BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
INSTITUTO DE CIENCIAS
Centro de Química

"VALIDACIÓN DE MÉTODO CROMATÓGRAFICO PARA EL ANÁLISIS DE FÁRMACOS CON ESTRÓGENOS"

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADO EN FARMACIA

PRESENTA
JUAN CARLOS BONILLA SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DRA. L. ESMERALDA GARCÍA DÍAZ

ASESOR INTERNO:
M.C. MARCO ANTONIO GONZÁLEZ CORONEL

Puebla 2015

Dedicatorias

- A la persona que siempre soñó con este momento pero lamentablemente Dios le tenía unisión especial en el cielo, pero siempre ha estado en mi corazón para darme la fuerza y salir adelante hoy día tengo presente todos los consejos que me diste gracias mamá y espero que estés feliz por un logro que tu iniciaste.

- A mis padres Juan y Rocío por ser un pilar importante en mi vida estar siempre en las buenas y malas, por luchar todos los días para cumplir con todas mis necesidades y por ser mi ejemplo a seguir.

- A mis hermanas Guadalupe y Nancy que realizaron una enorme labor como maestras y guías por demostrarme que en la vida se gana con esfuerzo y dedicación.

- A todos mis ahijados que son mi motor por seguirme superando.

- A las dos personas que estuvieron en todo momento de mi carrera a lado mío, Anahí y Maricruz.

- A la persona que se convirtió en una amiga y guía la cual me enseño que la vida no es fácil pero con esfuerzo uno puede realizar lo que le gusta Mtra. Reina.

AGRADECIMIENTOS

A los integrantes de la Comisión Revisora y miembros del Jurado

1 Dra. María de la Paz Elizalde González	Centro de Química ICUAP
2 Dr. Alfonso Daniel Díaz Fonseca	Fac. de Cs. Químicas de la BUAP
3 QFB María Reina Jurado Andrade	Fac. de Cs. Químicas de la BUAP

A los profesores que colaboraron en el desarrollo del presente trabajo

A la Dra. Lidia Esmeralda García Díaz, directora de esta tesis por la dedicación, apoyo y tolerancia, por compartir su conocimiento y experiencia profesional en el desarrollo de este trabajo, y principalmente la mejora de mi desarrollo profesional.

Al M.C. Marco Antonio González Coronel, asesor de esta tesis, por siempre estar con la mejor disposición y actitud para contribuir con la mejora del trabajo y la de un servidor.

A mi compañera y amiga Anahí Hernández García por la ayuda y formar parte del inicio de este proyecto.

Al Dr. Cesar Nieto Delgado por el tiempo dedicado a la mejora de mis conocimientos.

A la Dra. María de la paz por darme la oportunidad y confianza de pertenecer a uno de los equipos más importantes de la universidad el de adsorción y cromatografía.

A los compañeros y amigos Hilda, Maricruz, Anahí, Jessica, Mario, Alba del Laboratorio de Adsorción y Cromatografía, por brindarme su amistad, apoyo y compartir su conocimiento.

Esta tesis se desarrolló en el Laboratorio de Adsorción y Cromatografía del

Centro de Química del ICUAP

Agradezco a mis amigos

Jessi, Andy, Gaby E, Wendy, Anita, Dulce, Angie, Ivonee, Benja y Jobo

Por compartir los momentos más importantes de mi carrera y darme el apoyo cundo lo he necesitado.

COMUNICACIONES DERIVADAS

- Aplicación de la HPLC en la adsorción simultánea de estradiol y algestona sobre carbón activado.
  - XXVII Congreso Nacional de Química Analítica, Puebla, Puebla. Mex. Junio 2014.
  - Seminario del grupo académico Química Física Básica y Aplicada, Instituto de Ciencias de la BUAP, Puebla, Puebla. Mex. Septiembre 2014.
  - Segundo encuentro con la Calorimetría, Facultad de Ciencias Químicas, Puebla, Puebla. Mex. Noviembre 2014.

- Validación de métodos cromatográficos para el análisis de fármacos con estrógenos, Seminario del grupo académico Química Física Básica y Aplicada, Instituto de Ciencias de la BUAP, Puebla, Puebla. Mex. Octubre 2014.

RESUMEN

En el presente trabajo se demostró la importancia y aplicación de un método analítico desarrollado y validado para el análisis cualitativo y cuantitativo de fármacos estrogénicos. Para la validación del método cromatográfico se siguió la normativa vigente del país y se determinaron los parámetros de selectividad, linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad y robustez en el análisis de los estrógenos: α-etinilestradiol, β-estradiol, benzoato de estradiol y progesterona. Los estrógenos son disruptores endocrinos capaces de alterar el equilibrio hormonal de los organismos. Actualmente representan un problema a nivel mundial pues se encuentran en aguas de ríos y océanos afectando a la población acuática. En la segunda parte de este trabajo se realizó la adsorción en carbón de los componentes del medicamento Perlutal® (Enantato de estradiol y Acetofénido de algestona) como alternativa de eliminación de estrógenos en disolución acuosa. Utilizando HPLC se determinaron las concentraciones de equilibrio para el estudio de la cinética e isoterma de adsorción de los estrógenos. Por último se realizó el análisis de los productos de degradación de Estronol® con una antigüedad aproximadamente de 20 años empleando un detector QTOF-MS, se determinaron las masas de subproductos y se evaluaron los posibles cambios que sufrieron los fármacos.

INDICE

	Pág.
Objetivos	1
Hipótesis	1
Introducción	2
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	
1.1. Cromatografía	3
1.2. Cromatografía liquida de alto rendimiento (CLAR)	4
1.2.1. Detectores	5
1.3. Validación de métodos cromatográficos	6
1.4. Estrógenos	7
1.4.1. Estrógenos como contaminantes emergentes	9
CAPÍTULO II. PARTE EXPERIMENTAL	
2.1. Extracción de principios activos	14
2.2. Métodos cromatográficos	14
2.3. Validación de método cromatográfico	15
2.3.1. Linealidad	15
2.3.2. Precisión	15
2.3.3. Exactitud	16
2.3.4. Sensibilidad	17
2.3.5. Robustez	18
2.4. Caracterización del adsorbente	19
2.4.1. Punto de carga cero	19
2.4.2. Isotermas de adsorción en nitrógeno	19
2.5. Experimentos de adsorción	19
CAPÍTULO III. RESULTADOS	
3.1. Validación de método cromatográfico	21
3.1.1. Selectividad	21
3.1.2. Linealidad	22

3.1.3. Precisión 23
3.1.4. Exactitud 24
3.1.5. Sensibilidad 25
3.1.6. Robustez 25
3.2. Adsorción de Perlutal® en carbón 26
3.3. Análisis de productos de degradación de Estronol® 29
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES 32
CAPÍTULO V. BIBLIOGRAFÍA 33
ANEXOS 37

Lista de abreviaturas

α	Selectividad
BET	Brunauer, Emmett y Teller
BJH	Barret-Joyner-Halenda
CBG	Globulina enlazante de corticoesteroides
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
DAD	Detector de arreglo de diodos
ERE	Elementos de reacción de estrógenos
FEUM	Farmacopea de las Estados Unidos Mexicanos
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
ICH	The Internacional Conference on Harmonisation of Techinical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
ISSTE	Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH_{pzc}	pH del punto de carga cero
RSD	Desviación estándar relativa
S_{BET}	Superficie específica calculada a partir de la ecuación de BET
SSA	Secretaría de Salud
TBG	Globulina fijadora de testosterona y estrógeno
TOF	Tiempo de vuelo (time of fly)
tr	Tiempo de retención
USP	United States Pharmacopeia
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
Vtg	Vitelogenina

Nomenclatura

Símbolo	Descripción
a	Cantidad adsorbida
a_e	Cantidad adsorbida en el equilibrio
a_m	Capacidad de saturación
C_0	Concentración inicial
C_f	Concentración final
C_{eq}	Concentración en equilibrio
d_p	Diámetro de poro
H	Altura de plato teórico
k'	Factor de capacidad
K_1	Constante de velocidad de adsorción de *pseudo*-primer orden.
K_H	Constante de Henry
m	Masa del adsorbente
N	Número de platos teóricos
R	Resolución
r^2	Coeficiente de determinación lineal
s	Desviación estándar
t	Tiempo
V	Volumen

