utilizar un volumen pequeño de disolvente para maximizar el factor de concentración ³⁴.

Cuando un líquido es más afín con los analitos de interés que la fase sólida del cartucho, el analito se desorbe y puede colectarse para obtener los compuestos deseados ²¹.

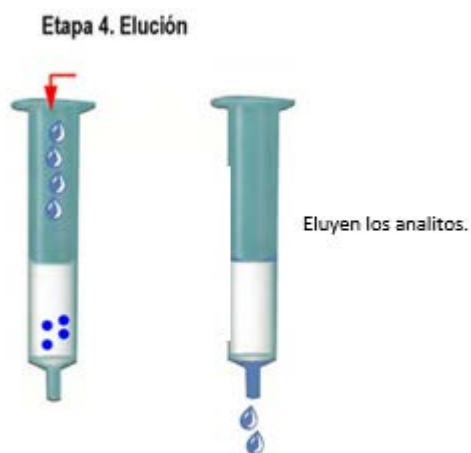


Figura 13. Elución en EFS ³⁵.

Para concentrar los analitos se evapora el disolvente, posteriormente se le da el tratamiento necesario para ser analizado por la técnica apropiada.

Para confirmar la presencia de los analitos después de la extracción es posible utilizar otras técnicas más sencillas como la cromatografía en capa fina.

3.6 Cromatografía de Gases.

La cromatografía se basa en una distribución de los componentes de la muestra entre dos fases inmiscibles: la fase estacionaria y la fase móvil. La muestra es transportada por la fase móvil interactuando con una fase estacionaria inmiscible mientras que los analitos se distribuyen en las dos fases. Las moléculas con gran afinidad a la fase estacionaria se mueven lentamente a través del sistema y, por el contrario, las moléculas con poca afinidad migran muy rápidamente a través del sistema. Esta diferencia de migración de las moléculas permite a los componentes separarse en bandas que pueden ser analizadas ³⁶.

En el caso de la cromatografía de gases la fase estacionaria se encuentra dentro de una columna, que puede ser de vidrio o silica fundida. La fase móvil o gas acarreador usada en CG es un gas inerte como helio o hidrógeno, que fluye a través de la columna de separación hacia un detector.

La separación de los analitos ocurre por su distribución entre la fase estacionaria y la fase móvil llegando a un equilibrio representado como una constante de distribución (K), donde C es la concentración del soluto en ambas fases.

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

Ecuación 3. Constante de distribución.

La constante de distribución depende de la intensidad de las fuerzas intermoleculares entre el soluto y la fase estacionaria. Una muestra con un valor de K alto es retenida con mayor fuerza por lo que el compuesto tardará más tiempo en pasar de la columna al detector. Este tiempo es llamado tiempo de retención (t_r) y depende de las propiedades del soluto y la fase estacionaria. La K depende de la temperatura por lo que el tiempo de retención también depende de la temperatura.

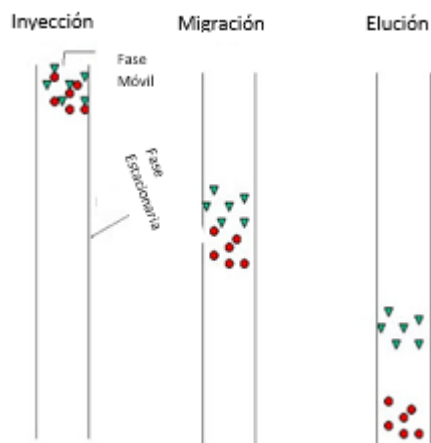


Figura 14. Principio de la cromatografía de gases ³⁶.

La elución en cromatografía de gases se puede realizar a temperatura constante (análisis isotérmico) o aumentando gradualmente la temperatura durante el análisis (análisis con temperatura programada) ³⁷.

3.6.1 Instrumentación en CG.

Los componentes de un cromatógrafo de gases son: fase móvil, inyector, fase estacionaria (columna capilar, situada en un horno), detector y sistema de registro

38.

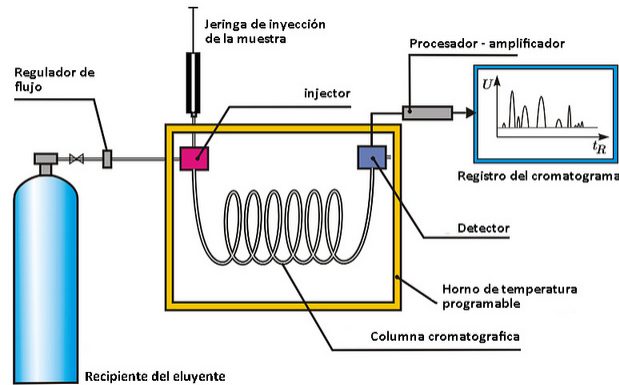


Figura 15. Componentes de un cromatógrafo de gases ³⁹.

a) Fase móvil.

La fase móvil se encuentra contenida en un cilindro de gas comprimido, el gas puede ser H₂, He, N₂. Debido a que son gases de bajo peso molecular tienen una baja resistencia a la transferencia de masas, es decir, facilita a los analitos viajar a través de él.

Estos gases deben cumplir con las siguientes propiedades:

- Baja resistencia a la transferencia de masas.
- Alta pureza.
- Inerte.
- No ser peligroso.
- Económicamente accesible.

La velocidad del gas a través de la columna, es controlado a través de válvulas que mantienen un caudal constante (columnas empaquetadas) o que mantienen una presión constante al inicio de la columna (columnas capilares).

b) Introducción de muestra.

La función principal del sistema de introducción de muestra es volatilizar los analitos e incorporarlos con el gas acarreador que fluye hacia la columna. Para lograr la vaporización es necesario tener en cuenta tres puntos:

1. El compuesto debe ser volatilizado lo más rápido posible.
2. Todos los componentes de la muestra deben de ser volátiles.
3. La muestra debe llegar a la columna como una banda.

En la figura 16 se presenta un inyector utilizado con columnas capilares, consta de un bloque de metal, un termostato capaz de mantener una temperatura constante y un aislamiento térmico. Dentro de este sistema se encuentra el gas acarreador pasando de forma continua por el sistema. La muestra se inyecta por medio de una microjeringa de precisión, pasa a través de una goma de silicona perforable (“septum”) y finalmente la muestra es vaporizada de forma instantánea mezclándose con el gas en una cámara de mezclado (inserto) construida de vidrio inerte.

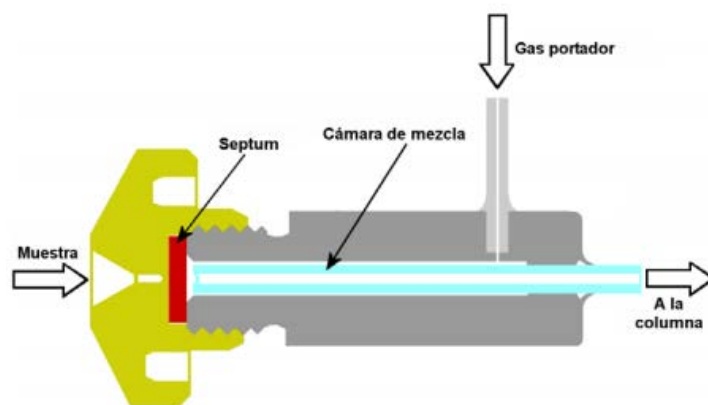


Figura 16. Esquema de un inyector para columnas capilares ³⁹.

Existen diferentes tipos de inyección como son el “*split mode*”, “*splitless mode*” y “*on-column*”.

El modo de inyección “*Split*” se utiliza para el análisis de disoluciones de concentraciones elevadas. La muestra se volatiliza, se mezcla y llega a un divisor de flujo; una parte es introducida a la columna y la otra queda fuera del sistema a través de una válvula de purga, a este proceso se le llama Relación de Split.

Este modo de inyección con división de la muestra presenta dos inconvenientes, el primero es que provoca que la cantidad de los analitos que llegan al detector sea muy pequeña, como consecuencia el límite de detección se ve alterado. El otro inconveniente es que en algunos casos no permite el análisis de todos los componentes en la muestra ³⁹.

El inyector "Splitless" se utiliza para disoluciones diluidas ya que la totalidad de la muestra, volatilizada, es dirigida hacia la columna, en este caso el disolvente actúa como una especie de trampa donde se concentran los compuestos a analizar. Después de un tiempo adecuado, una válvula de purga se abre con el fin de eliminar el disolvente que pudiera quedar en el inyector, la muestra pasa a la columna y al mismo tiempo, comienza el programa de temperatura adecuado para el análisis.

El modo "Splitless" tiene dos ventajas importantes. La primera es que al pasar toda la muestra la sensibilidad aumenta, esto ayuda cuando se desean analizar en concentraciones a nivel de trazas. La segunda es que las pérdidas de eficiencia por una mala inyección no son muy notorias ya que la muestra se reconcentra en la cabeza de la columna ³⁹.

c) Horno y columna.

El horno contiene el equipo donde se lleva a cabo la separación cromatográfica: la columna. Las columnas más usadas en CG son las columnas capilares debido a su alta eficiencia de separación y operan a temperaturas desde -60°C hasta 350°C dependiendo del recubrimiento de la fase estacionaria. Constan de una fase estacionaria, silica fundida y una cubierta de polímero (figura 17).

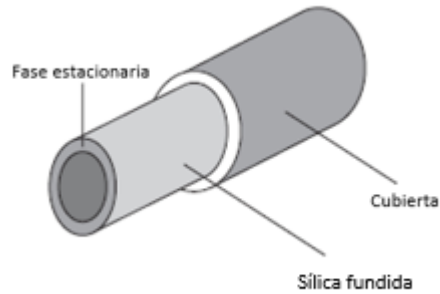


Figura 17. Componentes de una columna capilar ³⁹.

Existen cuatro valores a medir para tener un análisis exitoso, la eficiencia, la selectividad, la velocidad y la sensibilidad.

La eficiencia es la capacidad de la columna para separar los compuestos de una manera nítida obteniendo bandas finas. La selectividad permite la discriminación entre los analitos. La velocidad se refiere al número de picos por unidad de tiempo producidos en un cromatograma, y la sensibilidad es la capacidad para detectar concentraciones muy bajas del analito ³⁹.

d) Detector.

Este paso consiste, como lo dice su nombre, en detectar una pequeña cantidad de analito presente en el gas acarreador. Existen diferentes tipos de detectores que deben tener una alta sensibilidad, un amplio intervalo lineal de respuesta y una pequeña celda para no distorsionar la forma de elución del pico. Algunos de ellos son: el detector de conductividad térmica, detector de ionización de flama, detector de captura de electrones, espectrómetro de masas, etc. Uno de los detectores utilizados en cromatografía de gases es el espectrómetro de masas ⁴⁰. Estos dos sistemas están conectados por medio de la línea de transferencia, que se encuentra a temperatura alta para evitar que los analitos que eluyen con fase móvil de la columna condensen entre los dispositivos.

e) Sistema de registro.

El sistema de registro tiene como finalidad convertir la propiedad electrónica en algo entendible. Se obtiene un gráfico de señal versus tiempo (minutos) llamado cromatograma.

3.7 Espectrometría de Masas.

La Espectrometría de Masas (EM), está basada en la obtención de iones de moléculas en fase gaseosa, estos iones se separan de acuerdo con su relación masa/carga (m/z). Esto da como resultado un espectro de masas que puede ser interpretado para identificar compuestos. El espectro de masas es una información bidimensional que representa un parámetro relacionado con la abundancia de los iones en función de la relación m/z de cada uno de ellos ⁴⁰.

La EM es una técnica cualitativa y cuantitativa que no solamente detecta los analitos de las muestras, también da información estructural sobre la molécula lo que permite su identificación. Es por esto, por lo que es considerada como una técnica muy útil, sin embargo, puede llegar a tener inconvenientes cuando se analizan mezclas complejas de analitos ya que se genera un gran número de fragmentos con diferentes valores de m/z que complica la interpretación del espectro de masas, por lo que debe utilizarse para compuestos puros para identificar con precisión de qué compuesto se trata ⁴⁰. Para mezclas complejas, se han desarrollado tecnología en donde el espectrómetro de masas se acople con algún otro instrumento que permita una separación eficaz, por ejemplo, a sistemas cromatográficos ⁴¹.

Los procesos que se llevan a cabo dentro de un espectrómetro de masas son de naturaleza química, física y fisicoquímica por lo que la presencia y la abundancia de los iones en el espectro será función de la estructura química de cada compuesto ⁴⁰.

3.7.1 Instrumentación.

El espectrómetro de masas debe cumplir cuatro funciones básicas:

1. Debe de volatilizar sustancias a analizar.
2. Debe originar iones a partir de moléculas neutras en fase gaseosa.
3. El espectrómetro debe separar los iones originados en función de su relación m/z .
4. Finalmente, los iones separados deberán ser detectados y registrados adecuadamente.

Para poder cumplir lo antes mencionado, el equipo consta con cuatro elementos (figura 18) que realizan cada una su función: sistema de introducción de muestras, fuente de ionización, un analizador, detector y sistema de registro ⁴⁰.

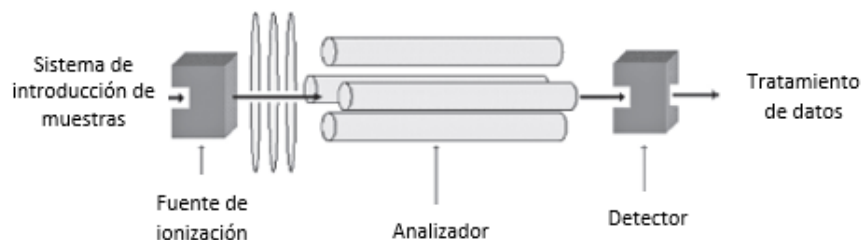


Figura 18. Elementos que componen un espectrómetro de masas cuadrupolo ⁴⁰.

a) Sistema de introducción de muestra.

Existen tres diferentes métodos para la introducción de muestras: introducción directa, introducción indirecta e introducción a través de un cromatógrafo. El último sistema es el más popular ya que la introducción de la muestra se da de manera directa en fase gaseosa o líquida; a su vez el cromatógrafo es el encargado de la separación de los componentes de la mezcla ⁴⁰.

b) Fuente de ionización:

En la fuente se producen los iones gaseosos. La naturaleza de la fuente a utilizar depende del estado físico de la sustancia que se desea analizar.

En la ionización por impacto electrónico las moléculas son ionizadas mediante un haz de electrones de alta energía; estos electrones se emiten por efecto termoeléctrico que procede de un filamento incandescente y se aceleran por medio de una diferencia de potencial variable entre el filamento y la fuente.

Para enfocar los electrones dentro de una trayectoria determinada, se utiliza un campo magnético paralelo a la dirección en que se mueven los electrones, de forma que estos describen una trayectoria helicoidal hasta llegar a un ánodo. El haz de moléculas atraviesa el haz de electrones de alta energía, al darse esta colisión entre ellos se forman los iones. Una vez ionizada y/o fragmentada la molécula pasan a una placa con carga positiva para repeler los iones y expulsarlos del haz de electrones.

c) Analizador:

Una vez que las moléculas son ionizadas se tiene una mezcla de iones que deben ser separados, esta es la función del analizador, para posteriormente ser detectados de manera individual.

En este trabajo se utilizó un analizador cuadrupolo, éste está formado por cuatro cilindros metálicos circulares, rectos y paralelos dispuestos con una gran precisión sobre una circunferencia, de tal forma que el haz de iones procedente de la fuente incida sobre el centro de éste (figura 19).

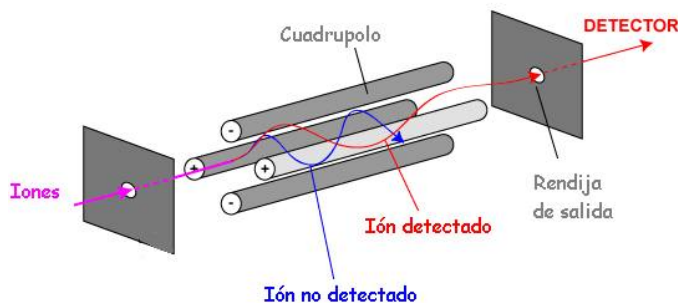


Figura 19. Esquema de un cuadrupolo ⁴⁰.

Sobre estas barras metálicas se aplica un potencial constante y un potencial alterno de radiofrecuencia. Ninguno de los dos campos tiene efecto sobre la trayectoria de los iones. Debido a que este tipo de analizadores trabajan únicamente con campos eléctricos los barridos son muy rápidos. Este es un método sensible ya que no tiene rejillas para el enfoque del haz de electrones.

d) Detector:

El detector es el encargado de detectar y enumerar los iones; también de amplificar la corriente con que los iones salen del analizador. Debido a que las corrientes de iones que salen del analizador son de baja intensidad se originan problemas al momento de detectar por lo que la detección debe de ser muy rápida y precisa ⁴⁰.

e) Sistema de registro.

El sistema de registro cumple con convertir la propiedad electrónica en algo entendible. Se obtiene un gráfico de señal vs m/z llamado espectro de masas.

3.8 Cromatografía de Gases – Espectrometría de Masas.

La Cromatografía de gases fue desarrollada en 1952 por James y Martin. La Espectrometría de Masas fue inventada por un físico británico llamado Joseph John Thompson; la primera vez que estas dos técnicas se usaron en conjunto fue en 1956, por Roland Gohlke y Fred McLafferty ³⁸.