Lista de Figuras

Número	Título de la Figura	Pág.
1.1	Esquema de un cromatógrafo de líquidos	5
1.2	Mecanismo de acción general de los estrógenos	8
2.1	Esquema general de la parte experimental	13
2.2	Esquema de los límites de detección y cuantificación	17
3.1	Cromatograma de muestras y estándares de Estronol® y mezcla de estrógenos α-etinilestradiol y β-estradiol Espectros UV-Vis de los componentes de las mezclas	22
3.2	Curva de calibración de los componentes de Estronol® y mezcla de estrógenos	23
3.3	Isoterma de adsorción de N_2	27
3.4	Cromatograma DAD-HPLC de una disolución acuosa de Perlutal®, espectros UV de los picos correspondientes a algestona y estradiol	27
3.5	Cinética de adsorción de Algestona y Estradiol	28
3.6	Isoterma de adsorción de Algestona y Estradiol	29
3.7	Cromatograma de Estronol® en el análisis HPLC-MS	30

Lista de tablas

Número	Título de la Tabla	Pág.
1.1	Parámetros de validación de un método analítico en las diferentes normas internacionales	7
1.2	Principales estrógenos usados en el sector salud y medicamentos que lo contienen	10
1.3	Concentraciones de estrógenos en diferentes países	11
2.1	Condiciones de los métodos cromatográfico por CLAR	14
3.1	Desempeño del sistema en los estrógenos	21
3.2	Parámetros estadísticos de linealidad	23
3.3	Precisión del método para cada uno de los estrógenos	24
3.4	Parámetros para evaluar la exactitud del método	24
3.5	Determinación de la sensibilidad del método para el análisis de estrógenos	25
3.6	Parámetros para evaluar la robustez del método cromatográficos utilizado en la separación de α-etinilestradiol y β-estradiol	26
3.7	Posibles productos de degradación de benzoato de estradiol y progesterona determinados por HPLC-QTOF-MS ionización en modo positivo	31

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar un método cromatográfico por CLAR para el análisis de medicamentos que contienen estrógenos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar un método cromatográfico con lo establecido en la norma NOM-059-SSA1-2013 Buenas prácticas de fabricación de medicamentos y FEUM en su undécima edición.
- Aplicar el método validado en el análisis de la cinética y el equilibrio de adsorción de Acetofénido de Algestona y Enantato de Estradiol en carbón activado.
- Identificar los posibles productos de degradación de estrógenos.

HIPÓTESIS

El desarrollo y validación de un método cromatográfico permitirá la determinación de estrógenos en fármacos y en matrices de interés medioambiental.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad la atención se ha centrado en la contaminación en lagos y ríos de todo el mundo, proveniente de las aguas residuales de las grandes ciudades que contienen principalmente sustancias derivadas de la actividad antropogénica.

Una investigación realizada por la UNAM en aguas residuales de la ciudad de México arrojó que los estrógenos se encuentran en concentraciones entre 1-400 ng L^{-1}. Los estrógenos son los principales disruptores endocrinos que generan un efecto tóxico como modificaciones en la función endocrina reproductiva de los peces [1].

La demanda a nivel mundial de medicamentos con principio activo de estrógenos ha aumentado considerablemente debido a que es el método anticonceptivo más utilizado. En México la COFEPRIS (con base en la FEUM) es la instancia encargada de vigilar que los medicamentos cumplan con todos los lineamentos para su venta. La FEUM (hasta su edición 2014) carece de un método validado para realizar un análisis cualitativo y cuantitativo de fármacos con estrógenos y por ello es importante proponer metodologías para su análisis.

En este trabajo se desarrolló un método analítico por CLAR para el estudio de fármacos con estrógenos que cumple con los parámetros establecidos para ser aceptado en la normativa del país. También se estudió la adsorción de dos estrógenos sobre carbón como alternativa de eliminación de estos contaminantes emergentes. Por último con un detector de masas se estudiaron los productos de degradación de un medicamento caduco.

CAPÍTULO I
ANTECEDENTES:

1.1. Cromatografía.

La Cromatografía es usada primariamente para la separación de los componentes de una muestra que se distribuyen en una fase estacionaria y una fase móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido retenido sobre un sólido o un gel que se encuentra extendido como una capa o distribuido a modo de una película, la fase móvil puede ser líquida o gaseosa [2].

Los métodos cromatógraficos se pueden clasificar de acuerdo con la naturaleza de la fase estacionaria y móvil. Si la fase estacionaria es un sólido el proceso se denomina cromatografía de adsorción, mientras que si es un líquido, se le llama cromatografía de partición. La diferencia entre ellas se atribuye a la naturaleza de las fuerzas que influyen en la distribución de los solutos entre las dos fases [3].

En la cromatografía de adsorción, la fase móvil que contiene los solutos disueltos pasan a través de la fase estacionaria. La retención de los componentes y su consiguiente separación depende de la capacidad para ser adsorbidos por la fase estacionaria. Si la fase móvil es un líquido, el proceso se denomina cromatografía de líquidos pero, si la fase móvil es un gas se llama cromatografía gases [4].

En la cromatografía de partición un material solido inerte tal como el gel de sílice, la tierra de diatomeas o aun las paredes de la columna misma, sirven para sostener una capa delgada de líquido, la cual es la fase estacionaria efectiva. A medida que la fase móvil que contiene los solutos avanza se produce la retención y separación, a causa de la solubilidad relativa de los componentes analizados según sus coeficientes de partición. Si la fase móvil es un líquido esta cromatografía se denomina líquido-líquido y si es un gas, el proceso se llama gas-liquido [5].

En la cromatografía de intercambio iónico, la cromatografía de exclusión y la cromatografía de afinidad, la fase estacionaria es un sólido. Se clasifican de manera diferente de la cromatografía liquido-sólido y gas-solido debido a la naturaleza exclusiva de sus procesos de separación [6].

La cromatografía líquida se ha convertido en una de las técnicas más utilizadas debido a la capacidad para obtener separaciones de alta resolución. Se pueden desarrollar separaciones basadas en características diversas como la polaridad de los solutos, naturaleza iónica, peso molecular, coeficiente de partición o capacidad para formar complejos de afinidad [7]. Se puede utilizar la cromatografía de columna abierta, donde la fase móvil fluye por gravedad a través de una columna empacada (cromatografía preparativa). En la cromatografía líquida de alto rendimiento CLAR (HPLC por sus siglas en inglés) la fase móvil pasa a alta presión a través de la columna empacada con partículas de 10 µm de diámetro o menos y la separación depende principalmente de la naturaleza de la fase estacionaria. La CLAR puede ser de adsorción, partición, intercambio iónico, de exclusión de tamaño y de afinidad [8].

1.2 Cromatografía Liquida de Alto Rendimiento (CLAR).

En la figura 1 se muestra el diagrama en bloque de un cromatógrafo que está constituido por:

1. Reservorio de solvente que alimenta al sistema con la fase móvil.
2. Inyector que permite la introducción de la muestra.
3. Bomba que suministra la muestra y fase móvil a través de la columna.
4. Detector de monitoreo de la solución que emerge de la columna.
5. Sistema de registro de los datos provenientes del detector.

La señal del detector es analógica y puede ser utilizada tal cual por un registrador gráfico o ser digitalizada para ser interpretada y procesada por una computadora.

Como resultado del análisis cromatográfico se obtiene un gráfico (el cromatograma) que relaciona la señal en función del tiempo y un eluido o eluato, que proviene de la columna y puede recolectarse en forma secuencial o escalonada (manualmente o un colector de fracciones) para obtener los componentes separados de las muestras.