La configuración básica de un CG – EM (figura 20) consta de un inyector en el cromatógrafo de gases por donde se inyecta la muestra, pasa a través de la columna en donde se separa la mezcla, pasa por la línea de transferencia y se analiza en el espectrómetro de masas. Todo el instrumento es controlado por una computadora ³⁸.

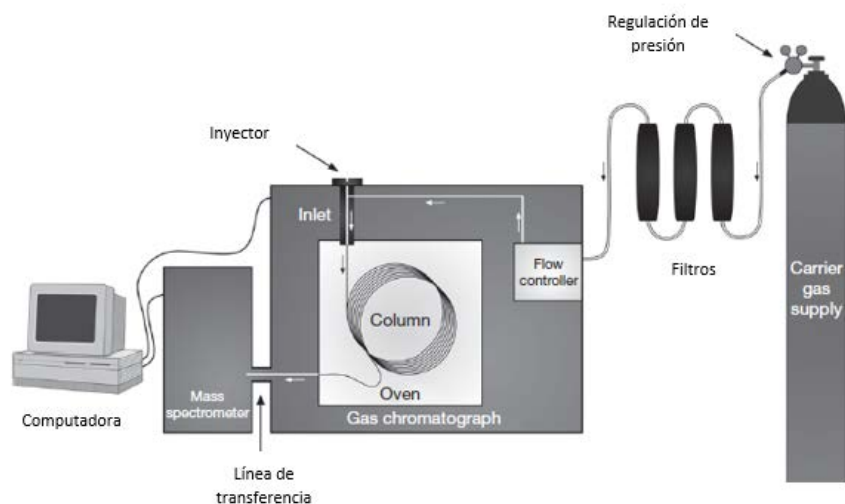


Figura 20. Elementos de un cromatógrafo de gases- espectrómetro de masas ³⁸.

La CG puede separar compuestos volátiles con una gran resolución y la EM da, de manera detallada, información estructural de muchos compuestos por lo que pueden ser identificados de manera precisa, pero no puede separarlos fácilmente. Es por eso que se usan acopladas estas dos técnicas y en conjunto, son la técnica más utilizada en la identificación y cuantificación de compuestos orgánicos en mezclas complejas ⁴².

3.8.1 Usos y aplicaciones.

La CG – EM se utiliza en:

- Identificación y cuantificación de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles en mezclas complejas.
- Determinación de pesos moleculares y (algunas veces) composición elemental de compuestos orgánicos desconocidos.
- Determinación de la estructura de compuestos orgánicos comparando el espectro resultante con espectros de referencia.
- Determinación de contaminantes en aguas residuales.
- Cuantificación de drogas en fluidos biológicos para aplicaciones forenses o farmacéuticas, etc ⁴².

3.8.2 Cuantificación por CG – EM.

Un análisis cualitativo nos dice qué está presente en una muestra, un análisis cuantitativo nos dice cuánto está presente en una muestra ⁴³.

La CG permite separar mezclas muy complejas, aun cuando sean de naturaleza muy similar, esto permite un análisis directo de muestras para cuantificar. Los detectores ofrecen una respuesta, con una alta sensibilidad, muy fácil de relacionar con la cantidad de analito contenida en la muestra inyectada.

Una vez que se conoce el área o la altura del pico del analito obtenido en el cromatograma es posible conocer su masa o su concentración con ayuda de una curva de calibración que relacione la respuesta con la cantidad de analito inyectada. Los métodos más utilizados para las curvas de calibración son el método de estándar externo y método de estándar interno ⁴¹.

a) Estándar externo.

Este método consiste en analizar las disoluciones estándares de diferentes concentraciones y crecientes del analito (S) a cuantificar. En una gráfica se representa la respuesta (área o altura) R_s versus concentración de estándar (C_s), esto da como resultado una recta, en la que se determina la concentración del analito en la muestra problema, por interpolación gráfica o matemática del valor de su R_s . (figura 21).



Figura 21. Cuantificación por estándar externo⁴¹.

El principal problema de este método es la reproducibilidad de las inyecciones, o bien, el control de las cantidades inyectadas, aunque con estricto cuidado la exactitud alcanzada puede ser alta ⁴¹.

b) Estándar interno.

Este método consiste en agregar una cantidad conocida de compuesto patrón a la muestra por analizar. En el cromatograma aparecerán los picos correspondientes al analito y al patrón; y de la relación entre el tamaño de ambos podrá calcularse la cantidad de analito presente en la muestra, previamente se debe de tener una curva de calibración. Para realizar la curva de calibración (figura 22) se preparan disoluciones con concentraciones crecientes de un estándar del compuesto (s) a analizar añadiendo una cantidad creciente del compuesto patrón en todas las disoluciones. Esto se representa en una gráfica como la concentración en función de la relación de los picos muestra/estándar del analito, se obtiene una recta con la que es posible interpolar la relación entre los dos picos y obtener la concentración del analito ⁴¹.

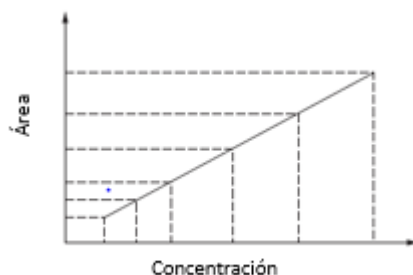


Figura 22. Construcción de una curva de calibración ⁴¹.

3.8.3 Validación de métodos.

- Límite de detección.

El límite de detección (LD) es definido como la concentración o la cantidad más baja que se puede detectar con certeza razonable para un procedimiento analítico. Esta medida, en conjunto con el límite de cuantificación, son dos de los elementos fundamentales en la validación de un método químico ⁴⁴.

Para calcular el LD se utilizan las ecuaciones 4, 5.

$$LD_{\text{área}} = 2 * t_{(\alpha=0.95)} * \frac{\sigma_{\text{área}}}{\sqrt{n}}$$

Ecuación 4. Límite detección en función del área.

Donde el factor de cobertura *t de student* se da al 95% de confianza. Y n es el número de mediciones.

$$LD_{\text{conc}} = \frac{LD_{\text{área}}}{F_r}$$

Ecuación 5. Límite de detección en función de la concentración.

Donde el factor de respuesta F_r , se obtiene dividiendo el área de las mediciones entre la concentración del estándar.

$$F_r = \frac{\text{área}}{\text{concentración}}$$

Ecuación 6. Factor de respuesta.

- Límite de cuantificación.

El límite de cuantificación (LC) es la cantidad o concentración mínima que puede ser cuantificada de manera confiable durante un método analítico ⁴⁴.

Para calcular el LC, se tienen las siguientes ecuaciones.

$$LC_{\text{área}} = 5 * LD_{\text{área}}$$

Ecuación 7. Límite de cuantificación en función del área.

$$LC_{\text{conc}} = 5 * LD_{\text{conc}}$$

Ecuación 8. Límite de cuantificación en función de la concentración.

- Recobro.

El recobro es definido como la relación de la cantidad extraída entre la cantidad añadida. El volumen añadido representa el 100% de recobro y la cantidad extraída debe de ser un volumen (V_m) menor al 100% ²⁶. Es posible expresar el recobro en gramos ya que se evapora el disolvente quedando un sólido, también se puede expresar como rendimiento.

El recobro es calculado con las ecuaciones siguientes.

$$\%R = 100 \left(\frac{C_f}{C_i} \right)$$

Ecuación 9. Recobro en porcentaje.

En donde C_i es igual a la concentración inicial del estándar.

La concentración final C_f , se calcula con la siguiente ecuación.

$$C_f = C_2 * \frac{V_f}{V_i}$$

Ecuación 10. Concentración final.

Donde C_2 es la concentración obtenida por interpolación en la curva de calibración; V_f y V_i son los volúmenes final e inicial respectivamente.

4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

4.1 Equipos y Materiales.

- Cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 Series II Plus con inyector “split-splitless” y detector selectivo de masas Agilent 5973 N (Folsom, California, USA).
- Columna capilar de sílice fundida SUPELCO SLB™-5 MS 20 x 0.18 mm x 0.18 µm de espesor de película (5% fenil – 95% metil polisiloxano). Serie 50102-04 (USA).
- Jeringa de 10 µL HAMILTON. Lote 457209 (USA).
- Balanza analítica OHAUS ± 0.00001 g (México).
- Cámara hidrotérmica de teflón PTFE de 250 mL.
- Cinta PTFE Southland de 13 mm x 6.60 m (México).
- Matraces aforados de 1, 2, 5 y 10 mL PYREX (México).
- Viales de reacción de 0.3 mL SUPELCO. Lote P385219 (USA).
- Micropipeta Multipette Plus Eppendorf. Lote 430164A (Alemania).
- Puntas para micropipeta Eppendorf de 0.1, 1 y 10 mL. Lotes B147243J, B14644G, A145513R (USA).
- Válvulas mininert SUPELCO de 13 mm. Lote 33300 (USA).
- Viales ámbar SUPELCO de 2, 4, 7 y 15 mL. Lotes 166189C, 1/17/00, 175308I (USA).
- Horno de microondas de uso doméstico General Electric modelo JES07WK con potencia de 700 W (México).
- Colector de vacío de SPE Visiprep™ SUPELCO para 12 muestras.
- Bomba de vacío COLE-PARMER modelo L-79200-30. 115V. 60Hz. 1.7 A (México).
- Cartucho Octadecil C₁₈ BAKERBOND spe™ 7020-02, columna de 3 mL. (USA)

- Centrifuga PowerSpin TM BX modelo C887-CP. AC-115V. 60Hz. 5A. 13000 rpm (USA)
- Tubos de muestra para centrifuga HACH, 10 mL.
- Potenciómetro Cole Parmer (Singapur).

4.2 Reactivos.

- Estándar 17 β -estradiol grado técnico
- Estándar etinilestradiol grado técnico.
- Estándar estriol grado técnico
- Estándar etinilestradiol 3-metil éter 99%, SIGMA – ALDRICH. Lote 03010DH. (USA).
- N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) grado derivatizante para GC, SUPLECO. Lote LB83168 (USA).
- Trimetilclorosilano (TMCS), Alltech. Lote 12004. (USA).
- N,N-Dimetilformamida anhidra (DMF), pureza 99.8%, SIGMA – ALDRICH. Lote SHBG9734V (USA).
- Metanol 99.93%, grado HPLC, SIGMA – ALDRICH. Lote BO10978BO (USA).
- Agua desionizada J. T. Baker. Lote T33275 (USA).
- Nitrógeno grado cromatográfico INFRA (México).
- Helio comprimido ONU 1046, grado 5.0 ultra alta pureza, PRAXAIR. Lote 2000117755 (México).

4.3 Muestras de agua residual.

Se analizaron cuatro muestras de agua residual del Valle del Mezquital, Hidalgo de distintos canales provenientes de la presa Endhó (tabla 5).

Tabla 5. Muestras analizadas.

Canal	Clave de la muestra	Cantidad	Fecha de colecta	Coordenadas UTM
Tlamaco-Juandhó	Y-WSI-4.3	50 mL	14/07/17	478627, 2224426
Dendhó	Z-WSI-2.2	45 mL	14/06/17	467273, 2217444
Sifón Bojay	Z-WSI-5.1	45 mL	26/06/17	464879, 2220964
Canal Cerro de la Cruz	Y-WSI-6.1	45 mL	26/07/17	475239, 2226978

4.4 Preparación de las disoluciones estándar.

Para la preparación de disoluciones estándar de los esteroides para seleccionar las condiciones cromatográficas. Se pesaron en la balanza analítica 0.1 g de cada analito y se aforó a 10 mL con dimetilformamida como disolvente, teniendo una disolución "stock" de la mezcla de los cuatro esteroides de 10000 ppm. A partir de esta disolución se prepararon diluciones de 100, 10 y 1 ppm respectivamente en DMF.

4.5 Optimización de la Extracción en Fase Sólida (EFS).

Se prepararon 100 mL de una disolución de 10 ppm de esteroides en agua con un valor de pH de 4.87

Se probaron diferentes proporciones de metanol – agua para la etapa de elución. Se realizaron cuatro pruebas, en cada una de ellas se tomaron 10 mL de la disolución estándar de 10 ppm, pasándola a un flujo aproximado de 4 a 5 mL por minuto. El flujo durante el acondicionamiento fue más lento para asegurar que el metanol y el agua activaran los poros del adsorbente. Basados en la literatura, se seleccionó el cartucho C₁₈ (octadecil silano) para realizar las extracciones ³².

Al realizar las pruebas con estándares no se optimizó la etapa de lavado, después de la carga de la muestra se hizo la elución.

A continuación, se muestran las condiciones experimentales utilizadas en cada extracción (tabla 6).

Tabla 6. Volúmenes y proporciones para las pruebas de extracción con estándares en agua.

Prueba de extracción	Acondicionamiento	Elución
1	10 mL metanol 10 mL agua	1. 5 mL metanol – agua (80-20% v/v) 2. 5 mL metanol
2	10 mL metanol 10 mL agua	1. 5 mL metanol – agua (90-10% v/v) 2. 5 mL metanol
3	10 mL metanol 10 mL agua	1. 5 mL metanol – agua (95-5% v/v) 2. 5 mL metanol
4	10 mL metanol 10 mL agua	1. 5 mL metanol 2. 5 mL metanol

Los 5 mL de eluato obtenido en cada prueba, se llevaron a sequedad con flujo de nitrógeno. A cada residuo se le agregó 1 mL de DMF, se tomaron 100 µL, se formó el derivado sililado y se analizó por GC-MS.

4.6 Formación de los derivados sililados.

Para realizar las pruebas se tomaron 100 μL de la mezcla de 100 ppm y diferentes volúmenes de mezcla de reactivos sililantes BSTFA – TMCS (90 – 10% v/v), se añadieron en viales de 0.3 mL sellados con cinta teflón y válvulas mininert, el vial se colocó dentro de una cámara hidrotérmica de teflón completamente cerrada la cual fue colocada dentro del horno de microondas, se colocó un vaso de precipitados de 500 mL con hielo junto a la cámara hidrotérmica dentro del horno para dirigir las microondas y evitar posibles accidentes.

La optimización de las condiciones de reacción de los derivados sililados, consistió de tres etapas: la primera fue ajustar el tiempo de calentamiento en el horno de microondas: 2, 3 y 4 minutos; la segunda modificando el volumen de la mezcla de reactivos sililantes, BSTFA-TMCS (90-10 % v/v): 30, 50 y 80 μL ; y la tercera en ajustar la potencia del horno de microondas para el calentamiento en la reacción: 140, 280, 420, 560 y 700 Watts.

4.7 Análisis por CG – EM.

Se utilizó el sistema acoplado CG – EM con las disoluciones estándar de 1 ppm, en el modo de inyección “splitless” a 280°C y helio como fase móvil a flujo de 0.5 mL min^{-1} . La temperatura de la línea de transferencia fue de 300°C. En el espectrómetro de masas, se utilizó un analizador cuadrupolo sencillo con ionización electrónica a 70 eV a 150°C, la temperatura de la fuente de ionización se mantuvo a 230°C Se estableció un “Solvent Delay” de 3 minutos.

Se optimizó el programa de temperaturas, probando los siguientes dos programas:

1. Temperatura inicial de 130°C por 0 minutos, con un gradiente de 20°C/min hasta 250°C, aumentando con un gradiente de 5°C/min hasta una temperatura final de 290°C por 0 minutos. Con duración de 20.75 minutos.

2. Temperatura inicial de 250°C por 3 minutos, con un gradiente de 4°C/min hasta 280°C por cero minutos. Con duración de 10.50 minutos.

Los espectros de masas se obtuvieron por barrido total de iones "SCAN" en un intervalo de masas de 50 a 500 uma. Para el barrido por SIM (Selected Ion Monitoring, por sus siglas en inglés) se monitorearon iones específicos para cada analito (Tabla 7).

Tabla 7. Iones seleccionados en el análisis por SIM.

Estándar	Iones seleccionados (m/z)	Iones esperados (m/z)
Estradiol	231, 285, 416	73, 129, 285, 416
Mestranol	174, 227, 367	73, 147, 174, 208, 367
Étinilestradiol	196, 285, 425	73, 196, 205, 285, 425
Estriol	311, 386, 414	73, 128, 147, 345, 489

4.8 Curva de calibración por estándar externo.

A partir de la disolución "stock" de la mezcla de los esteroides, 10000 ppm, se prepararon disoluciones de diferente concentración: 10, 20, 40 y 60 ppb ($\mu\text{g/L}$) en DMF. Una vez teniendo las condiciones óptimas de la reacción para formar el derivado sililado y las condiciones cromatográficas se analizaron las disoluciones por triplicado, incluido el blanco de disolvente (dimetilformamida).

4.9 Preparación y análisis de las muestras.

Se tomaron 10 mL de cada muestra; Tlamaco-Juandhó, Dendhó, Sifón Bojay y Cerro de la Cruz. Se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos, los residuos sólidos son separados por decantación para posteriormente realizar la extracción por fase sólida (EFS).

La etapa de acondicionamiento se realizó con metanol y agua a un flujo de 3 mL por minuto; la carga de la muestra centrifugada fue de 10 mL y se realizó a un flujo de 4 a 5 mL por minuto, el lavado se hizo con 10 mL de agua – metanol (90-10% v/v) para eliminar interferencias. Todas las pruebas se analizaron con el mismo procedimiento.

Finalmente, se hicieron dos eluciones de 5 mL cada una, la primera con metanol – agua (90-10% v/v) y la segunda con metanol.