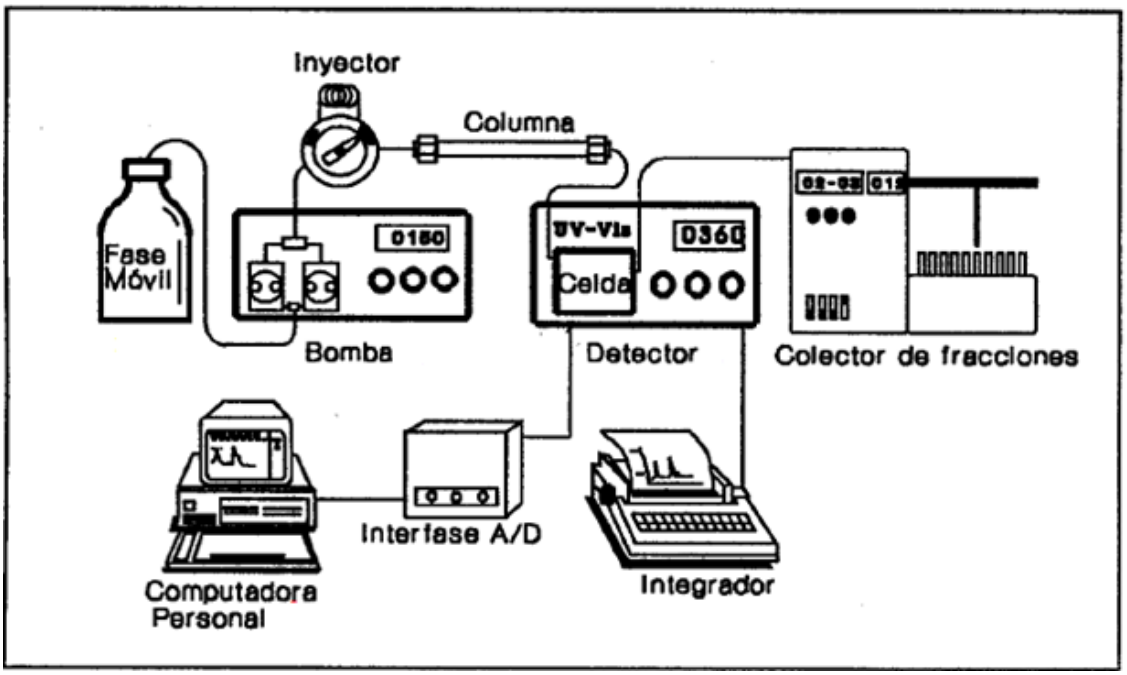


Figura1. Esquema de un cromatógrafo de líquidos.

1.2.1 Detectores.

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite ubicar en tiempo la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica. Los detectores en general miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación de la fase móvil pura por ejemplo el detector de índice de refracción y el de conductividad. Los selectivos son sensibles a alguna propiedad del soluto como el detector UV y fluorescencia [9].

En este trabajo se utilizaron los detectores de UV-DAD y masas. El primero permite monitorear a distintas longitudes de onda de cada uno de los componentes separados. En él se determina la mejor longitud de onda a la que debe monitorear el compuesto de interés [10]. Mientras que la espectrofotometría de masas está basada en la obtención de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa. Una vez obtenidos estos iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga [11]. Los compuestos separados inicialmente por CLAR ingresan al espectrómetro de masas donde se obtiene la información del ion más abundante en función de la relación masa/carga, con la que se puede elucidar la estructura del analito [12].

1.3 Validación de métodos cromatográficos.

Para el desarrollo farmacéutico de un nuevo medicamento y los existentes en el mercado, es imprescindible contar con un método analítico que permita cuantificar el principio activo de la formulación. Los métodos se validan con el objetivo de calcular la incertidumbre de los resultados dentro de las especificaciones de identificación y cuantificación del principio activo que compone al medicamento [13].

Para asegurar la eficacia y seguridad de un producto farmacéutico en todas las etapas de vida útil (almacenamiento, distribución y venta) es necesario realizar un control analítico, con métodos validados para la elaboración del producto.

Para el cumplimiento de las buenas prácticas de fabricación de medicamentos (NOM-059-SSA1-2013) [14] la validación es un requisito indispensable que está establecido por las autoridades regulatorias y por las comisiones de farmacopeas para el registro de medicamentos. Cualquier deficiencia puede originar problemas sanitarios, como el retiro del medicamento del mercado e incluso del cierre del laboratorio fabricante.

La validación proporciona un alto grado de confianza y seguridad en el método analítico y en la calidad de los resultados, disminuye fallas y repeticiones, con el consiguiente ahorro de los costos asociados.

Las características de desempeño analítico que deben considerarse en la validación de un método se han definido en diferentes comités nacionales e internacionales. Representantes de la industria y los organismos reguladores de los Estados Unidos, Europa, Japón y México han estandarizado los parámetros de validación (tabla 1.1) a través de la USP, ICH, ISO 17025 y FEUM respectivamente [15].

Tabla 1.1. Parámetros para la validación de un método analítico en las diferentes normas internacionales.

Parámetro	Referencia
Especificidad	USP, ICH
Selectividad	ISO 17025, USP, ICH, FEUM
Precisión	ISO 17025, USP, ICH, FEUM
Exactitud	ISO 17025, USP, ICH, FEUM
Linealidad	ISO 17025, USP, ICH, FEUM
Rango	USP, ICH
Límite de detección	ISO 17025, USP, ICH, FEUM
Límite de cuantificación	ISO 17025, USP, ICH, FEUM
Robustez	ISO 17025, USP, ICH
Tolerancia	ICH

1.4 Estrógenos.

Los estrógenos son hormonas esteroideas derivadas del ciclopentanoperhidro-fenantreno, producidas por los ovarios o de origen sintético [16]. Actúan sobre el desarrollo, mantenimiento y funciones de los órganos reproductores femeninos, los ciclos de actividad sexual y las características sexuales secundarias femeninas. Tienen efectos metabólicos generales como el aumento de la lipogénesis en el tejido adiposo que podría ser un marcador de diferencia en la forma corporal y distribución de grasas en las mujeres.

Los estrógenos aumentan la síntesis de un conjunto de proteínas a través del hígado, entre las que se encuentran la transferina, ceruloplasmina y las proteínas fijadoras transcortina o globulina enlazante de corticoesteroides (CBG) y globulina fijadora de testosterona y estrógeno (TBG) [17]. También influyen sobre el sistema cardiovascular, favorecen la disminución del tiempo de coagulación de la sangre y un aumento en el número de plaquetas.

A los estrógenos y gonadotropinas hipofisiarias se deben los ciclos menstruales de la mujer. Los estrógenos promueven el crecimiento sobre las células del útero, vagina,

glándula mamaria y de los folículos de Graaf del ovario y favorecen en el útero y glándula mamaria la síntesis de receptores de progesterona que son necesarios para que estos tejidos respondan a la misma [18].

Los estrógenos, al igual que otras hormonas esteroidales, actúan principalmente por medio de regulación de la expresión de genes. Los receptores de estrógenos se encuentran en las vías reproductoras femeninas, mamas, la hipófisis, el hipotálamo, hueso, hígado y otros órganos, así como en diversos tejidos en varones. El receptor interactúa con secuencias de nucleótido específicas denominadas elementos de reacción a estrógenos (ERE) presentes en genes precondicionados y esta interacción determina la transcripción de genes regulados por hormonas. Ello proporciona un mecanismo mediante el cual las señales provenientes de estrógenos y otros compuestos convergen en sitios genómicos comunes para integrar respuestas celulares a múltiples estímulos (Fig. 1.2) [19].