Los extractos fueron llevados a sequedad con flujo de nitrógeno, el residuo se reconstituyó en 1 mL de DMF. De esta disolución se tomaron 100 µL y se le agregaron 50 µL de la mezcla de los reactivos sililantes BSTFA – TMCS (90-10% v/v), se calentó por 3 minutos en el horno de microondas a una potencia de 700 Watts.

Una vez obtenido el derivado sililado de la muestra se analizó por GC-MS utilizando un programa de temperatura (figura 24) con temperatura inicial de 250°C por 3 minutos y con un incremento de 4°C/min hasta 280°C por cero minutos. Para confirmar la presencia de los esteroides en la muestra de Tlamaco – Juandhó se efectuó la adición de los estándares de concentración de 15 ppb en agua, con la finalidad de enriquecer la muestra y observar un aumento en las señales de los picos cromatográficos. Posteriormente, se realizó la extracción en fase sólida, la formación del derivado sililado y el análisis por CG – EM.

4.10 Parámetros estadísticos.

- Límite de detección y Límite de cuantificación.

El límite de detección (LOD) se determinó realizando tres inyecciones. A 100 µL de la disolución de estándares de 3 ppb, se le añadieron 50 µL de mezcla de reactivos sililantes (BSTFA – TMCS 90-10 % v/v) y se calentó por 3 minutos en el horno de microondas. Las repeticiones se realizaron a partir de la misma reacción.

- Linealidad y Desviación Estándar Relativa (DER %).

Se realizó mediante la curva de calibración, con cinco puntos de concentraciones de: 10, 20, 40 y 60 ppb inyectados de manera creciente por triplicado, obteniendo 5 puntos en total, incluido el blanco con disolvente.

Para cada concentración se tomaron 100 μ L de disolución estándar, se le agregaron 50 μ L de reactivo sililante BSTFA – TMCS (90 – 10% v/v) y se calentó por 3 minutos en horno de microondas.

Se calculó el valor del coeficiente de correlación R^2 mediante una hoja de cálculo en Excel ⁴⁵.

Utilizando los datos de la curva de calibración se calculó la Desviación Estándar Relativa, DER %, para conocer la dispersión de cada punto en la curva.

- Recobro:

De la disolución de 10 ppm en agua, se tomaron 10 mL para realizar la extracción en fase sólida. Se eluyó dos veces, una con 5 mL metanol – agua (90/10 % v/v) y la segunda con 5 mL metanol. El eluato se llevó a sequedad con flujo de nitrógeno y el sólido resultante se disolvió en 1 mL de DMF en ambas eluciones, por separado.

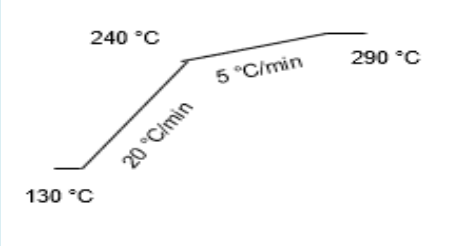
Se realizó el cálculo de recobro para los dos eluatos, la suma de los dos, fue el resultado total del recobro en la extracción.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Análisis por CG – EM.

El análisis cualitativo se realizó en un amplio intervalo de temperaturas (tabla 8) para determinar el tiempo de retención de los esteroides y la resolución obtenida, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 8. Orden de elución en modo SCAN para el primer programa de temperatura de la muestra de estándares.

Pico	Compuesto	tr (min)	Primer programa de temperaturas
1	Estradiol	9.79	
2	Mestranol	10.32	
3	Etinilestradiol	10.75	
4	Estriol	11.43	

En la figura 23, se puede observar una separación con resolución mayor a 1.5, utilizando un gradiente de 5 °C/min, sin embargo, el tiempo del análisis es mayor, por lo que se decidió modificar las temperaturas inicial y final del programa de temperaturas.

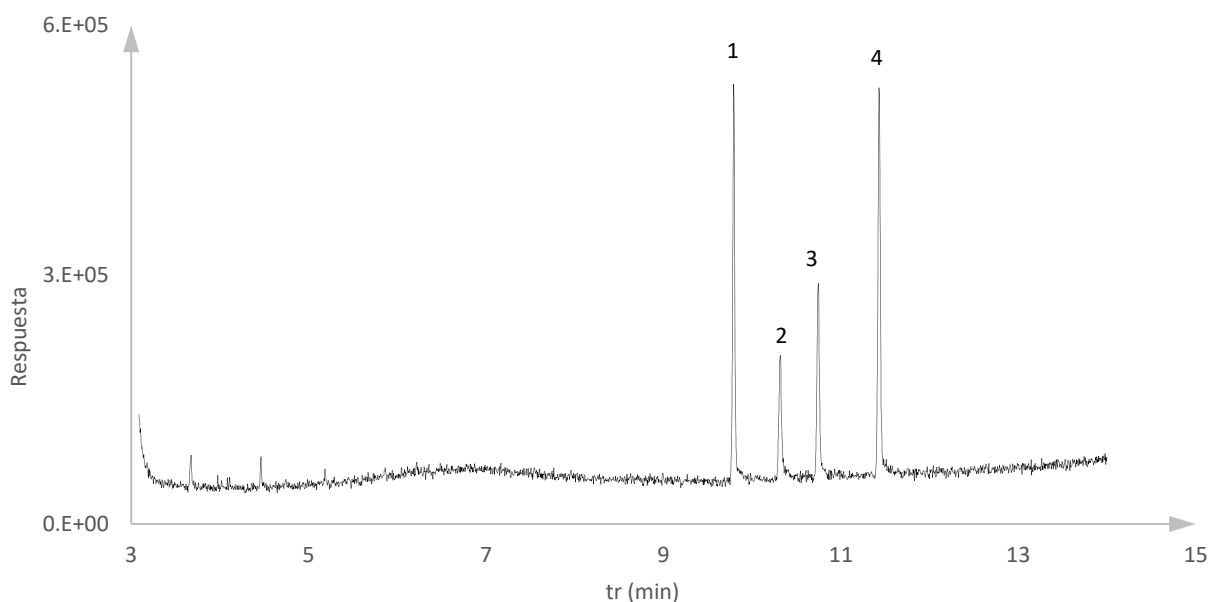


Figura 23. Cromatograma obtenido a partir del primer programa de temperaturas. (1) estradiol, (2) mestranol, (3) etinilestradiol, (4) estriol.

Con la finalidad de tener un menor tiempo en el análisis sin perder resolución en los picos cromatográficos, se realizó una segunda prueba, modificando el programa de temperaturas. Los resultados se presentan en la tabla 9.

Tabla 9. Orden de elución con el segundo programa de temperaturas.

Pico	Compuesto	tr (min)	Segundo programa de temperaturas
1	Estradiol	5.672	
2	Mestranol	6.324	
3	Etinilestradiol	6.867	
4	Estriol	7.751	

En la figura 24 se puede observar que con este programa de temperaturas el tiempo de análisis pudo disminuirse a la mitad y permitió determinar los compuestos con una resolución mayor a 1.5, es decir, su separación es mayor al 99.9 %, por lo que fue el programa de temperaturas seleccionado para los análisis posteriores.

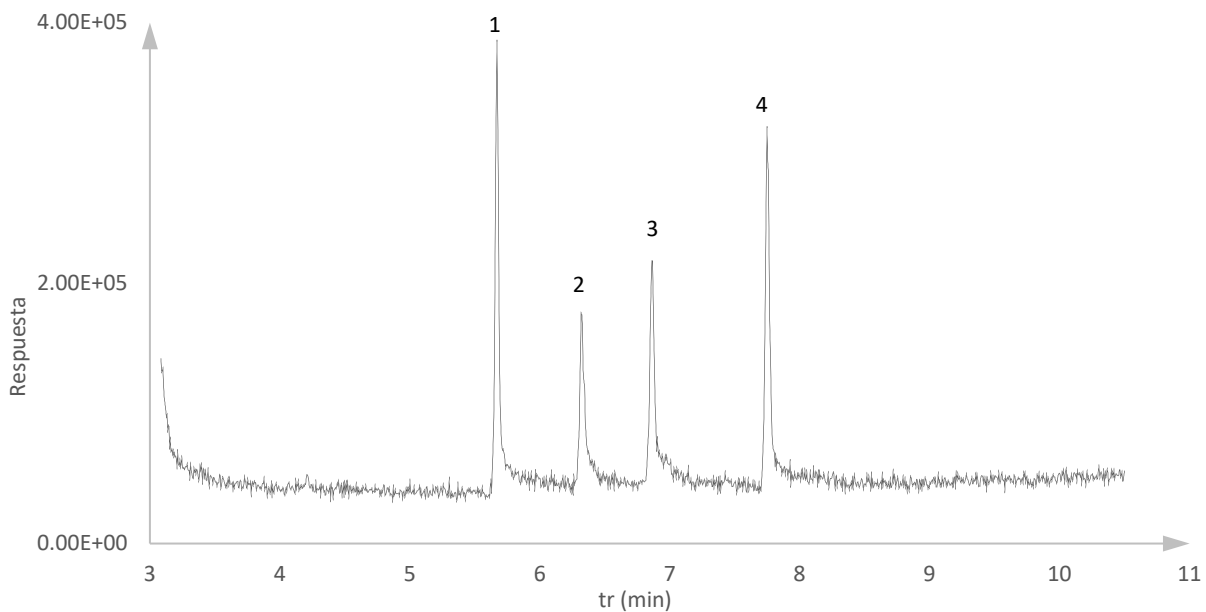


Figura 24. Cromatograma obtenido con el segundo programa de temperaturas. (1) estradiol, (2) mestranol, (3) etinilestradiol, (4) estriol.

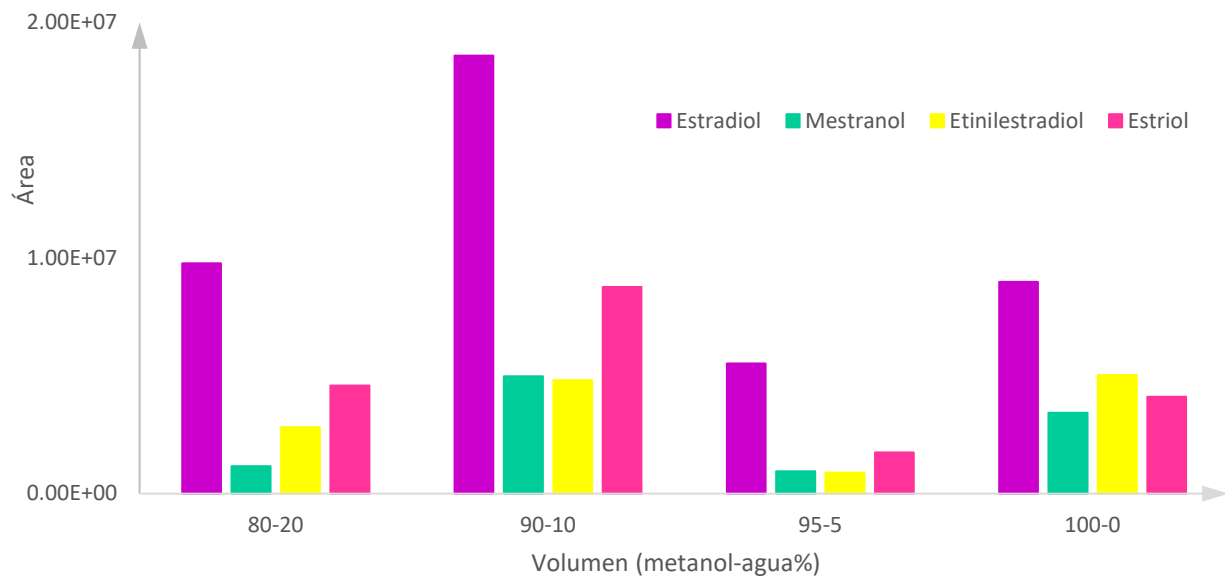
5.2 Optimización de la Extracción en Fase Sólida.

Se realizó la elución de analitos variando la proporción de disolventes 80 – 20% v/v, 90 – 10% v/v, 95 – 5% v/v y 100 % (metanol – agua) en la primera elución, en la segunda elución se utilizó 100% metanol en todas las pruebas. En la tabla 10 se presentan los resultados obtenidos.

Tabla 10. Áreas obtenidas modificando el % de MeOH y H₂O en cada elución de la EFS.

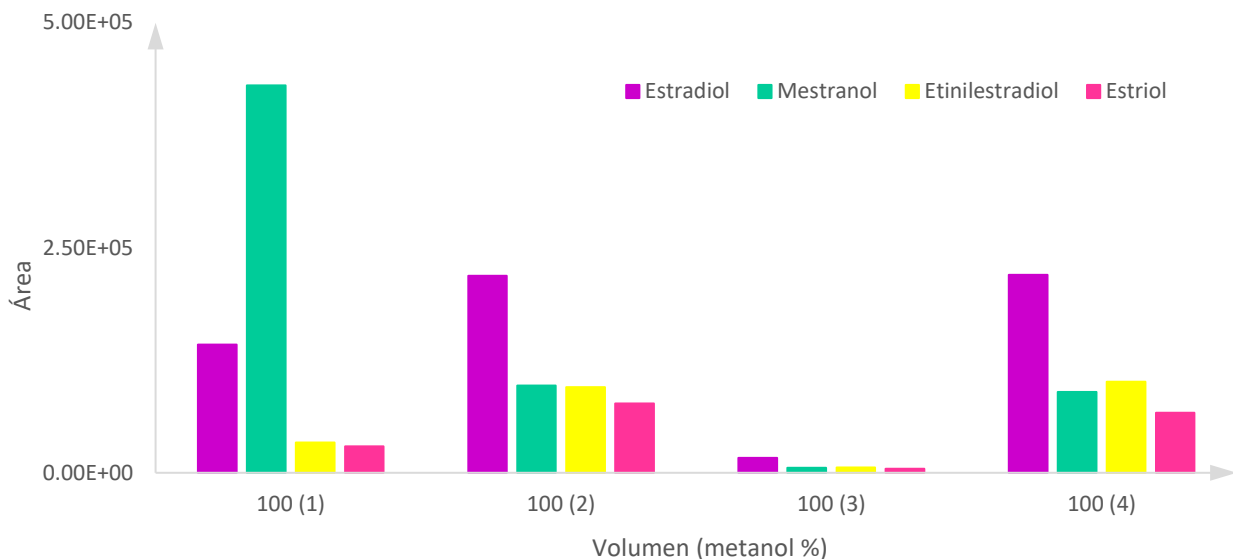
Compuesto	Estradiol	Mestranol	Etinilestradiol	Estriol
Área	9775193	1162246	2815870	4589425
(MeOH/H₂O) 80-20 % v/v				
MeOH 100 %	142572	430480	33705	29428
Área	18577703	4983090	4816831	8766817
(MeOH/H₂O) 90-10 % v/v				
MeOH 100 %	218751	96819	95039	77179
Área	5519813	941371	892714	1752667
(MeOH/H₂O) 95-5 % v/v				
MeOH 100 %	16573	5539	6038	4476
Área	8987691	3428034	5029904	4115805
MeOH 100 %				
MeOH 100 %	219894	89912	101067	66724

Para determinar cuál es la proporción donde los analitos de interés presentan mejores resultados de la EFS, se presenta la gráfica 5, en la que se determina que la proporción metanol – agua (90 – 10 % v/v) fue la elución que presentó valores mayores de las áreas.



Gráfica 1. Comparación de las áreas variando el porcentaje v/v en la primera elución de la EFS.

Al realizar la segunda elución con metanol, (gráfica 2), las áreas obtenidas fueron más pequeñas. Esto nos indica que en la primera elución se logró eluir la mayor proporción de los analitos.



Gráfica 2. Comparación de áreas de la segunda elución de la EFS. (1) primera extracción, (2) segunda extracción, (3) tercera extracción, (4) cuarta extracción.

Con estos resultados se seleccionó la proporción 90:10 v/v de metanol – agua para extraer los esteroides en las muestras.

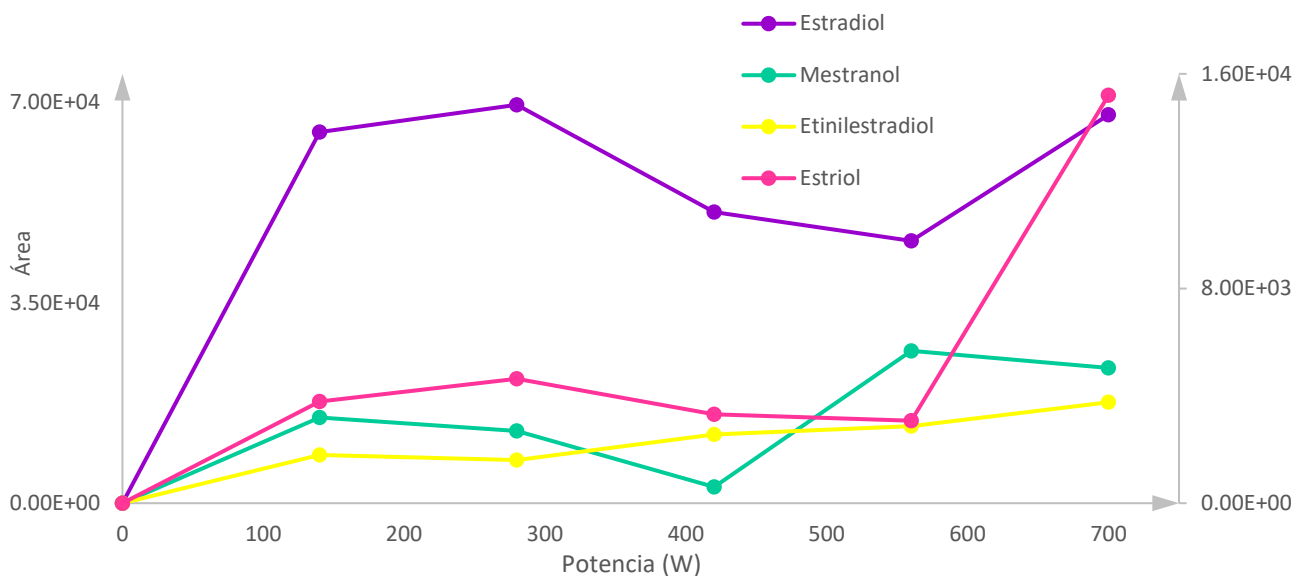
5.3 Formación de los derivados sililados.