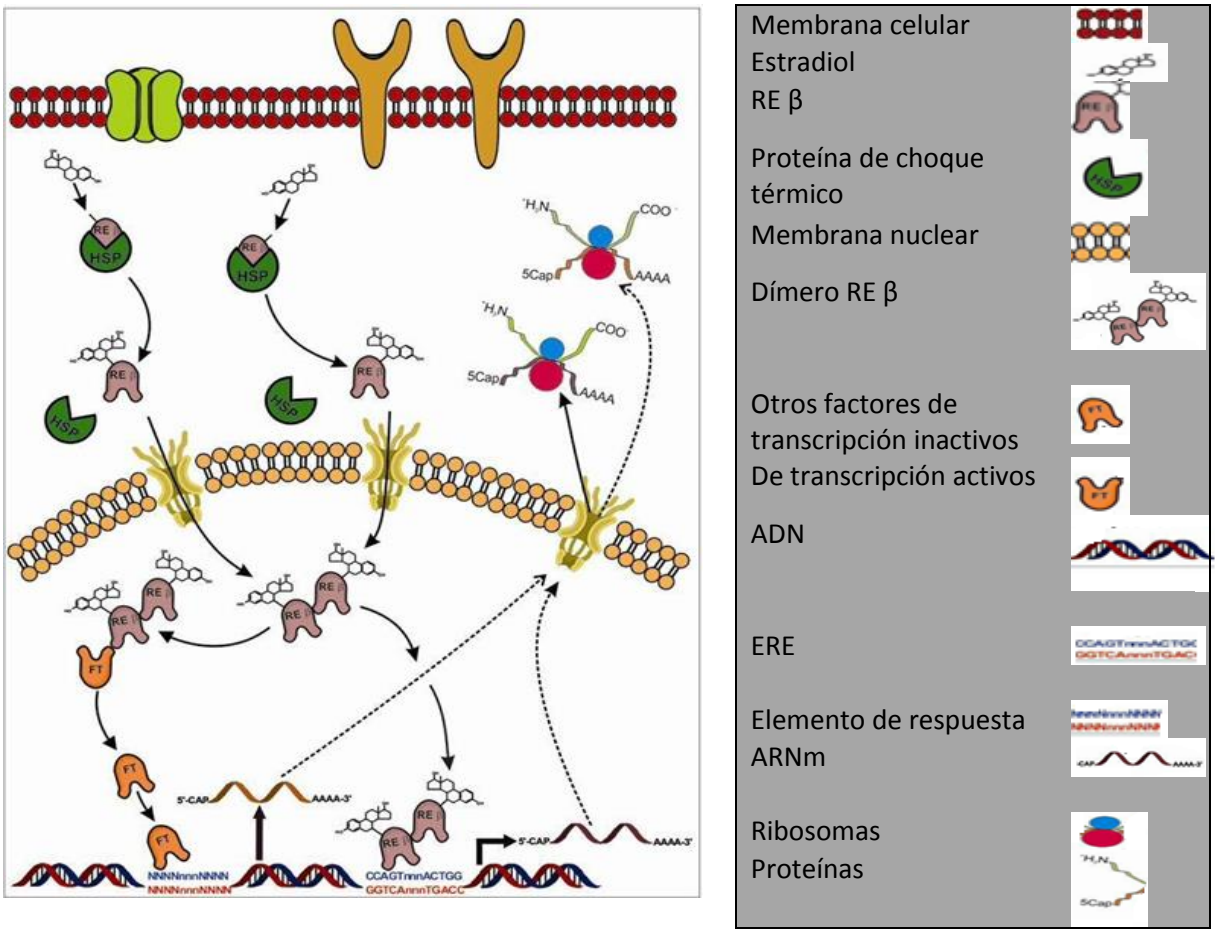


Fig. 1.2 Mecanismo de acción general de los estrógenos [20].

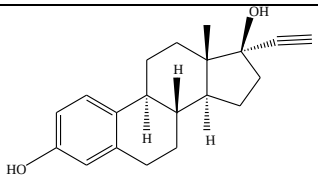
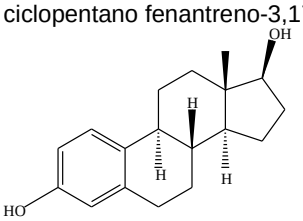
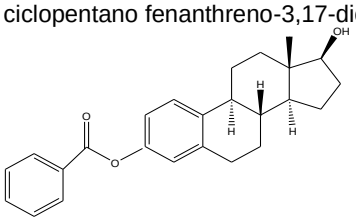
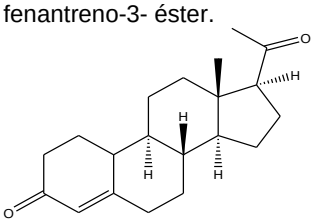
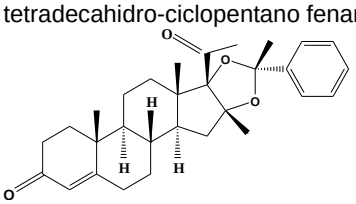
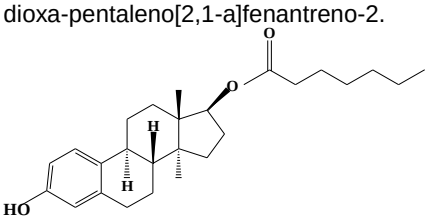
1.4.1. Estrógenos como contaminantes emergentes.

Datos de la OMS revelan que alrededor de 60 millones de mujeres en todo el mundo utilizan la anticoncepción hormonal oral para regular su fertilidad [21]. En México diversos medicamentos con estrógenos son parte del cuadro básico de instituciones públicas como la SSA, el ISSSTE y el IMSS [22]. En la tabla 1.2 se muestran los principales fármacos estrogénicos y los medicamentos que lo contienen. Una vez que los estrógenos cumplen con su función en el organismo son excretados vía orina [23] y van directamente a las aguas residuales domésticas. El uso masivo de los anticonceptivos ha provocado que los estrógenos estén presentes en cuerpos de agua [24] y representan un contaminante del grupo de los disruptores endocrinos naturales y artificiales. En pocos países se ha establecido el límite máximo de concentración de estrógenos en aguas residuales. En la tabla 1.3 se muestran las concentraciones de estrógenos encontradas en aguas residuales en diferentes países [25]. Otra importante fuente de contaminación de estrógenos es la industria avícola, en aguas no tratadas de las lavadoras de huevo se han detectado hasta 10 ng L^{-1} [26]. Ashford y col. [27] demostraron que los estrógenos no pueden eliminarse mediante los procesos de una planta de tratamiento convencional. Concentraciones bajas del orden de ng pueden tener efectos perturbadores en el sistema endocrino de los organismos acuáticos como disminución de la fertilidad, feminización y hermafroditismo [28]. Estudios recientes han demostrado que la presencia de estas sustancias en el ambiente afecta el sistema reproductivo e inmunológico de los seres humanos [29].

Dado que la fisiología reproductiva de vertebrados es similar en estructura y función, los estrógenos tienen efectos similares en los peces a los observados en los humanos sin embargo, los peces tienen algunos aspectos reproductivos que pueden causar que respondan de una manera diferente a los estrógenos, como la secreción de GnRH que cambia en respuesta a señales del ambiente [30]. Se ha demostrado que durante una etapa de diferenciación sexual, la expresión de genes es regulada por factores epigenéticos como la temperatura y otros factores ambientales, con efectos en la diferenciación gonadal y de estructuras sexuales secundarias [31].

En hembras de especies de peces ovíparos la producción de vitelogenina (Vtg), precursor proteico del vitelo, es un proceso crítico para el éxito reproductivo.

Tabla 1.2. Principales estrógenos usados en el sector salud y medicamentos que lo contienen.

ESTRÓGENO	MOLÉCULA	MEDICAMENTOS QUE LOS CONTIENEN
α-etinilestradiol	 17-Etil-13-metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopentano fenantreno-3,17-diol.	BELARA DIANEEVRA GYNOVIN ILIMIT MARVELON MERCILON MICROGYNON CD
β-estradiol	 13-Metil-7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopentano fenanthreno-3,17-diol.	ESSVENTIA ESTREVA EVOREL JUVENUM E OESTRROGEL PRIMOGYN
Benzoato de estradiol	 ácido benzoico-17-hIdroxi-13-methil 7,8,9,11,12,13,14,15,16,17-decahidro-6H-ciclopentano fenantreno-3- éster.	**ESTRONOL** METRIGEN FUERTE SYNTEX PROGER-F ESTRADIOL OVER PRIMOSON-F EMEFUR
Progesterona	 17-Acetil-13-methil-1,2,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-tetradecahidro-ciclopentano fenantreno-3.	**ESTRONOL** CRINONE CUERPO AMARILLO FUERTE GESLUTIN PREMASTAN PROSPHERE TROGESTAN
Acetoténido de Algestona	 6b-Etil-4a,6a,8,9a-tetrametil-8-fenil-3,4,4a,4b,5,6,6a,6b,9a,10,10a,10b,11,12-tetradecahidro-7,9-dioxa-pentaleno[2,1-a]fenantreno-2.	**PERLUTAL** PATECTOR PERLUDIL PATECTOR N.F. YECTAMES
Enantato de Estradiol	 (17β)-3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17-il heptano.	**PERLUTAL** PATECTOR NOVULAR DIVINA PERLUDIL

Normalmente las hembras maduras producen estrógenos suficientes para inducir la vitelogénesis, pero la exposición a químicos estrogénicos en el ambiente provoca respuestas negativas en machos de peces adultos y jóvenes.

Los peces machos capturados en las cercanías de plantas de tratamiento de aguas residuales presentan características sexuales masculinas y femeninas, además producen Vtg en el hígado, una proteína sintetizada normalmente por las hembras como respuesta a una señal estrogénica [32].

Los impactos ecológicos de estas hormonas naturales y sintéticas son una preocupación cada vez mayor y se han convertido recientemente en el foco de la investigación científica [33,34].

Tabla .1.3. Concentraciones de estrógenos en diferentes países.

Lugar de muestreo	Concentración (ngL-1)			
Estrógeno	Estrona	Estradiol	Estriol	Etinilestradiol
Francia	1.1-30	1.4-3.2	1.0-25	1.1-2.9
Holanda	0.01-3.4	0.03-5.5	--------	0.1-4.3
Inglaterra	0.2-10	0.02-7.1	0.06-3.1	0.05
Alemania	1	0.3	----	0.5
Italia	1.5	0.11	0.33	0.04
España	4.3	6.3	8	8
Japón	0.2-6.6	0.6-1	5.5	------
EUA	---	0.05-0.8	---	0.05

Es crucial entender y predecir el destino de estas sustancias en los ecosistemas ambientales para aplicar procesos de eliminación adecuados, sin embargo las determinaciones analíticas son un reto importante debido a las bajas concentraciones de estos compuestos.

Una de las técnicas más empleadas en la eliminación de contaminantes en disolución acuosa es la adsorción. El carbón obtenido a partir de residuos agrícolas se ha utilizado como adsorbente, ya que posee propiedades físico-químicas que lo hacen de este un material apto para la eliminación de sustancias contaminantes del agua [35]. Las propiedades texturales como la superficie específica, porosidad, distribución de tamaño de poro y grupos funcionales superficiales determinan muchas veces la aplicación del carbón. En general, los microporos le confieren la elevada superficie y capacidad de retención, mientras que los mesoporos y macroporos son necesarios para retener moléculas de gran tamaño, favorecer el acceso y la rápida difusión de las moléculas a la superficie interna del sólido.

CAPÍTULO II

PARTE EXPERIMENTAL.

Esta tesis comprende tres etapas que son mostradas en la Fig. 2.1. En la primera se validó un método cromatográfico por CLAR para 4 estrógenos. La segunda comprende la adsorción de Enantato de Estradiol y Acetofénido de Algestona sobre carbón activado y por último un análisis realizado por HPLC-QTOF-MS a un medicamento después de su fecha de caducidad (Estronol®).

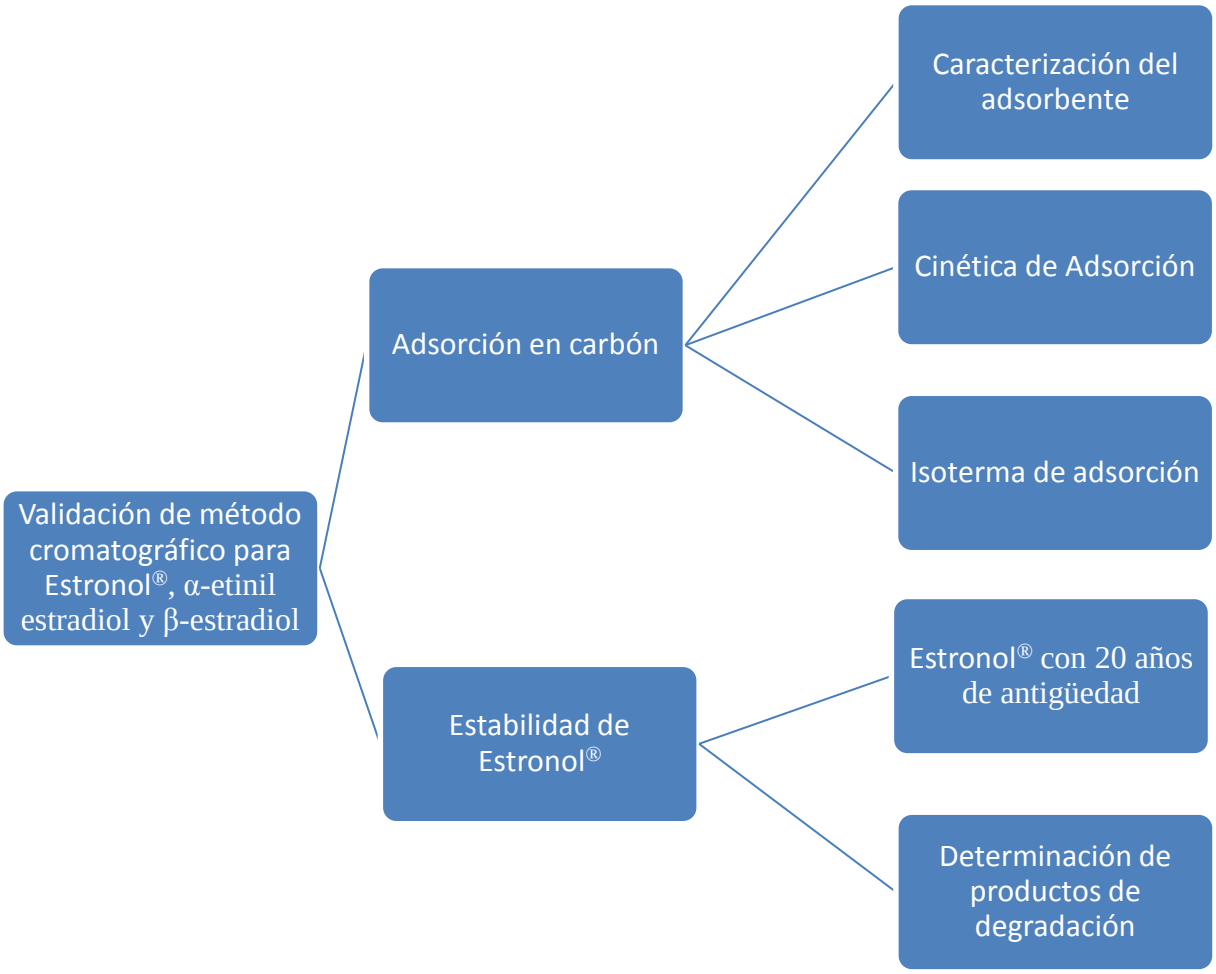


Fig.2.1 Esquema general de la parte experimental

2.1. Extracción de principios activos

Estronol® es un medicamento utilizado para los trastornos del ciclo menstrual que contiene 5 mg de benzoato de Estradiol y 50 mg de progesterona contenidos en una ampolleta con aceite de sésamo cbp. 1 ml como vehículo.

Para obtener los principios activos del medicamento se tomó un equivalente a 20 mg de progesterona y se adicionaron 20 ml de metanol en agitación orbital por 5 minutos, posteriormente se centrifugó por 15 minutos a 3000 rpm. Después de la separación la muestra se pasó por un filtro de celulosa (syringe 45 µm). La concentración final de progesterona fue de 1 $mgmL^{-1}$.