Se optimizó la potencia del horno de microondas, el tiempo de reacción y el volumen de reactivo sililante para la formación del derivado sililado; a continuación, se muestran los resultados obtenidos para la primera variable que consistió en modificar la potencia del horno de microondas, estas fueron 140, 280, 420, 560 y 700 Watts. Obteniendo los siguientes resultados (tabla 11).

Tabla 11. Área de cada compuesto variando la potencia del horno de microondas.

Compuesto	Área				
	140 W	280 W	420 W	560 W	700 W
Estradiol	64823	69591	50827	45841	67827
Mestranol	3188	2694	599	5678	5046
Etinilestradiol	1801	1603	2562	2875	3761
Estriol	3784	4634	3315	3079	15202

Estos resultados nos muestran que la potencia del horno de microondas influye en la reacción de sililación (gráfica 3). Las áreas varían de forma apreciable entre un compuesto y otro. Se observó que al incrementar la potencia del horno de microondas a 700 Watts los resultados fueron más constantes y con áreas mayores para tres de los cuatro compuestos analizados. por lo que fue considerada como la óptima en este análisis.



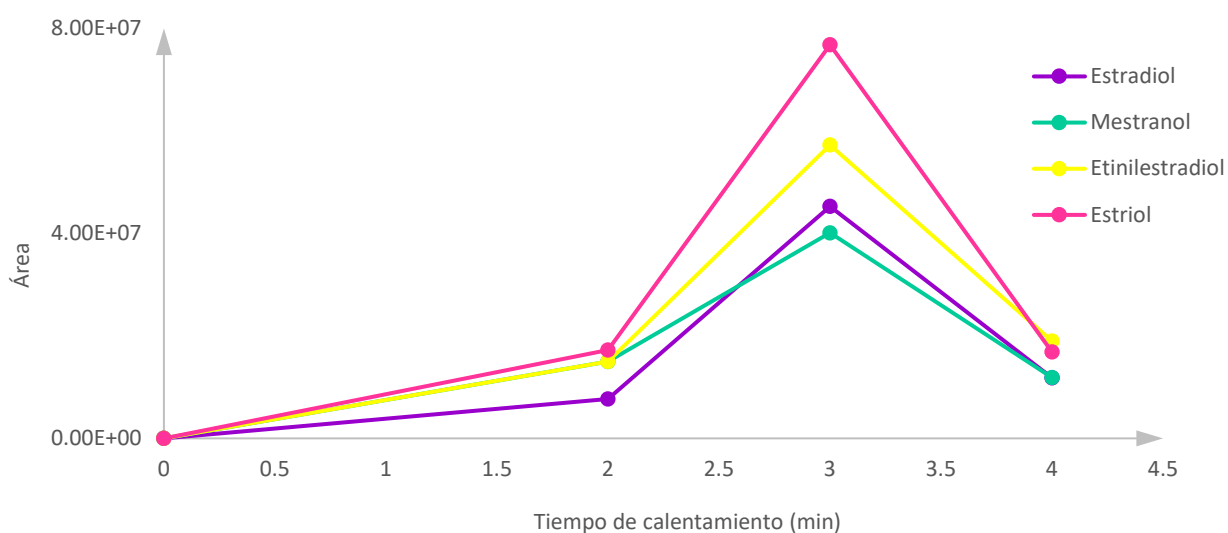
Gráfica 3. Comparación de áreas modificando la potencia del horno de microondas. Escala primaria: estradiol, escala secundaria: mestranol, etinilestradiol y estriol.

La segunda variable optimizada fue el tiempo de calentamiento para la reacción de formación del derivado sililado, los resultados se presentan en la tabla 12.

Tabla 12. Área de cada compuesto variando el tiempo de calentamiento en la reacción de sililación.

Pico	Compuesto	Área		
		2 min	3 min	4 min
1	Estradiol	7679283	45255954	11824116
2	Mestranol	15011400	40118268	11846350
3	Etinilestradiol	14989545	57240770	18973819
4	Estriol	17217548	76789573	16867444

En la gráfica 4 se puede observar que el tiempo óptimo para formar el derivado sililado es de 3 minutos por calentamiento con energía de microondas ya que se observa un aumento significativo en las áreas de los cuatro analitos de interés (figura 25).



Gráfica 4. Modificación del tiempo de calentamiento en la reacción del derivado sililado.

El tiempo de la reacción del derivado sililado para las siguientes pruebas se mantuvo en 3 minutos. El hecho de usar las microondas como forma de energía es una ventaja ya que el calentamiento con parrilla necesita más tiempo de reacción, varía entre los 20 y 30 minutos ³³.

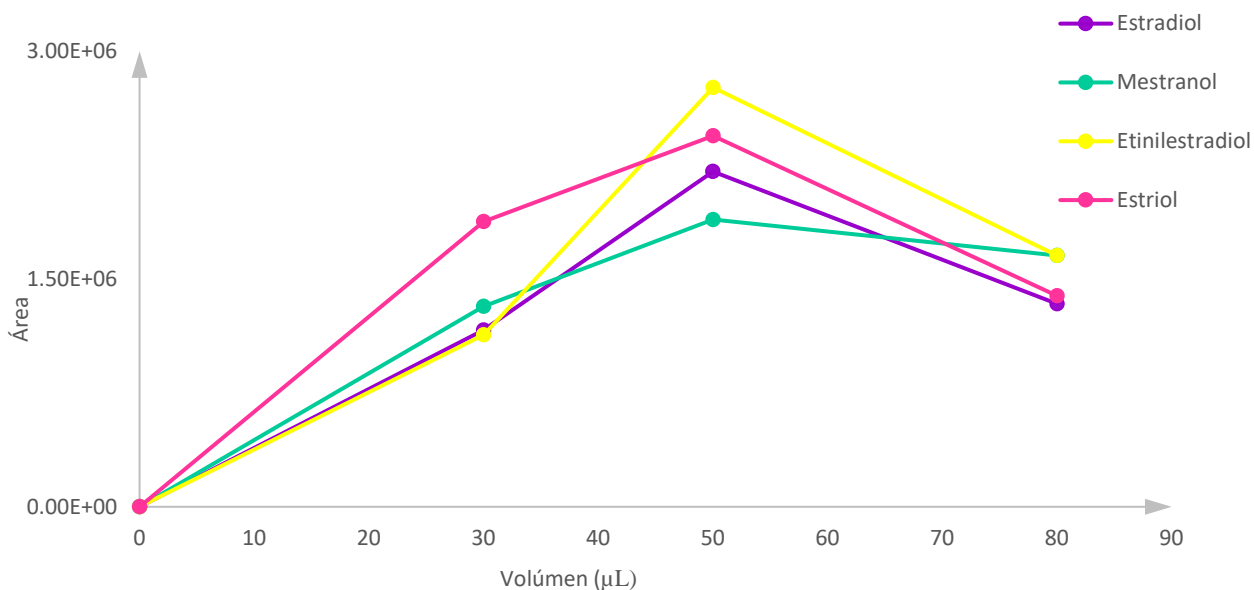
Ya que éste no es un horno especial para reacciones, no se pudo controlar la temperatura de calentamiento.

La tercera prueba consistió en variar la cantidad de reactivo sililante: 30, 50 y 80 μL . Los resultados de las áreas son presentados en la tabla 13.

Tabla 13. Área de cada compuesto variando el volumen de reactivo sililante.

Pico	Compuesto	Área		
		30 μL	50 μL	80 μL
1	Estradiol	1164548	2206945	1335924
2	Mestranol	1319533	1891391	1655401
3	Etinilestradiol	1131610	2761079	1655693
4	Estriol	1878084	2442471	1389731

En los resultados de la siguiente gráfica, Área = f (Volumen de reactivo), se puede observar que la cantidad óptima de reactivo sililante BSTFA-TMCS (90-10 % v/v), es de 50 μ L; donde hay aumento en las áreas de los cuatro compuestos (Figura 25).



Gráfica 5. Comparación de áreas modificando el volumen de reactivo sililante.

En la figura 25, se muestra el cromatograma de los cuatro esteroides, picos definidos y simétricos, con dos de tres parámetros optimizados, el tiempo de la reacción y el volumen de reactivo sililante.

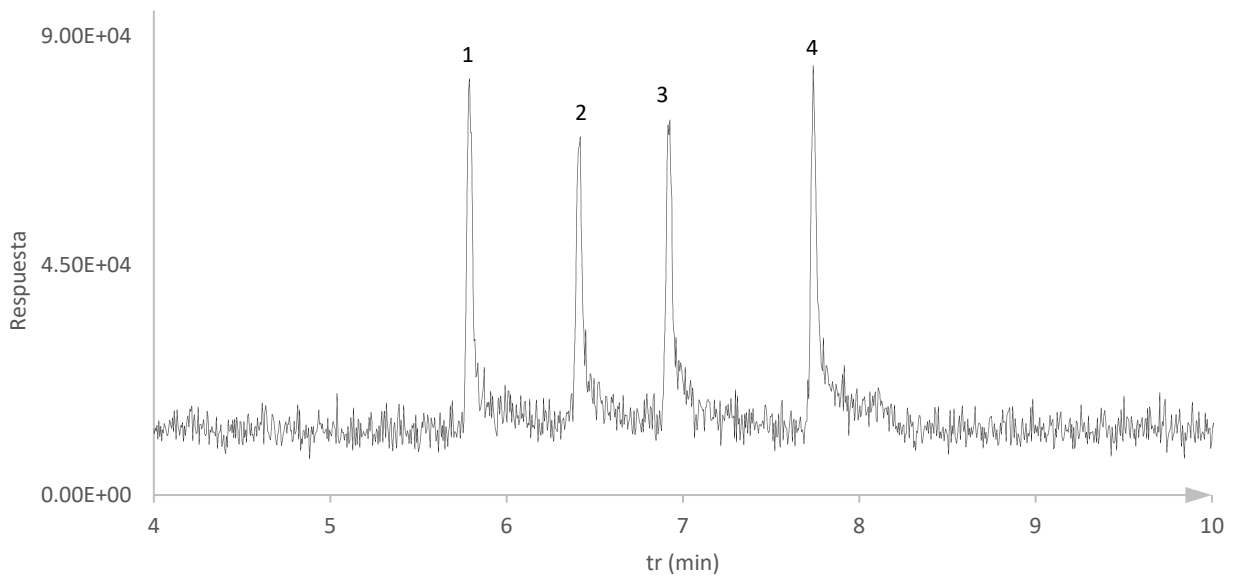


Figura 25. Cromatograma de los esteroides sililados calentando 3 minutos y 50 μ L de reactivo sililante. (1) estradiol, (2) mestranol, (3) etinilestradiol, (4) estriol.

Como se apreció en los estudios realizados anteriormente, se puede concluir que las condiciones de reacción óptimas del derivado sililado para este trabajo son las siguientes tres variables (figura 26):

- Potencia de 700 Watts
- Calentamiento con microondas por 3 minutos
- 50 μ L de BSTFA – TMCS (90-10 % v/v)

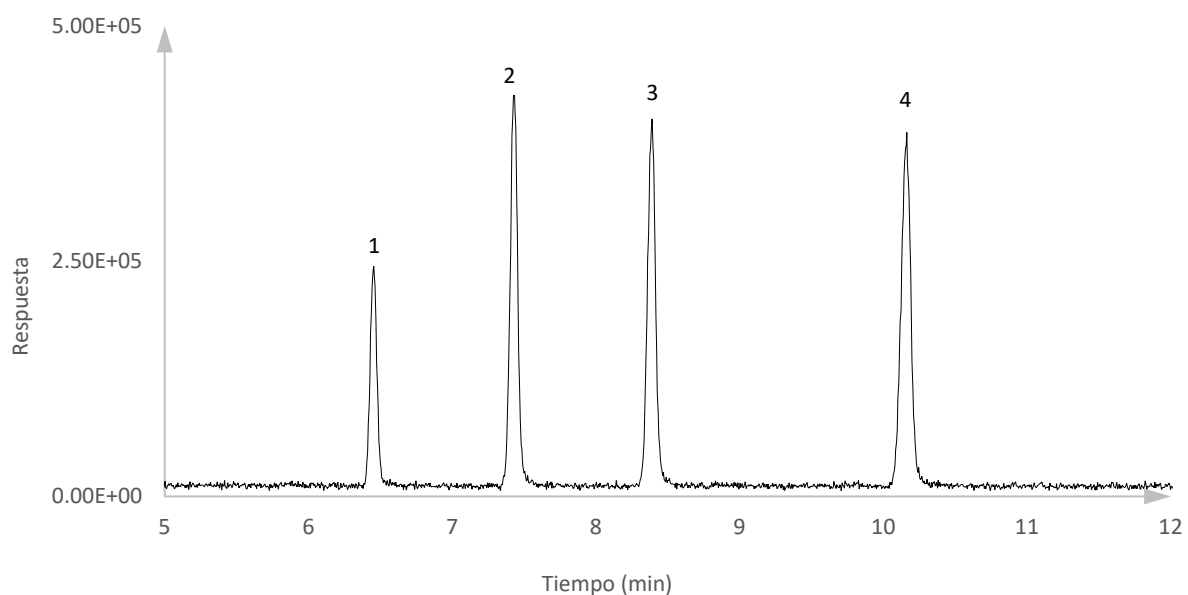


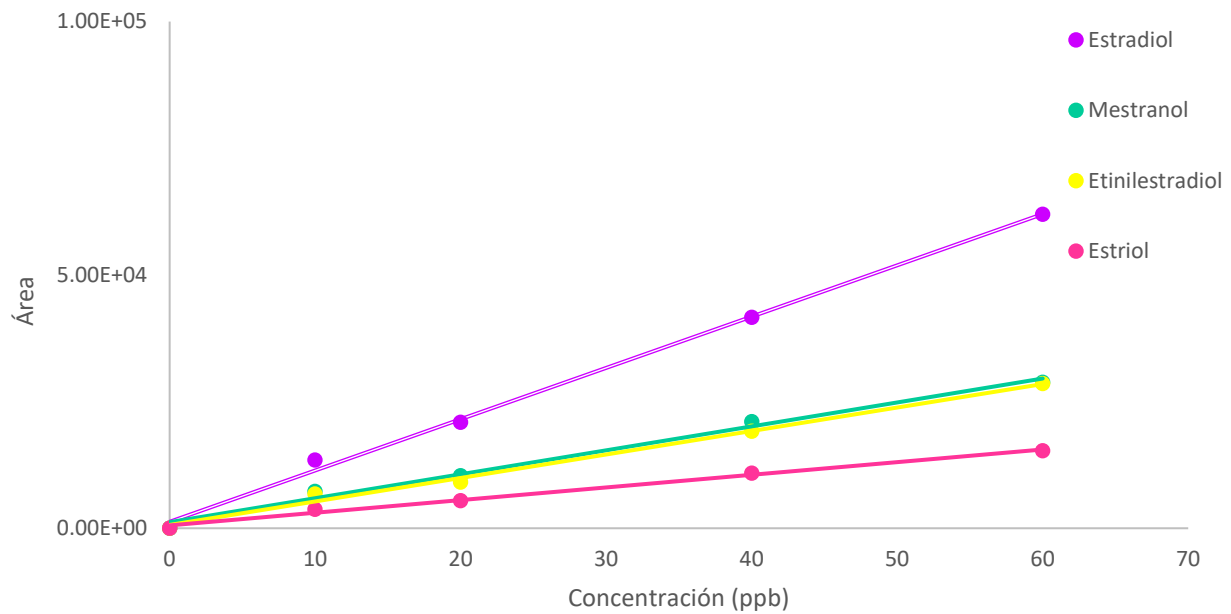
Figura 26. Cromatograma de compuestos sililados en condiciones óptimas de la reacción del derivado sililado. (1) estradiol, (2) mestranol, (3) etinilestradiol, (4) estriol

Los espectros de masas de cada compuesto se presentan en el anexo 2.

5.4 Curva de calibración por estándar externo.

Se realizó una curva de calibración con estándares de concentraciones de 10, 20, 40, 60 ppb y un blanco con DMF. Se inyectó cada concentración por triplicado para obtener 5 puntos.

En la gráfica 6, se presentan los resultados de las curvas de calibración de los cuatro esteroides analizados, en el Anexo 3 se presentan las curvas por separado de cada compuesto.



Gráfica 6. Curvas de calibración de los esteroides.

En cada una de las curvas se observa un comportamiento lineal, los parámetros estadísticos, como el coeficiente de correlación y la DER %, de las curvas serán analizados en el punto 5.6 de este apartado.

5.5 Preparación y análisis de las muestras.

Se analizaron las cuatro muestras con los parámetros de EFS previamente seleccionados.

En la muestra Tlamaco – Juandhó se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 14 y figuras 27-31).

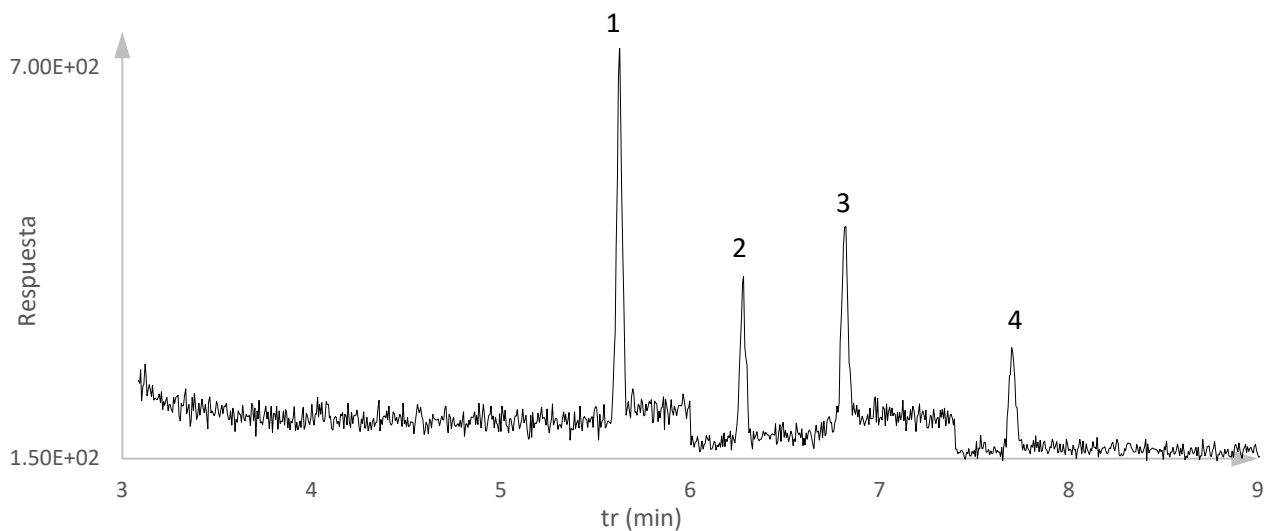


Figura 27. Cromatograma obtenido de la muestra de Tlamaco-Juandhó. (1) estradiol, (2) mestranol, (3) etinilestradiol, (4) estriol.

Para confirmar la presencia de los esteroides, se añadió 15 ppb de la mezcla “stock” de los estándares para enriquecer la muestra. Los resultados demostraron que el área de los analitos se incrementó con el enriquecimiento.

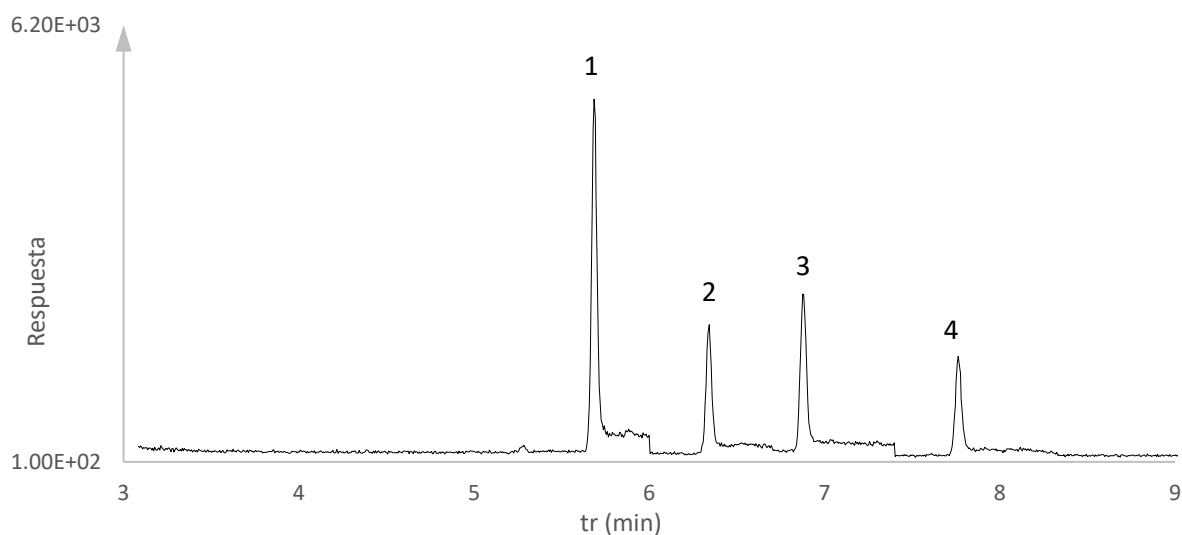


Figura 28. Cromatograma obtenido de la muestra de Tlamaco-Juandhó enriquecida. (1) estradiol, (2) mestranol, (3) etinilestradiol, (4) estriol.

De la muestra Dendhó se obtuvieron los siguientes resultados (tabla 14 y figura 29).

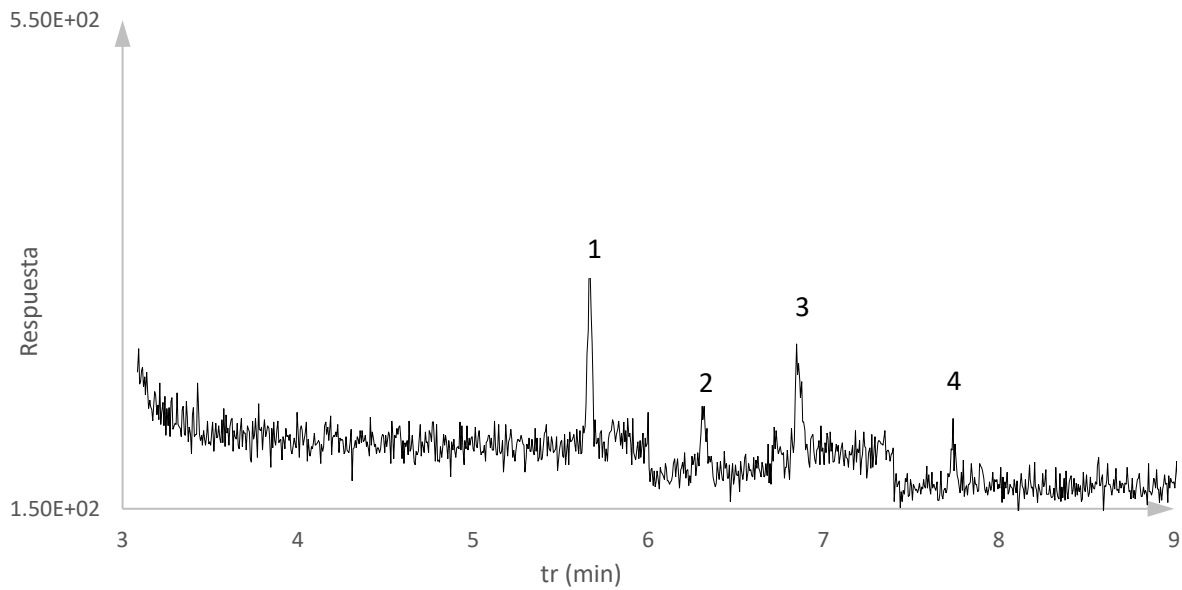


Figura 29. Cromatograma obtenido de la muestra de Dendhó. (1) estradiol, (2) mestranol, (3) etinilestradiol, (4) estriol.

En el Sifón Bojay no se encontraron los analitos, sin embargo, es posible que exista la presencia de alguno de los esteroides en concentraciones por debajo del límite de detección del equipo. Se muestra el cromatograma obtenido donde se confirma la inexistencia de los analitos en esta muestra (figura 30).

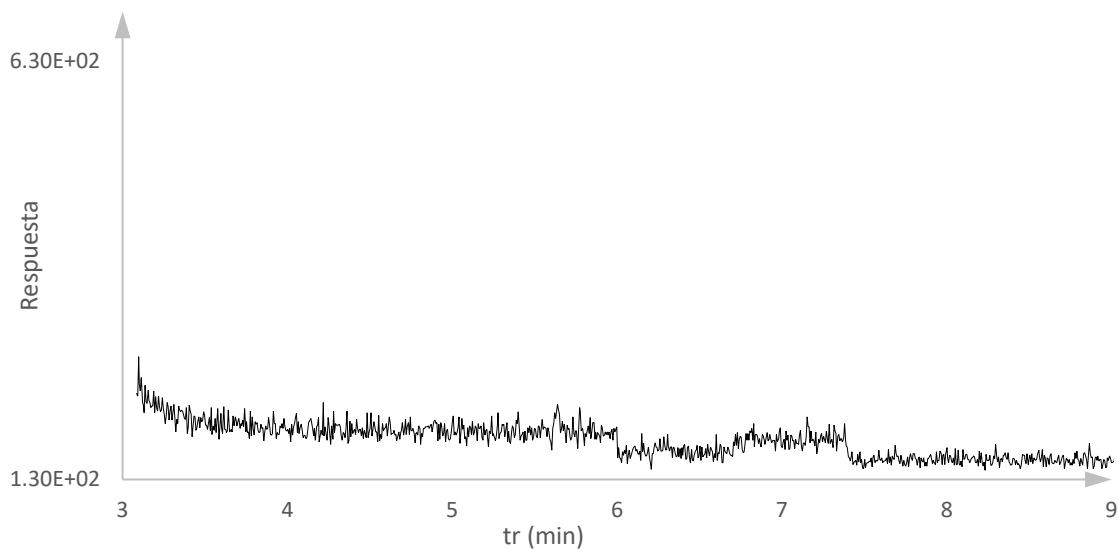


Figura 30. Cromatograma obtenido de la muestra de Sifón Bojay. Analitos por debajo del límite de detección.

En la última muestra, el canal Cerro de la Cruz, se encontraron los resultados presentados en la tabla 14 y figura 31.

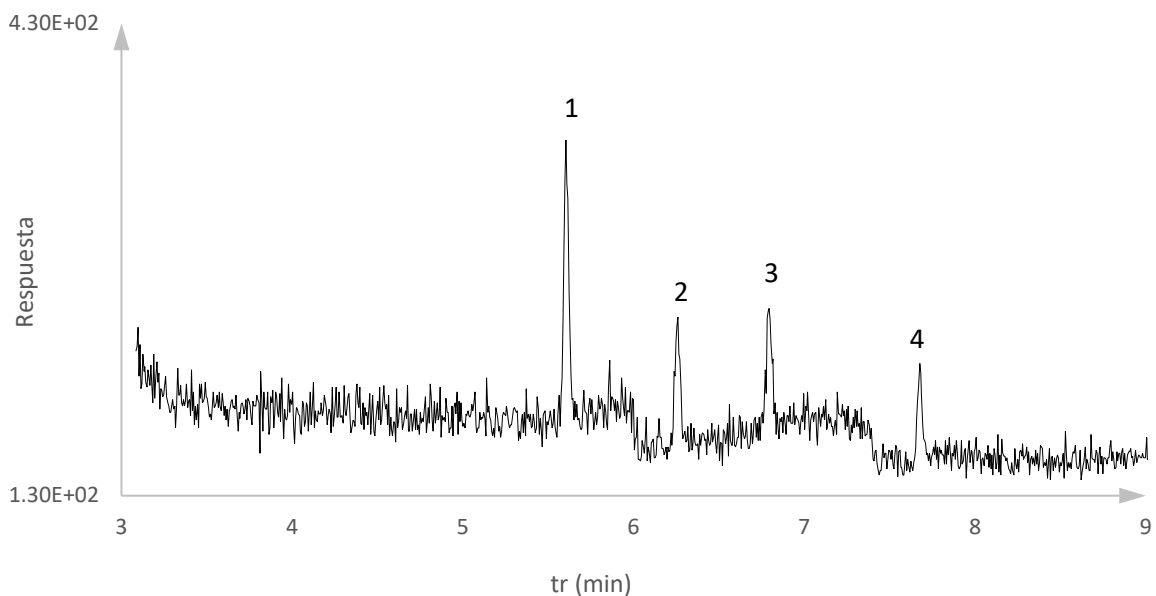


Figura 31. Cromatograma obtenido de la muestra de canal Cerro de la Cruz. (1) estradiol, (2) mestranol, (3) etinilestradiol, (4) estriol.

Tabla 14. Áreas de los esteroides en los canales estudiados.

Pico	Compuesto	Área	Área	Área
		Tlamaco-Juandhó	Dendhó	Canal cerro de la Cruz
1	Estradiol	10740	4071	4311
2	Mestranol	4943	2192	1944
3	Etinilestradiol	6840	2525	2469
4	Estriol	3786	1057	1399

De las cuatro muestras analizadas, los resultados nos muestran que en tres de ellas están presentes los cuatro esteroides estudiados (figuras 27, 29 y 31). Y en éstas, el estradiol es el que presentó una mayor área.

Al analizar el segundo extracto con metanol en las cuatro muestras, no se encontró ninguno de los compuestos, esto demostró que con la primera elución se logró extraer la mayor cantidad de los analitos.

Los cromatogramas obtenidos de la segunda elución de la extracción de cada muestra se presentan en el Anexo 4.

- Determinación de la concentración de esteroides.

Para cada esteroide, se calculó la concentración (tabla 15).

Tabla 15. Concentraciones de los esteroides presentes en los cuatro canales estudiados.

Compuesto	Concentración (ppb)			
	Tlamaco-Juandhó	Dendhó	Sifón Bojay	Cerro de la Cruz
Estradiol	9.7	2.7	ND	3.1
Mestranol	7.0	2.1	ND	1.1
Etinilestradiol	11.2	4.0	ND	3.1
Estriol	14.2	2.0	ND	2.5

Se observó que la muestra de Tlamaco-Juandhó es la que presenta mayores concentraciones de los esteroides en comparación con las muestras Dendhó y Cerro de la Cruz.

El etinilestradiol, que es un esteroide sintético utilizado en píldoras anticonceptivas, es el que se presentó en mayor concentración en las muestras. Mientras que el mestranol, también esteroide sintético, usado en anticonceptivos, es el que está presente en concentraciones más bajas. El estradiol y el estriol presentan concentraciones mayores dentro de las tres muestras.

5.6 Parámetros estadísticos.

- Límite de detección y Límite de cuantificación.

Se calculó el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) del método con las ecuaciones 4 a 8, los resultados son presentados en las tablas 16 y 17.

Tabla 16. Límites de detección para cada compuesto analizado.

Compuesto	LD concentración (ppm)
Estradiol	1.3
Mestranol	0.7
Etinilestradiol	1.1
Estriol	3.1

El compuesto que presentó el mayor límite de detección es el estriol, es decir, se requiere de mayor concentración para que el equipo lo detecte, no así para el mestranol donde se puede detectar a menor concentración. El LD del estradiol y del etinilestradiol fue similar.

Los límites de cuantificación inferior y superior se observaron con el mestranol y estriol respectivamente, es decir, estos valores fueron la mínima concentración que se pudo cuantificar.

Tabla 17. Límites de cuantificación para cada compuesto analizado.

Compuesto	LC concentración (ppm)
Estradiol	6.7
Mestranol	3.4
Etinilestradiol	5.5
Estriol	15.4

Es importante mencionar que estos valores se determinaron en función del equipo de CG – EM utilizado en este trabajo (Punto 4.1), bajo las condiciones experimentales aquí descritas.

- Linealidad y DER %.

Se analizaron los resultados de cada analito basados en la curva de calibración por estándar externo. Se calculó la pendiente de la curva de cada analito, el coeficiente de correlación R para evaluar la linealidad entre los puntos y la Desviación Estándar Relativa (DER %) para conocer la dispersión de cada punto en la curva (ecuación 11).

$$DER\% = \frac{\sigma_{\text{área}}}{\text{área}_{\text{prom}}} * 100$$

Ecuación 11. Desviación estándar relativa en porcentaje.

Tabla 18. Resultados de linealidad y dispersión de los datos de la curva de calibración.

Compuesto	Pendiente	R ²	DER %
Estradiol	1012.2	0.9973	5.6
Mestranol	472.5	0.9911	9.3
Etinilestradiol	463.4	0.9937	15.4
Estriol	249.7	0.9934	10.1

Las curvas de calibración presentaron un comportamiento lineal (Anexo 3). El mayor valor de Fr lo presentó el estradiol, el factor de correlación fue homogéneo para los cuatro esteroides, y con una DER % promedio de los 15 datos de 10.1 %, menor a 20%, se puede concluir que los resultados de las concentraciones de los analitos a este nivel de ultra-trazas son confiables ⁴⁵.

- Recobro.

Se calculó el recobro en la EFS en ambas eluciones (ecuaciones 9 y 10). Para calcular el recobro total se sumó el recobro de la primera elución y el de la segunda elución.

Tabla 19. Recobro de cada compuesto por elución de la EFS y el recobro total.

Compuesto	Recobro (%) 1ª elución	Recobro (%) 2ª elución	Recobro Total (%)
Estradiol	67.7	3.5	71.2
Mestranol	62.8	0.4	63.2
Etinilestradiol	60.0	0.2	60.2
Estriol	75.2	0.3	75.4

Los valores obtenidos para el recobro, son considerados aceptables, de acuerdo a los datos disponibles en la literatura ^{25, 30}, es decir la elección del cartucho de EFS y la proporción de los disolventes fueron adecuados para la extracción en fase sólida.