2.2 Métodos Cromatográficos

En la Tabla 2.1 se muestran los parámetros cromatográficos que fueron utilizados para el análisis de 6 estrógenos.

Tabla 2.1 Condiciones de los métodos cromatográfico por CLAR.

Variable	Estronol®	α-etinilestradiol β-estradiol	Perlutal®
Columna	Phenomenex Synergi 4u Fusion 150x4.6mm	Phenomenex Synergi 4u Fusion 150x4.6mm	Beckman Ultrasphere octyl (4.6mm x 15cm)
pH	3.5	3.5	4.5
Vel. Flujo	1 mL min^{-1}	1 mL min^{-1}	1.5 mL min^{-1}
Vol. de inyección	25 µL	20 µL	25 µL
Fase móvil	A: 20% H_2O + 1% CH_3COOH B: 80% ACN	A: 40% H_2O + 1% CH_3COOH B: 60% ACN	A: 15% H_2O B: 85% ACN
Detector	UV-Vis λ= 240nm QTOF-MS	UV-Vis λ= 275nm	UV-Vis λ= 230nm
Equipo	Agilent 1260	Agilent 1260 Beckman Gold	Beckman Gold

Las condiciones del detector QTOF-MS para el análisis de Estronol® fueron las siguientes: polaridad positiva, temperatura del gas de secado 350°C, flujo del gas 11

$Lmin^{-1}$, presión del nebulizador 60 psi, voltaje del capilar de 3500 V, voltaje del fragmentor 175 V, skimmer 65 V, octopolo 750 V.

Las masas obtenidas del análisis se representaron como los posibles fragmentos de las moléculas originales. Se calculó la exactitud de masa con la siguiente ecuación:

$$Exactitud\ de\ masa\ = \frac{m/z_{Calculada} - m/z_{Observada}}{m/z_{Calculada}} \times 10^6 \qquad (1)$$

2.3 Validación De Método Cromatográfico.

2.3.1 Linealidad.

A partir de los estándares de los estrógenos se realizaron 6 disoluciones en el intervalo de concentración de 10 a 200mg L^{-1}, seleccionado en función de las concentraciones contenidas en los medicamentos existentes en el mercado.

Las disoluciones se inyectaron por triplicado y se determinó la curva de regresión sobre los puntos individuales sin promediar por el método de mínimos cuadrados, usando el programa Origin Pro® 8.6 .

Se determinó el coeficiente de correlación (r^2) y se realizó un test estadístico, con el valor de t_r de Student con n-2 grados de libertad (ec.2) y se comparó con el valor de t_{tabla} para determinar la calidad del ajuste.

$$t_r = \frac{|r|\sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} \qquad (2)$$

2.3.2 Precisión

La precisión del método cromatográfico se evaluó mediante la desviación estándar relativa (RSD) de 6 inyecciones de la muestra. Esta evaluación corresponde a todo el procedimiento analítico, desde la preparación de la muestra hasta la medición del analito en el instrumento. El estimador (s) de la desviación estándar se calculó con:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n}(X-\overline{X})^2}{n-1}} \qquad (3)$$

donde n es el número de inyecciones cromatográficas, X es el valor medido en el ensayo i y $\overline{X}$ es el promedio de los datos. La desviación estándar relativa o coeficiente de variación se calculó como:

$$\mathrm{RSD} = \frac{S \cdot 100}{\overline{X}} \tag{4}$$

También se calcularon los límites de confianza de la siguiente manera:

$$\overline{X} - \frac{t_{v,\alpha} \cdot S}{\sqrt{n}} < \mu < \overline{X} + \frac{t_{v,\alpha} \cdot S}{\sqrt{n}} \tag{5}$$

donde $t_{v,\alpha}$ es el valor de Student, tabulado para n mediciones con v = n-1 grados de libertad y α= 0.01.

2.3.3. Exactitud

Se prepararon tres muestras con el 80, 100 y 120% de la concentración estimada de cada fármaco, y se analizaron por triplicado.

La exactitud se evaluó con los siguientes parámetros:

$$\text{Desviación: } B = \overline{X} - \widehat{X} \tag{6}$$

$$\text{Desviación Relativa: } B\% = \frac{B}{\overline{X}} \cdot 100 \tag{7}$$

$$\text{Recuperación: } R = \frac{\overline{X}}{\widehat{X}} \cdot 100 \tag{8}$$

donde $\overline{X}$ es el valor medio y $\widehat{X}$ el valor verdadero.

Para comprobar la exactitud del método se realizó la prueba de Student que establece que $t_{ob} < t_{tabla}$ donde t_{ob} se calculó con:

$$t_{ob} = \frac{|100 - R|\sqrt{n}}{RSD} \tag{9}$$

2.3.4 Sensibilidad.

Para obtener los límites de detección y cuantificación se utilizó el siguiente procedimiento [2]:

1. Se determinó la pendiente (b) de la curva de calibración (concentración vs respuesta). Para evaluar las muestras se prepararon tres disoluciones con una concentración menor a la utilizada en la curva de calibración y se analizaron por triplicado.
2. Se obtuvo otra curva de calibración para concentraciones bajas inyectando cada punto por triplicado y se hizo regresión lineal para determinar el intercepto (Y_{bl}).
3. Se determinó la desviación estándar correspondiente a cada concentración del punto 3, se graficó concentración vs desviación y con el ajuste a una línea recta se determinó el intercepto a la ordenada (S_{bl}) (desviación estándar del blanco).
4. Se calcularon los límites de detección y cuantificación con las ecuaciones:

$$\text{Límite de detección} = \frac{\mathbf{Y_{bl} + 3\ S_{bl}}}{\mathbf{b}} \qquad (10)$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{\mathbf{Y_{bl} + 10\ S_{bl}}}{\mathbf{b}} \qquad (11)$$

El límite de detección es la concentración inyectada que resulta en un pico con una altura por lo menos dos o tres veces tan alta como la línea base a nivel de ruido, mientras que en el límite de cuantificación la señal/ruido es de 10: 1 (Fig. 2.2).

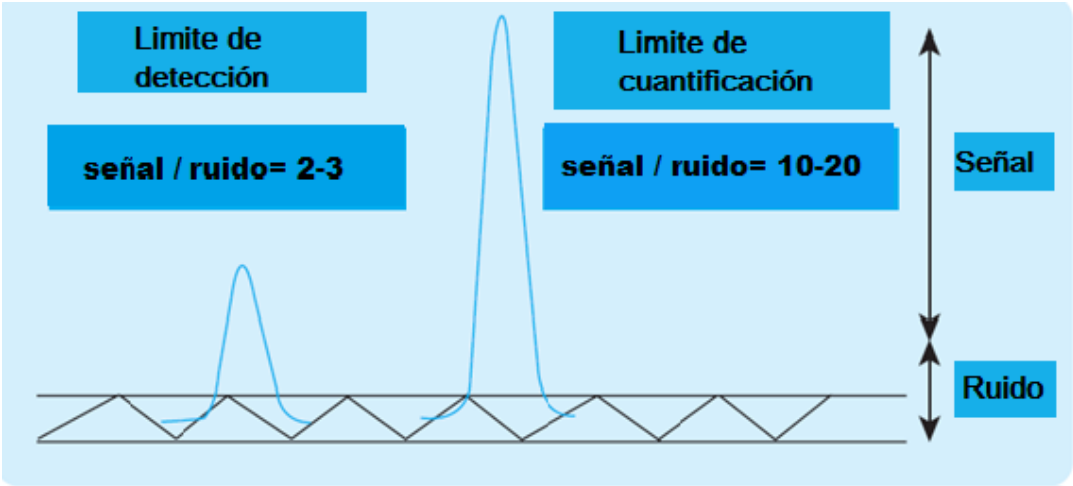


Figura 2.2. Esquema de la determinación de los límites de detección y cuantificación.