Los cuatro esteroides pueden ser analizados con la metodología desarrollada y descrita en este trabajo.

6. CONCLUSIONES.

Las condiciones experimentales utilizadas para la determinación de los esteroides: estradiol, mestranol, etinilestradiol y estriol en agua residual de cuatro canales, Tlamaco – Juandhó, Dendhó, Sifón Bojay y Cerro de la Cruz del Acuífero del Valle del Mezquital resultaron adecuados para los fines del este trabajo.

La selección del programa de temperatura redujo el tiempo de análisis por CG.

Se logró separar y detectar adecuadamente los cuatro analitos con un tiempo de análisis corto, esto permitió disminuir el tiempo de cada análisis.

En la reacción del derivado sililado, se establecieron los tres parámetros que influyen en ésta; el tiempo de reacción, la cantidad de reactivo sililante y la potencia del horno de microondas, obteniendo picos cromatográficos simétricos. El tiempo de la reacción mejoró con el uso de microondas como forma de energía, en comparación a utilizar otras formas de calentamiento como baño maría o parrilla, sugeridas en gran número de trabajos publicados en la literatura. La temperatura de reacción no fue controlada debido a que no se utilizó un horno de microondas especial para reacciones.

Los analitos presentaron un comportamiento lineal en su análisis por estándar externo, y la DER % permitió realizar un análisis con resultados confiables ya que la dispersión de los datos fue menor al 20%.

La EFS resulto ser una técnica adecuada en el análisis de los esteroides ya que estos analitos se encuentran en concentraciones del orden de ppb ($\mu\text{g/L}$) en agua residual.

La EFS no requiere grandes volúmenes de disolventes. La metodología implementada permite cuantificar estos esteroides con costos muy bajos. En comparación con otras técnicas como la Extracción Líquido – Líquido ²⁴.

Los resultados de las muestras revelaron que en tres de ellas se encontraron presentes los cuatro esteroides. Es importante recordar que las muestras fueron recolectadas de canales que son rellenados con agua de la presa Endhó, la cual

contiene aguas negras provenientes del Área Metropolitana de la Ciudad de México (AMCM). Esto podría indicar que los esteroides están presentes como desechos en la orina de las mujeres que los consumen en anticonceptivos o en fármacos que los contienen.

La grave situación que presentan los resultados obtenidos es el conocimiento de que el agua residual contiene una cantidad considerable de esteroides, y que esta agua es utilizada para riego en la región del Valle del Mezquital sin ningún tratamiento previo. Esto podría repercutir a la salud humana y a la de los animales, ya que son compuestos capaces de crear un desequilibrio hormonal, y evidentemente, son de los disruptores endócrinos que necesitan un monitoreo más amplio para su tratamiento.

Finalmente, se puede agregar que el trabajo cumplió con los objetivos planteados: se realizó el análisis cualitativo y cuantitativo de cuatro esteroides por EFS y CG – EM, la metodología desarrollada ofrece resultados confiables obtenidos de manera rápida, económica y eficaz comparada con metodologías ya establecidas mencionadas en el punto ³⁰⁻³³.

7. BIBLIOGRAFÍA.

1. McMurry J. *Química Orgánica, 7ª edición*. Estados Unidos: Cengage Learning; 2011.
2. Sigma Aldrich [Internet]. *Ficha de datos de seguridad*; [consultado 09 de 01 de 2018]. Disponible en: www.sigmaaldrich.com/MSDS
3. Espigares M, Pérez JA. *Aspectos sanitarios del estudio de aguas*. Granada: Universidad de Granada, Servicio de Publicaciones; 1985.
4. Pérez R, Jiménez R, Jiménez BE, Chávez A. *¿El agua del Valle del Mezquital, fuente de abastecimiento para el Valle de México?* México: Instituto de Ingeniería, UNAM; 1999.
5. Mendoza H. *A viable solution for management of wastewater in the Metropolitan Area of the Valley of Mexico*. En: Land treatment. México: Eco-Ingeniería S.A.; 1980. p. 163-193.
6. Jiménez B, Chávez A, Barrios A, Pérez R. *Impact and potential of reused water in the Mezquital Valley*. Water Research. 2000; 21 (6): 34-36.
7. De Alba R [Internet]. *Crónica Ambiental: Aguas negras, el oro del Valle del Mezquital*; [consultado 03 de 04 de 2018]. Disponible en: <https://www.cronicaambiental.com.mx/ediciones/cronica-ambiental-09.pdf>
8. Siemens J, Huschek G, Siebe C, Kaupenjohann M. *Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system, Mexico City-Mezquital Valley*. Water Research. 2008; 42 (8): 2124-2134.
9. Commons C [Internet Blog]. *Contaminación y purificación del Agua*; [consultado 04 de 03 de 2018]. Disponible en: <http://contaminacion-purificacion-agua.blogspot.mx/2005/09/purificacion-de-agua-por-sedimentacion.html>
10. Poyton HC, Vulpe C. *Ecotoxicogenomics: Emerging Technologies for the Emerging Contaminants*. Journal of the American Water Resources Association. 2009; 45 (1): 83-96.

11. Cifuentes E, Gómez M, Blumenthal U, Romieu I, Ruíz G, Ruíz S. *Risk factors of Giardia intestinalis infection in agricultural villages practicing wastewater irrigation in Mexico*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2000; 62 (3): 388-392.
12. Contreras JD, Meza R, Siebe C, Rodríguez S, López YA, Castillo G, Amieva RI, Solano SG, Mazari M, Silva MA, Vázquez N, Rosas I, Martínez L, Salinas E, Riojas H, Eisenberg J. *Health risks from exposure to untreated wastewater used for irrigation in the Mezquital Valley, Mexico*. Water research. 2017; 123: 834-850.
13. "Materia ambiental. Límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado". Norma Oficial Mexicana NOM-002-SEMARNAT-1996. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales; 1998. [fecha de acceso 04 de 01 de 2018]. "Materia ambiental. Límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público". Norma Oficial Mexicana NOM-003-SEMARNAT-1997. Secretaría de Media Ambiente y Recursos Naturales; 1998. [fecha de acceso 04 de 01 de 2018].
14. López M, Barceló D. *Review of analytical methods for the determination of estrogens progestogens in wastewater*. Frrsenius Jorunal Anal Chem. 2001; 141: 437-447.
15. Knapp D. *Handbook of Analytical Derivatization Reactions*. Estados Unidos: John Wiley & Sons; 1979.
16. Zaikin VG, Halket JM. *Derivatization in Mass Spectrometry, Acylation*. Eur J Mass Spectrum. 2003; 9 (5): 421-434.
17. Rojas E, Alarcón AL, Elizalde P, Rojo F. *Optimization of carbohydrate silylation for Gas Chromatography*. Journal of Chromatography A. 2004; 1027: 117-120.
18. Pierce AE. *Silylation of Organic Compounds:A Technique for gasphase analysis*. Estados Unidos: Pierce Chemical Company; 1968.
19. Scott R. *Gas Chromatography, Book 2*. Estados Unidos: Chrom-Ed Book Series; 2003.
20. Simpson N, Wells M. *Introduction to solid-phase extraction*. En: Solid Phase Extraction: Principles, Techniques and Applications. Estados Unidos: Taylor & Francis Group LLC; 2000. p. 1-17.

21. Andrade A, Canle M, Leroy V, Cerdá V. *Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part II)*. Trends in Analytical Chemistry. 2016; 80: 655-667.
22. Quattrocchi OA, Abelaira A, Laba RF. *Introducción a la HPLC: Aplicación y práctica*. Argentina: Artes Gráficas Farro S.A.; 1992.
23. SUPELCO [Guía]. *Instructions for Assembling and Using Visiprep and Visiprep-DL Solid Phase Extraction Vacuum Manifolds*. 1996.
24. Sánchez PB. *Optimización de una Metodología para Derivatizar Disruptores Endócrinos (17 β -estradiol y 17 α -etinilestradiol) y su Análisis por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas (CG-EM)*. [Tesis licenciatura]. México: Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, División de Ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de Guadalajara; 2013.
25. Lu C, Wang M, Mu J, Han D, Bai Y, Chang H. *Simultaneous determination of eighteen steroid hormones in antler velvet by gas chromatography- tandem mass spectrometry*. Food Chemistry. 2013; 141: 1796 – 1806.
26. Hennion MC. *Solid – phase extraction: method development, sorbents and coupling with liquid chromatography*. Journal of Chromatography A. 1999; 856: 3 – 54.
27. Yu W. *Development and application of a solid phase extraction method for simultaneous determination of PAHs, oxy-PAHs and azaarenes in wáter samples*. [Tesis maestría]. Suecia: UMEA Universitet; 2002.
28. Gary C. *Analytical Chemistry*. Estados Unidos: John Wiley & Sons; 1994.
29. Valls J. *Extracción en Fase Sólida (SPE) para tratamiento de muestras de alimentos para análisis por Cromatografía* [Tesis doctoral]. Venezuela: Postgrado Interfacultades en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Central de Caracas – Venezuela; 2004.
30. Kelly C. *Analysis of steroids in enviromental wáter samples using solid – phase extraction and ion – trap gas chromatography – mass spectrometry and gas*

chromatography – tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A. 1999; 872: 309 – 314.

31. Ternes TA, Stumpf UM, Mueller J, Haberer K, Wilken RD, Servos M. *Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants (Investigations in Germany, Canada and Brazil)*. The Science of the Total Environment. 1999; 225: 81 – 90.
32. Lui R, Zhou JL, Wilding A. *Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid phase extraction – gas chromatography – mass spectrometry*. Journal of Chromatography A. 2003; 1022: 179 – 189.
33. Andrási N, Helenkár A, Vasantis A, Záray G, Monlár I. *The role of acquisition methods in the analysis of natural and synthetic steroids and cholic acids by gas chromatography – mass spectrometry*. Journal of Chromatography A. 2011; 1218: 8264 – 8272.
34. Andrade A, Canle M, Leroy V, Cerdá V. *Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I)*. Trends in Analytical Chemistry. 2016; 80: 641-654.
35. Cromalab SL [Internet]. *Blog de Cromatografía*; [consultado el 04 de 05 de 2016]. Disponible en: <http://blog.cromlab.es/interchim-spe-6-25ws-su-automata-para-efs-parte-i/>
36. Lenehan CE. *Chromatography: Basic Principles*. En: Encyclopedia of Forensic Sciences. Australia: Elsevier; 2013. p. 573 – 578.
37. Shellie RA. *Gas Chromatography*. En: Gas Chromatography. Australia: Elsevier; 2013. p. 146 – 153.
38. Stauffer E. *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*. En: Encyclopedia of Forensic Sciences. Switzerland: Elsevier; 2013. p. 596 – 602.
39. Museo Nacional de Ciencias Naturales [Internet]. *Investigación: Cromatografía de Gases*; [consultado 14 de 02 de 2018]. Disponible en: http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf

40. Museo Nacional de Ciencias Naturales [Internet]. *Investigación: Espectrometría de Masas*; [consultado 15 de 02 de 2018]. Disponible en: http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/espectrometria_de_masas.pdf
41. Museo Nacional de Ciencias Naturales [Internet]. *Investigación: Conceptos Fundamentales de Cromatografía*; [consultado 15 de 02 de 2018]. Disponible en: http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/principios_de_cromatografia.pdf
42. Hites RA. *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*. En: Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Estados Unidos: Raven Press; 1985. p. 609 – 626.
43. Amyd [Internet]. Análisis cualitativo vs cuantitativo; [consultado 18 de 02 de 2018]. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/HPLC6_26123.pdf
44. Krupčík J, Májek P, Gorovenko R, Blasko J, Kibunec R. *Considerations on the determination of the limit of detection and the limit of quantification in one – dimensional and comprehensive two – dimensional gas chromatography*. Journal of Chromatography A. 2015; 1396: 117 – 130.
45. Rojo F [Internet]. *Plantilla de calibración lineal, curso de Estadística*; [consultado 18 de 04 de 2018]. Disponible en: depa.fquim.unam.mx/amyd/docs.php?curso=208

8. ANEXOS

8.1 ANEXO 1.

A continuación, se muestra un mapa de la región del estado de Hidalgo, con la localización de los cuatro canales muestreados en el Valle del Mezquital.

Tabla 20. Coordenadas UTM de los canales de donde se obtuvieron las muestras analizadas.

Canal	Coordenadas	
	UTM X-14N	UTM Y-14N
Dendhó	467273	2217444
Tlamaco – Juandhó	478627	2224426
Sifón Bojay	464879	2220964
Cerro de la Cruz	475239	2226978

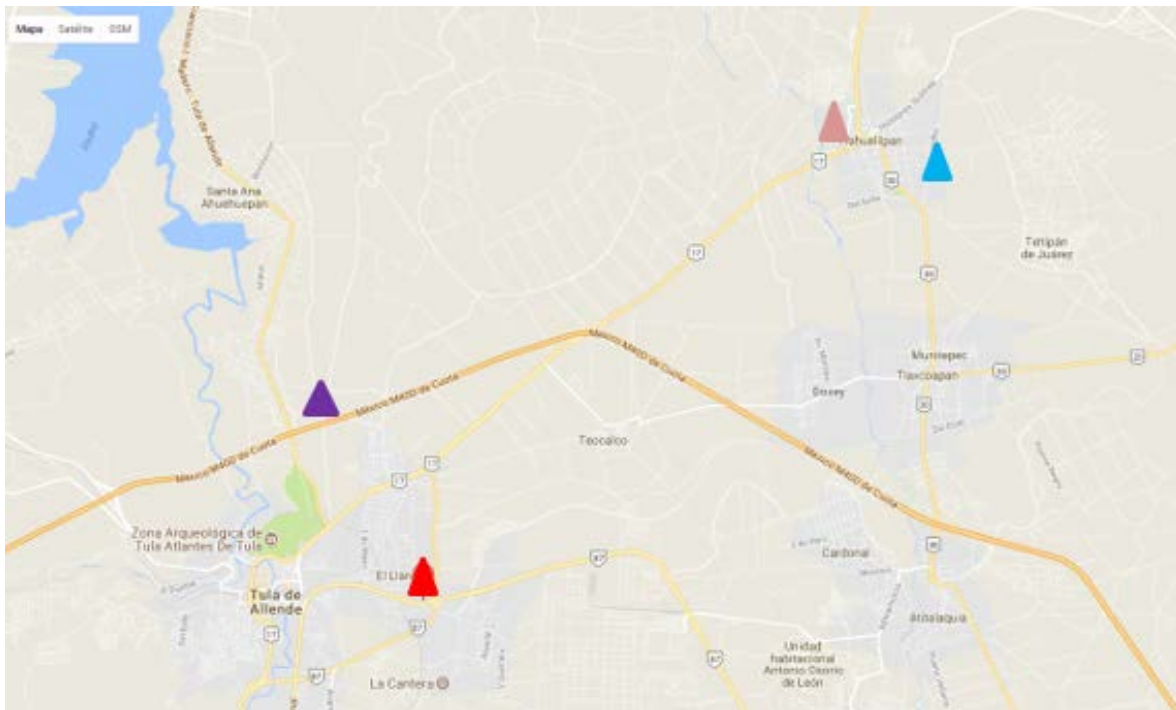
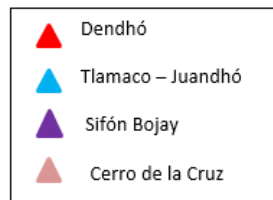


Figura 32. Mapa del sitio de muestreo

8.2 ANEXO 2.

En este anexo se muestran los espectros de masas, indicando su ión molecular M^+ y su pico base PB, obtenidos de la base de datos NIST MS Search 2.0 y de manera experimental.

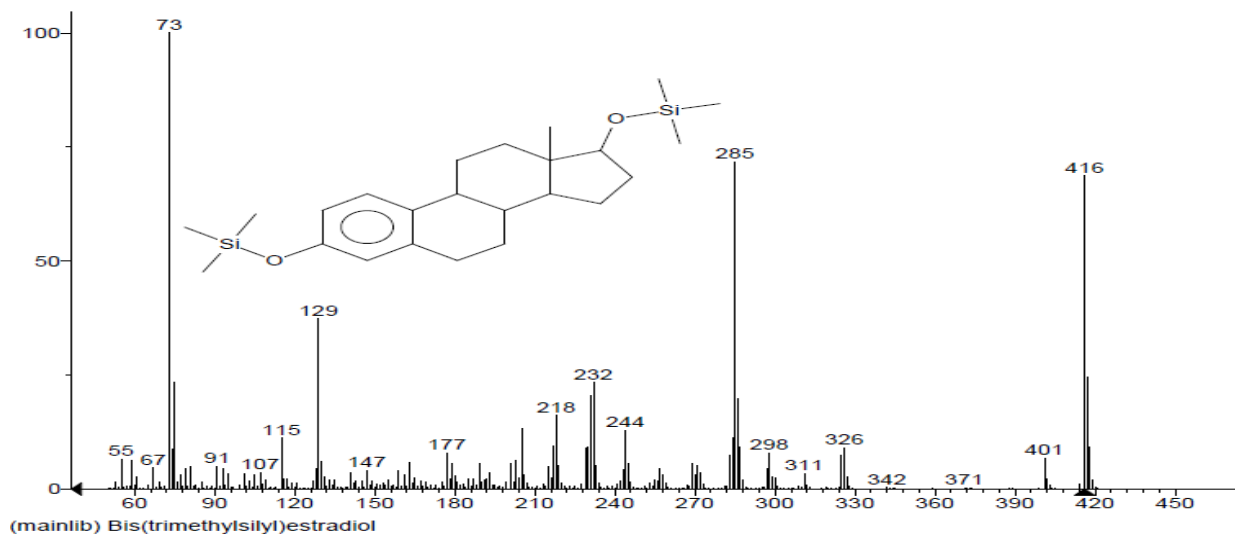


Figura 33. Espectro de masas de la NIST del estradiol-TMS. M^+ =416 uma, PB= 73 uma.