2.3.5. Robustez

Para el análisis de robustez se utilizó la mezcla de α-etinilestradiol y β-estradiol y se analizó en los equipos Agilent 1260 y Beckman Gold, con el mismo método cromatográfico. Posteriormente se calculó el desempeño del sistema como se describen a continuación:

Factor de capacidad (k'): Se interpreta como el número de volúmenes de fase móvil necesarios para eluir un compuesto después del volumen inicial contenido en la columna (t_0). Este factor determina la retención de un soluto y se calcula como:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \tag{12}$$

donde t_r es el tiempo de retención del soluto y t_o es el tiempo muerto.

Selectividad: El factor de separación (α) es el cociente entre los factores de capacidad (k') de un par de picos. Si no existe separación, α es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación.

$$\propto = \frac{k'_2}{k'_1} \tag{13}$$

Eficiencia: Es un indicador del ensanchamiento de un pico durante la separación. La eficiencia se refleja en el número de platos teóricos (N) de la columna en donde se realiza la separación cromatográfica, calculada por:

$$N = 16\left(\frac{t_R}{w}\right)^2 \tag{14}$$

donde w es el ancho del pico en la base. La altura de equivalente de plato teórico H, se calcula:

$$H = \frac{L}{N} \tag{15}$$

Resolución (R): Es una medida de la separación de los componentes de una muestra en función de la eficiencia de la columna. Este parámetro se calcula con la ecuación:

$$\mathrm{R} = \frac{2\,(t_2 - t_1)}{w_2 - w_1} \qquad (16)$$

2.4 Caracterización del adsorbente.

El adsorbente fue un producto carbonáceo obtenido a partir de desechos agroindustriales de semilla de guayaba a 1000° C por 5 horas activado con ácido fosfórico a 50° C por un lapso de 1 hora.

2.4.1 Punto de carga cero (pH_{pzc})

Se preparó una disolución de NaCl 0.01 M. Se colocaron 30 mL de solución en 6 vasos de precipitados y se ajustó el pH con NaOH o HCl 0.1M a valores comprendidos en el intervalo de 2 a 12 unidades (pH_i). De las disoluciones con el pH ajustado se tomaron 30 mL y se colocaron en matraces Erlenmeyer con 0.1 g de muestra y se mantuvieron en agitación durante 24 h. Se filtró y se midió el pH final (pH_f) de la disolución. El pH_{pzc} es el punto donde la curva pH_f es intersecada por la recta pH_i ($pH_i = pH_f$).

2.4.2 Isotermas de adsorción de nitrógeno

Se obtuvieron isotermas de adsorción de nitrógeno a 77 K por el carbón utilizado en los experimentos de adsorción. Las muestras fueron previamente desgasificadas a 300ºC durante 24 horas. Se utilizó un equipo automático Autosorb1\Quantachrome para el análisis. El tamaño de partícula del adsorbente carbonáceo fue de 0.707 mm.

2.5 Experimentos de adsorción

Se empleó el método de adsorción estática con carbón de semilla de guayaba en una relación masa-volumen de 0.033 mg L^{-1} de disoluciones del medicamento Perlutal® que contiene Acetoféníd o de Algestona y Enantato de Estradiol. La concentración inicial de Algestona fue de 12.5 mg L^{-1} y de Estradiol 0.83 mg L^{-1}. Se monitoreó la concentración en el intervalo de 0 a 120 minutos para la cinética. La

isoterma de adsorción se estudió el intervalo de concentración de 1-12.5 mg L^{-1} para Algestona y de 0.06-0.83 mg L^{-1} para Estradiol con el mismo tiempo de equilibrio. La temperatura se mantuvo constante a 25ºC. Para separar la disolución en equilibrio se emplearon filtros PTFE de 0.45 µm. Las cuantificaciones cromatográficas se obtuvieron con el método descrito en la Tabla 2.1.

Las concentraciones de equilibrio se obtuvieron a partir del área bajo la curva de los picos cromatográficos de la disolución de Perlutal y la curva de calibración correspondiente.

La cantidad adsorbida se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$a = \frac{V(C_0 - C_f)}{m} \qquad (17)$$

donde a es la cantidad adsorbida (mg g^{-1}), V es el volumen (L) en contacto con el adsorbente, m es la masa del adsorbente (g), C_0 y C_f son las concentraciones iniciales y final de las disoluciones.

CAPÍTULO III
RESULTADOS.

3.1 Validación de método cromatográfico.

Los parámetros necesarios para que un método cromatográfico sea validado son: selectividad, linealidad, precisión, exactitud, sensibilidad y robustez.

En este trabajo se realizó la validación de dos métodos cromatográficos; uno para analizar el medicamento Estronol® y otro para separar la mezcla de los estrógenos α-etinilestradiol y β-estradiol.

3.1.1. Selectividad.

Selectividad es la capacidad de un método analítico para medir exacta y específicamente el analito sin interferencias de impurezas, productos de degradación o excipientes que pueden estar presentes en la muestra. En la Figura 3.1 a) se observa el cromatograma de Estronol® que tiene como principios activos progesterona y benzoato de Estradiol que fueron inyectados como estándares para la identificación y cuantificación. Se observa un pequeño pico a un t_R de 3.5 minutos que no corresponde con los componentes y puede deberse a la antigüedad del medicamento en el almacén.

En la Figura 3.1 b) se muestra la separación cromatográfica del α-etinilestradiol y β-estradiol. En ambos casos el método empleado es selectivo para cada una de las mezclas. Se evaluó el desempeño del sistema que se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1.Desempeño del sistema en los estrógenos.

Parámetros	Estronol®			Mezcla modelo de estrógenos		
	Progesterona	Benzoato de Estradiol		α-etinil estradiol	β-estradiol	
k´	2	3.2		2.4	2.06	
α			1.6			1.2
R			5.4			8
N (m^{-1})			28052			11738
H (µm)			0.0021			0.0051

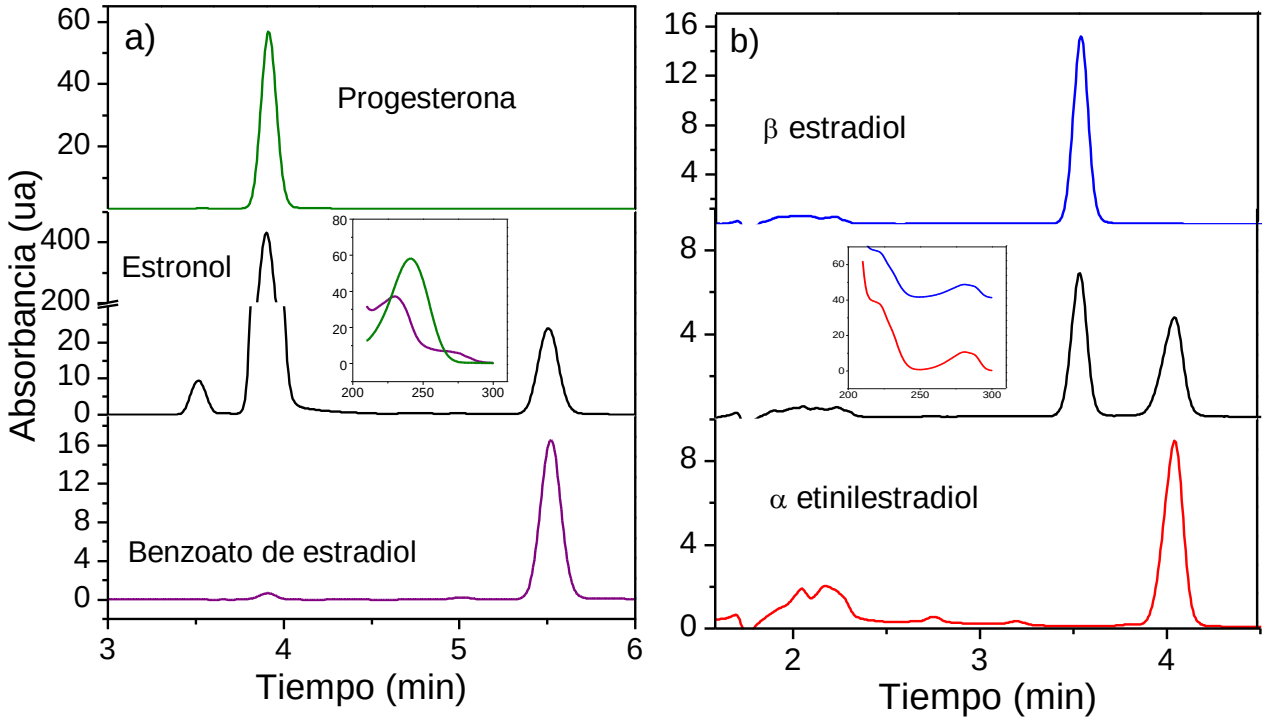


Figura.3.1 Cromatograma de muestras y estándares de a) Estronol®, b) mezcla modelo de α-etinilestradiol y β-estradiol. Espectros UV-Vis de los componentes de las mezclas en el recuadro pequeño.