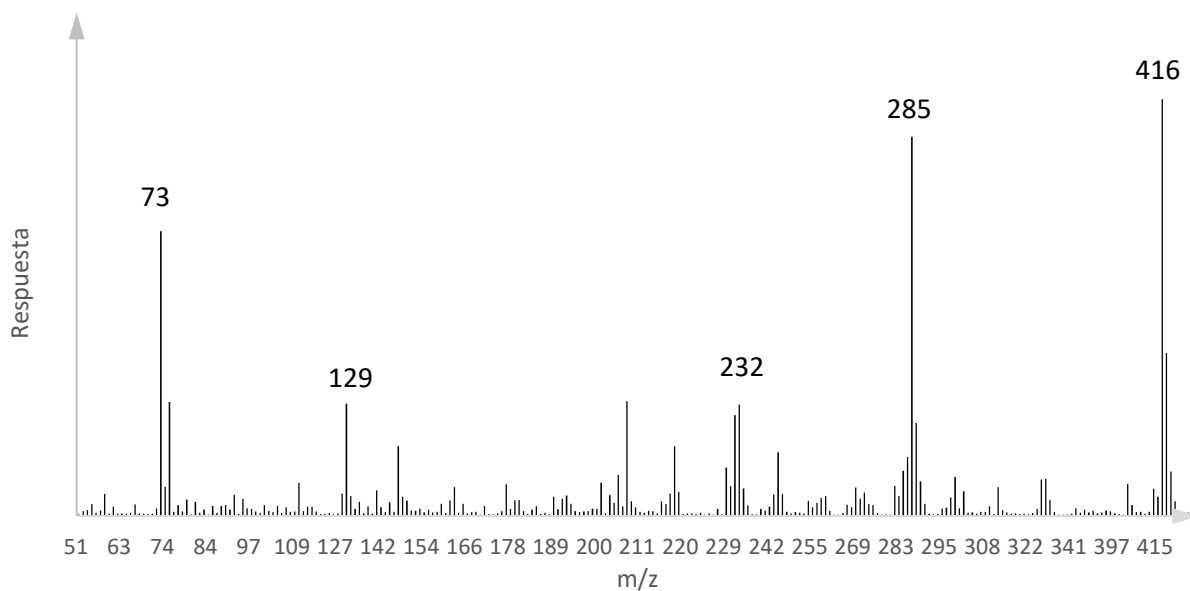


Figura 34. Espectro de masas experimental de estradiol-TMS. M^+ =416 uma, PB=416 uma.

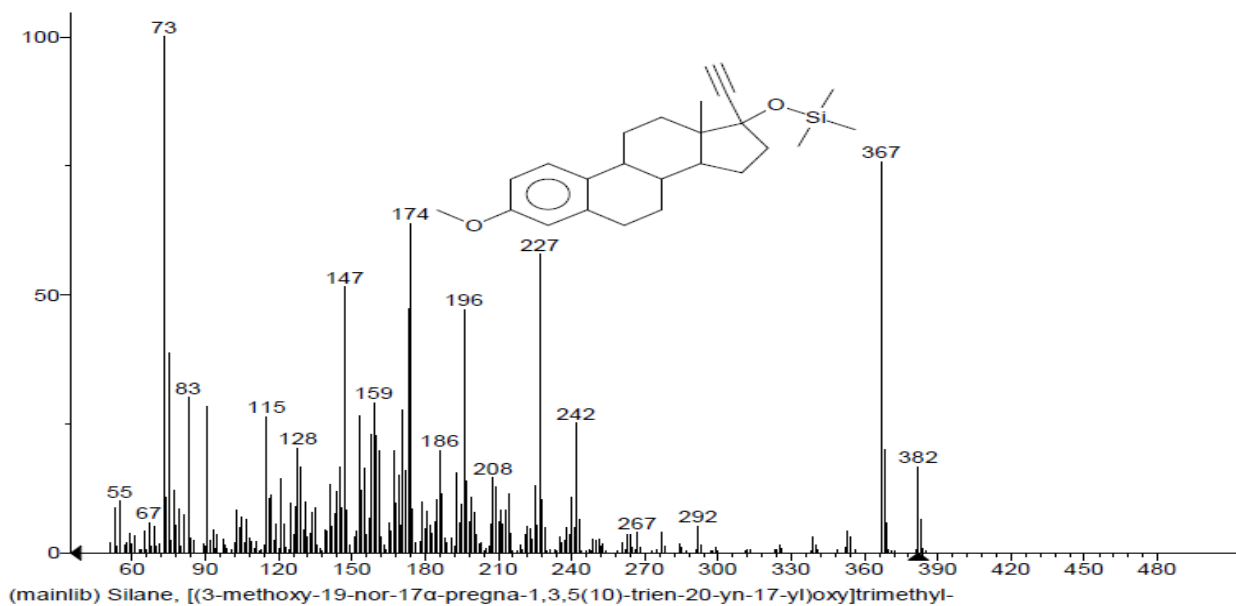


Figura 35. Espectro de masas de la NIST del mestranol-TMS. M^+ =382 uma, PB=73 uma.

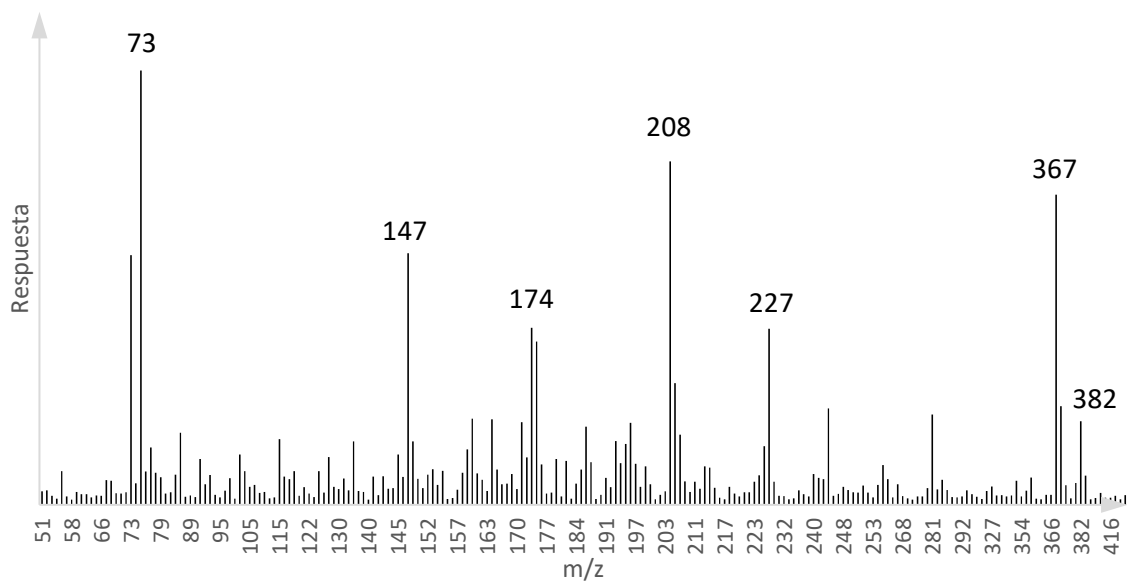


Figura 36. Espectro de masas experimental de mestranol-TMS. M^+ =382 uma PB=73 uma.

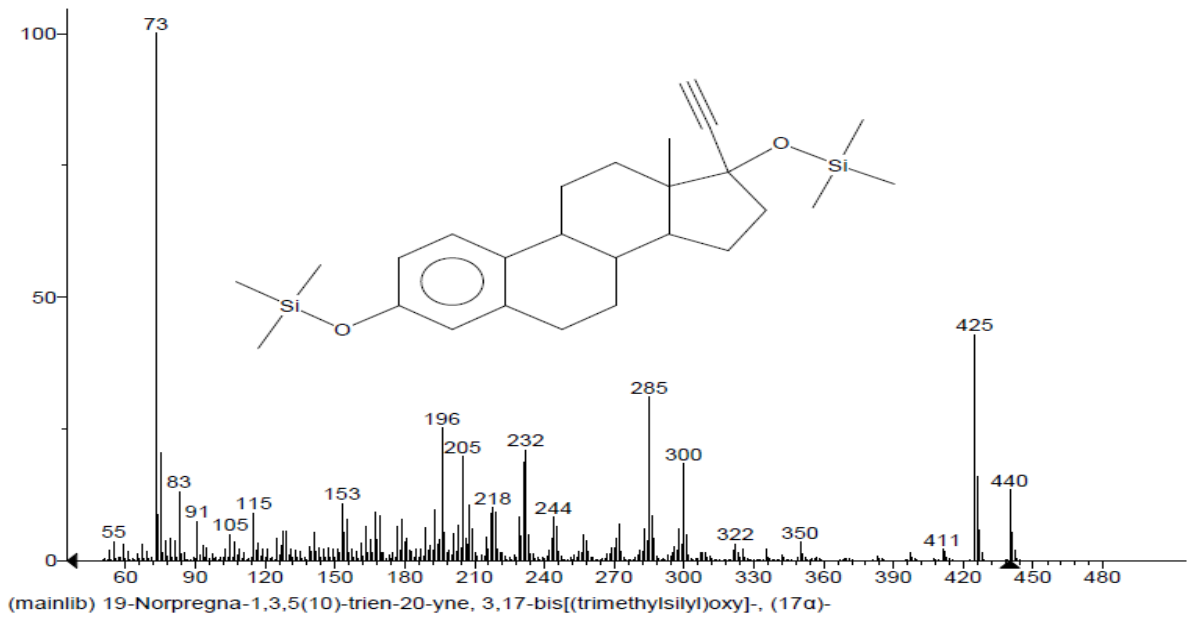


Figura 37. Espectro de masas de la NIST del etinilestradiol-TMS. M^+ =440 uma, PB=73 uma.

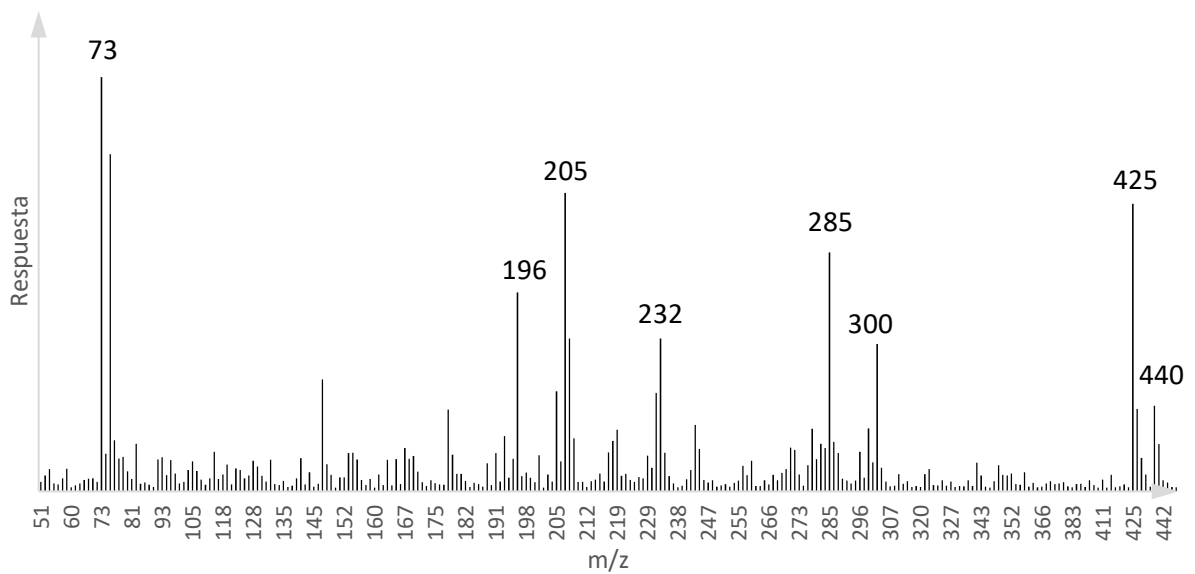


Figura 38. Espectro de masas experimental de etinilestradiol-TMS. M^+ =440 uma, PB=73 uma.

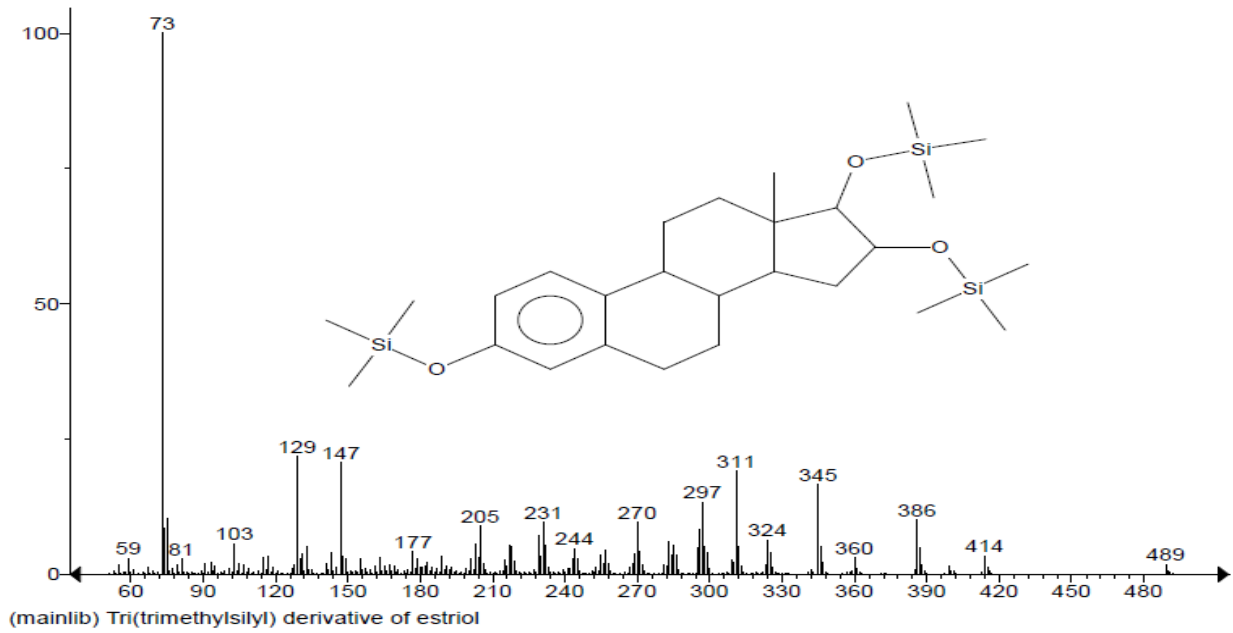


Figura 39. Espectro de masas de la NIST del estriol-TMS. $M^+=489$ uma, $PB=73$ uma.

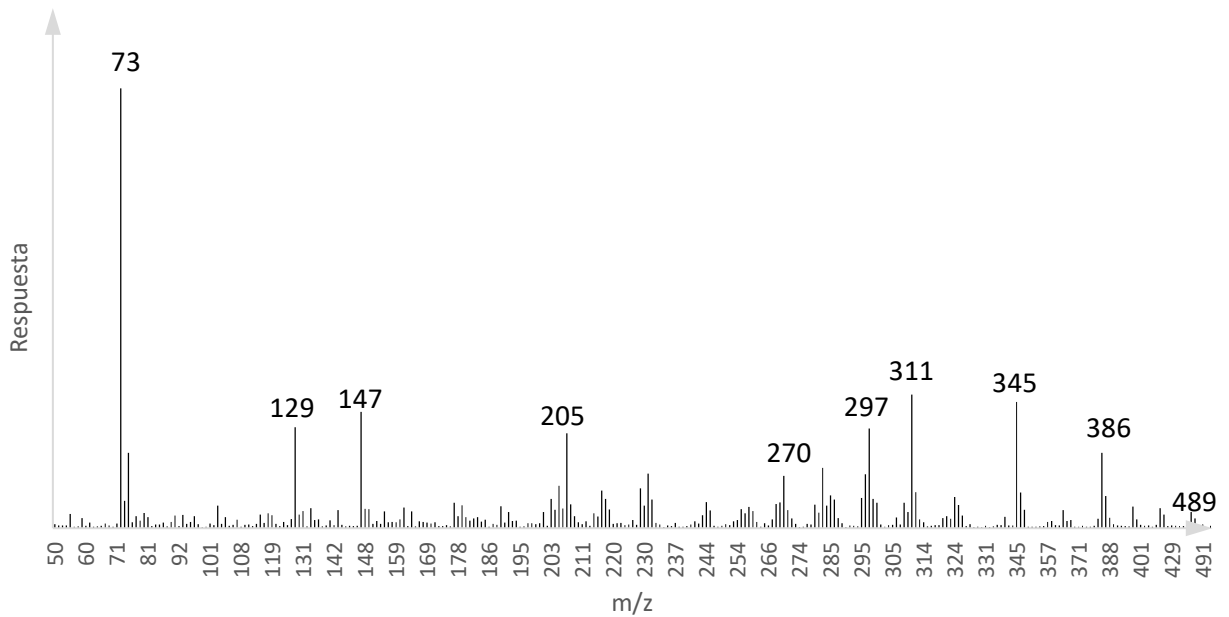
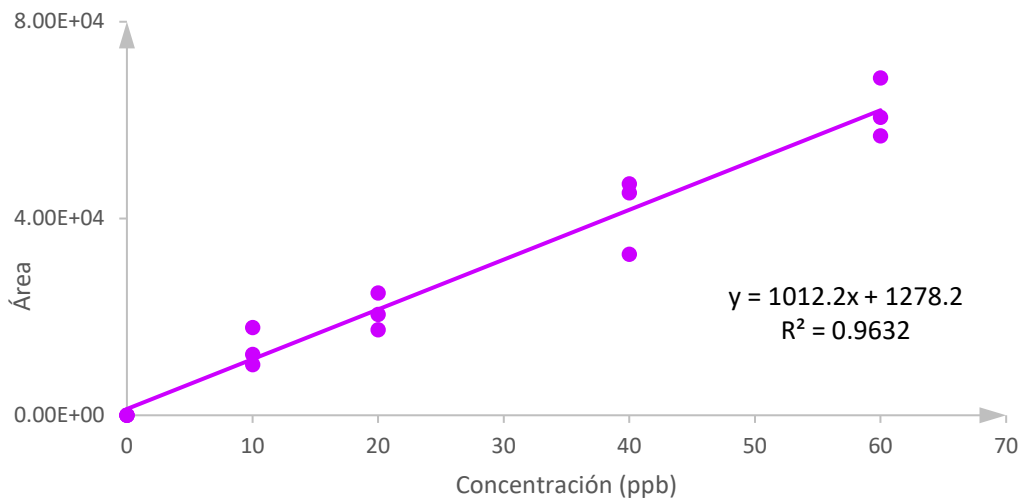


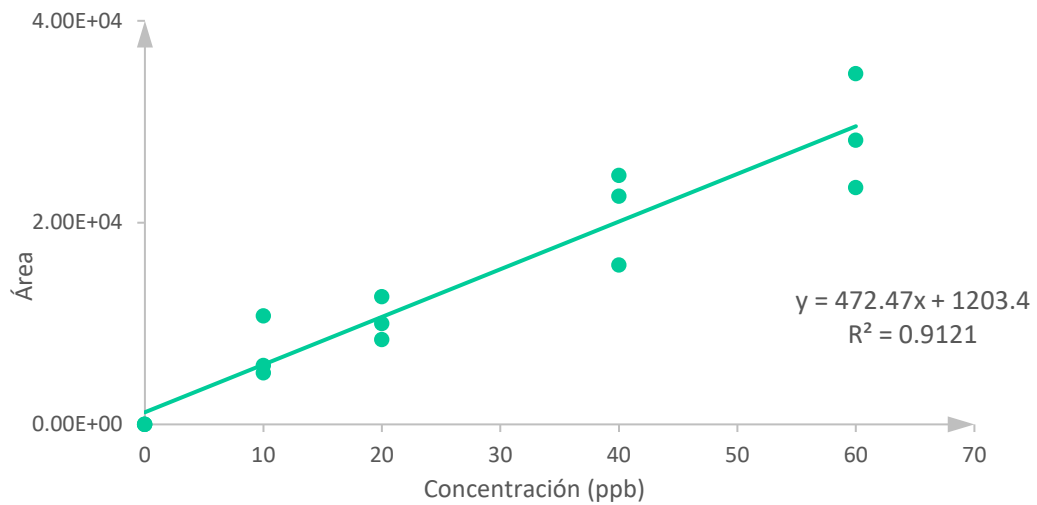
Figura 40. Espectro de masas experimental de estriol-TMS. $M^+=489$ uma, $PB=73$ uma.

8.3 ANEXO 3.

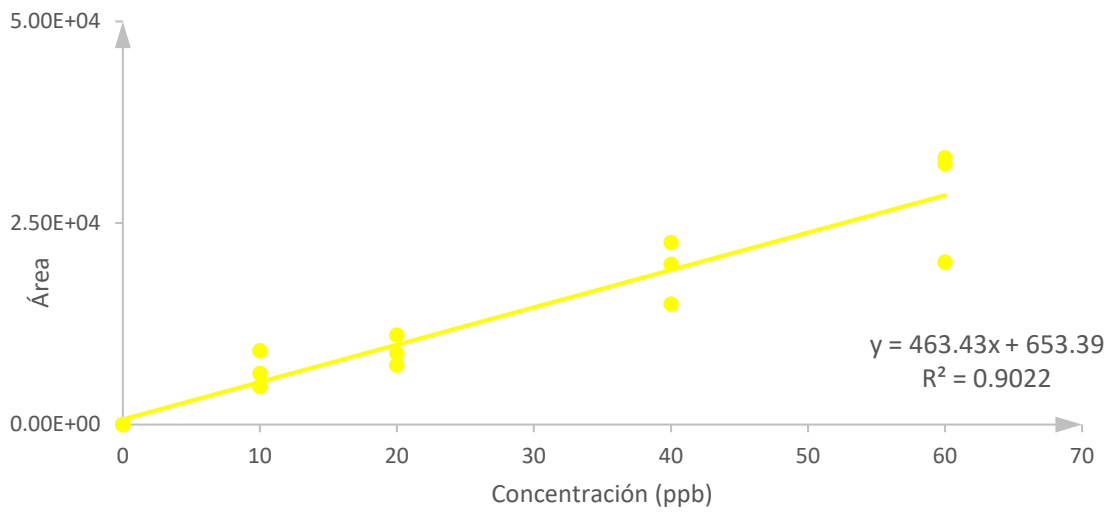
En este apartado se muestran las curvas de calibración y las ecuaciones de la recta de cada esteroide.



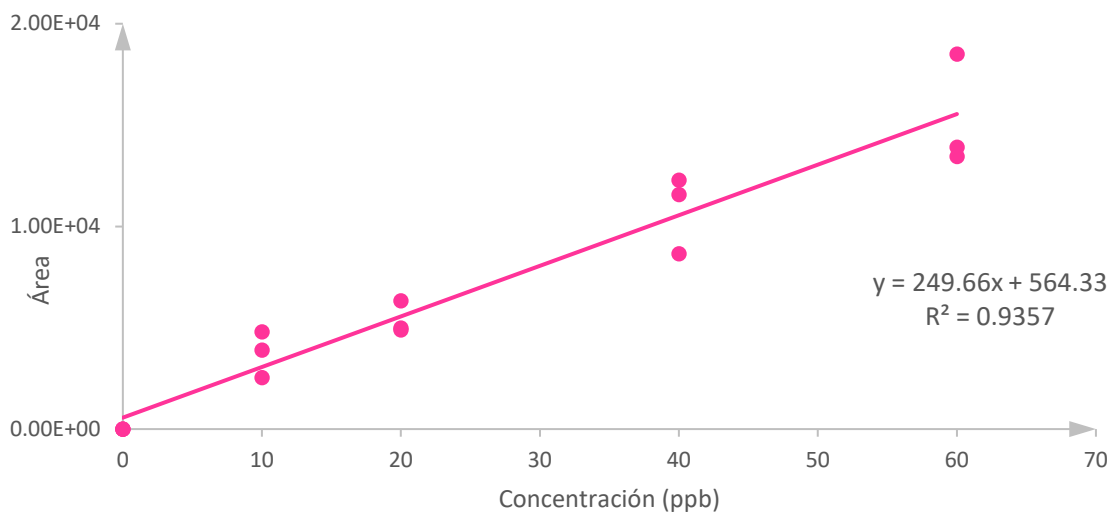
Gráfica 7. Curva de calibración del estradiol.



Gráfica 8. Curva de calibración del mestranol.



Gráfica 9. Curva de calibración del etinilestradiol.



Gráfica 10. Curva de calibración del estriol.

8.4 ANEXO 4.

Cromatogramas obtenidos por SIM de la segunda elución de la SPE de cada muestra.

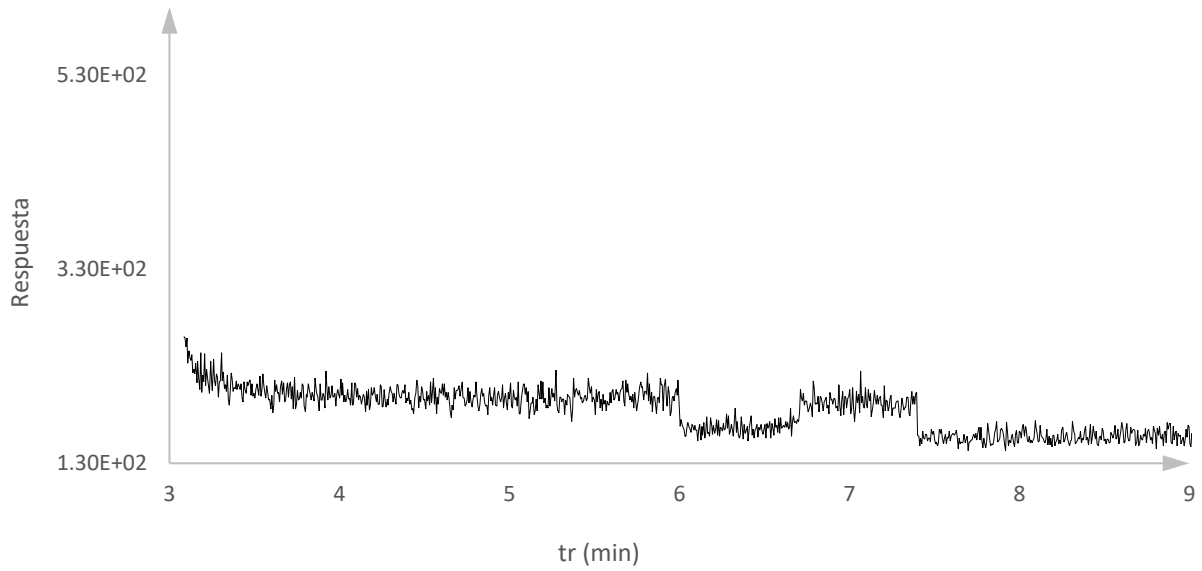


Figura 41. Cromatograma obtenido de la segunda elución de la muestra Tlamaco – Juandhó.

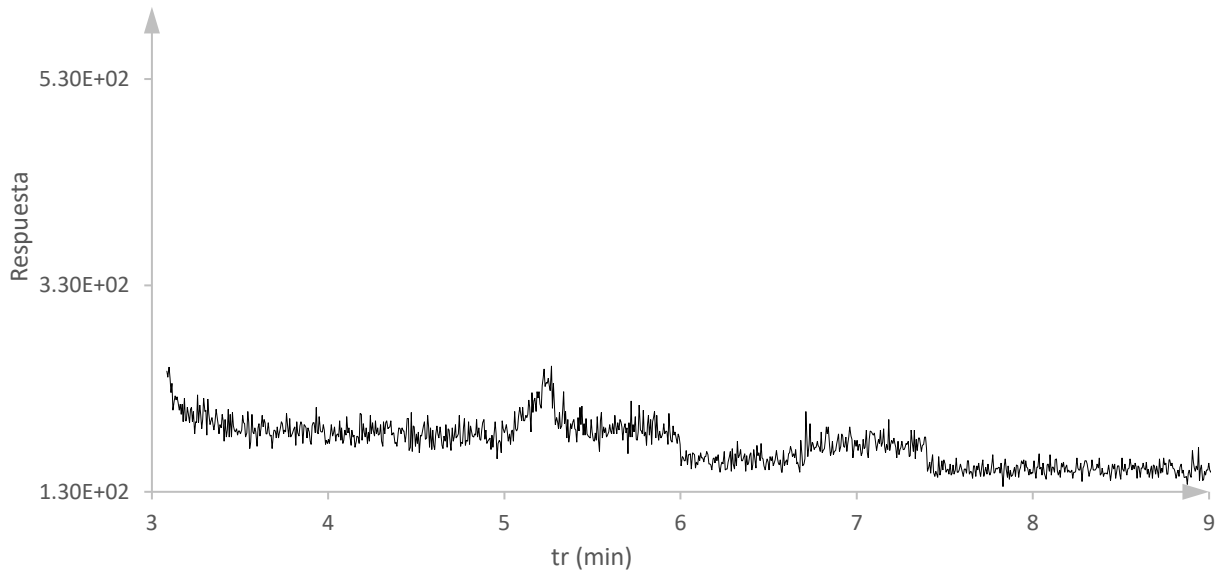


Figura 42. Cromatograma obtenido de la segunda elución de la muestra Dendhó.

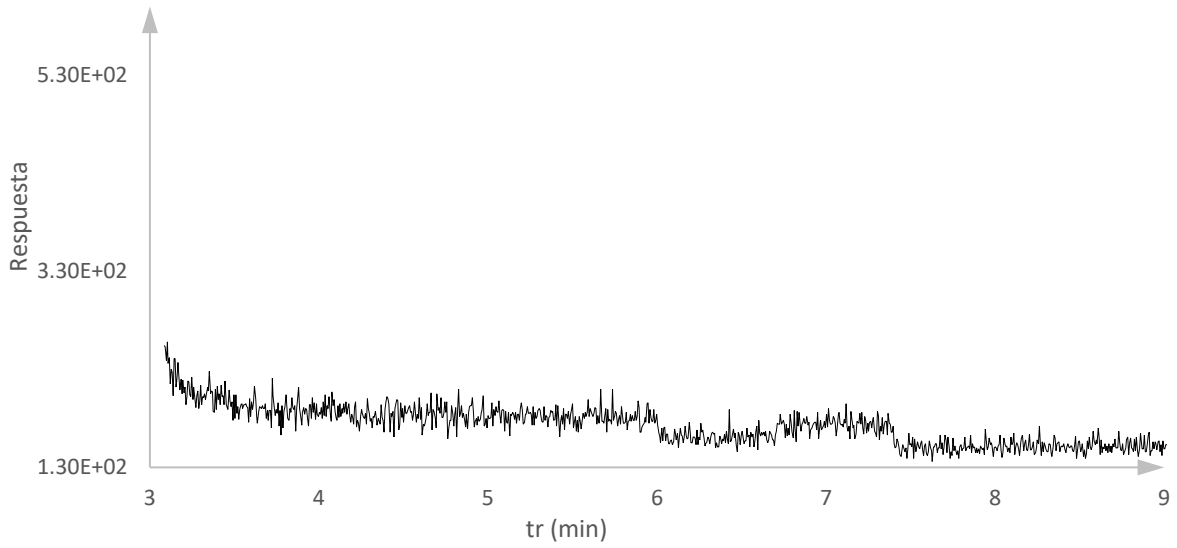


Figura 43. Cromatograma obtenido de la segunda elución de la muestra sifón Bojay.

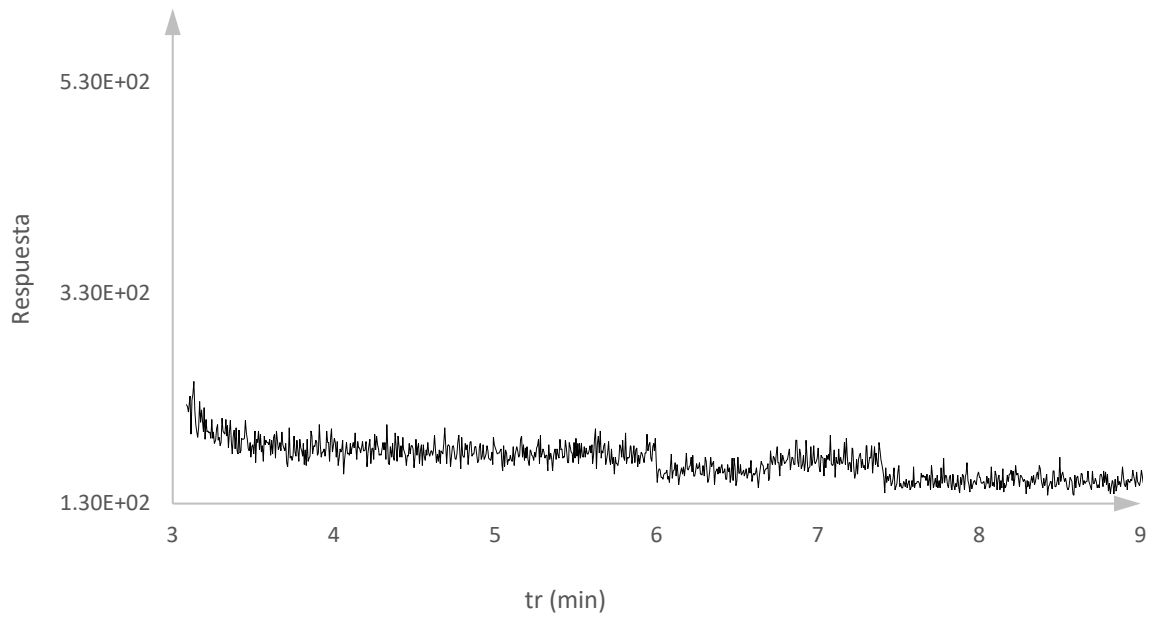


Figura 44. Cromatograma obtenido de la segunda elución de la muestra Cerro de la Cruz.