3.1.2. Linealidad.

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta. En la figura 3.2. Se muestran curvas de calibración de los estrógenos analizados de a) Benzoato de Estradiol y progesterona b) α-etinilestradiol y β-estradiol. En la Tabla 3.2 se muestran los parámetros estadísticos que se obtuvieron como resultado de la regresión lineal de los datos.

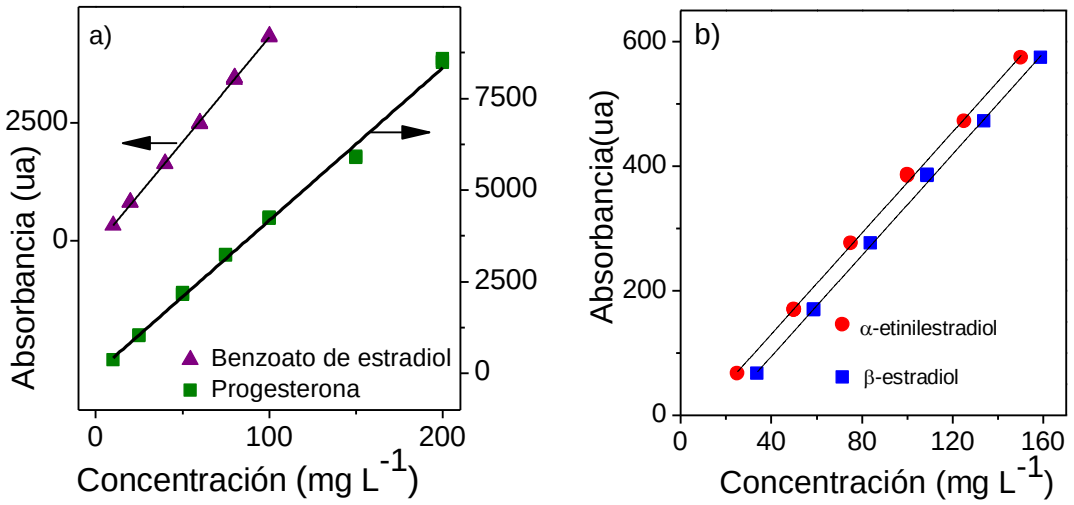


Figura 3.2. Curva de calibración de los componentes de a) Estronol® y de b) la mezcla modelo de estrógenos.

Además se realizó la prueba de Student de linealidad donde se comparó el valor estadístico experimental t_r (ecuación 2) con el estadístico de tablas para 95% de confianza $t_{(5,18)}$=1.734. Dado que $t_r > t_{tabla}$, se comprobó la linealidad entre el área de los picos cromatógraficos y la concentración en los intervalos de la curvas de calibración.

Tabla 3.2. Parámetros estadísticos de linealidad.

	Estronol®		Mezcla modelo de estrógenos	
Parámetros	Progesterona	Benzoato de Estradiol	α-etinil estradiol	β-estradiol
Ecuación	A=41.65C+7.42	A=44.23C-114.96	A=4C-31.02	A=3.8C-6.91
r^2	0.995	0.999	0.999	0.992
t_r	120	110	115	112

A: área del pico cromatográfico, C: concentración.

3.1.3. Precisión.

Con las ecuaciones (3) y (4) se determinaron los parámetros de precisión que se muestran en la tabla 3.3. Para todos los compuestos el RSD es menor a 2% esto indica que el método es repetible, reproducible y cumple con lo especificado en la FEUM [3]. Para todos los casos el número de datos fue n=6 y ninguno de ellos quedó fuera de los límites de confianza para cada estrógeno.

Tabla 3.3 Precisión del método para cada uno de los estrógenos.

	Estronol®		Mezcla de estrógenos	
Parámetros	Progesterona	Benzoato de Estradiol	α-etinil estradiol	β-estradiol
Media $\bar{X}$ (mgL^{-1})	91.6	55.1	10.4	11.9
Desviación estándar (s)	1.58	0.10	0.20	0.12
RSD (%)	1.73	0.19	1.94	0.19
Intervalo de confianza del 99.7% (mgL^{-1})	87.4<μ>93.1	54.9<μ>55.3	10.11<μ>10.73	11.73<μ>12.2

3.1.4. Exactitud.

Exactitud es la cercanía de los resultados de la prueba al valor aceptado como verdadero. En la Tabla 3.4 se muestran los datos obtenidos con las ecuaciones 8 y 9. Con los valores de porcentaje de recuperación y t_{ob} se comprueba que el método es exacto porque cumple con el criterio $t_{ob}<t_{tabla}$ que determina la certeza de los datos. El porcentaje de recuperación aceptado es de 100 ± 2% y todos los casos cumplieron con este requisito.

Tabla 3.4. Parámetros para evaluar la exactitud del método cromatográfico.

	Estronol®		Mezcla modelo de estrógenos	
Parámetros	Progesterona	Benzoato de Estradiol	α-etinil estradiol	β-estradiol
s	1.80	1.70	0.95	0.86
RSD	1.70	1.70	0.96	0.87
%Recuperación	99.80	100.70	100.64	100.41
t_{ob}	0.35	1.23	2	1.41

3.1.5. Sensibilidad.

La sensibilidad de un método corresponde a la mínima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. En la Tabla 3.5 se muestra las variables empleadas para la calcular de los límites de cuantificación y detección de diferentes compuestos utilizando las ecuaciones (10) y (11).

Tabla 3.5. Determinación de la sensibilidad de los métodos para análisis de estrógenos.

	Estronol®		Mezcla de estrógenos	
Parámetros	Progesterona	Benzoato de Estradiol	α-etinil estradiol	β-estradiol
Ecuación de regresión	A=41.6C+7.4	A=44.2C-114.9	A=4C-31.0	A=3.8C-6.9
Y_{bl}	437	317	0.261	0.281
s_{bl}	2.72	0.827	0.010	0.050
Límite de detección ($\mu g \cdot L^{-1}$)	10.7	7.22	0.72	0.11
Límite de cuantificación ($\mu g \cdot L^{-1}$)	11.10	7.37	0.90	0.20

A: área del pico cromatográfico, C: concentración.

3.1.5. Robustez.

La robustez es el grado de reproducibilidad de los resultados obtenidos del análisis de las muestras bajo diversas condiciones. Un método analítico es robusto cuando proporciona resultados con presión y exactitud aceptables en condiciones de trabajo ambientales y/o analíticas diferentes. Manifiesta la influencia que tienen pequeñas alteraciones en el método de análisis sobre los resultados.

En la tabla 3.6 se comparó el desempeño del sistema para α-etinil estradiol y β-estradiol en dos diferentes equipos HPLC. Las diferencias en los parámetros α, R, H, N no son significativos. La FEUM [36] menciona que el valor de k´ en un método

analítico validado debe ser ≥ 2.0. Para el α-etinilestradiol y β-estradiol este parámetro no se cumple en el equipo Beckman Gold.

Sin embargo, se puede señalar que el método es robusto y además presenta tolerancia, es decir que no es alterado por cambios internos y/o externos como el cambio de equipo.

Tabla 3.6 Parámetros para evaluar la robustez de los métodos cromatográficos utilizado en la separación de α-etinilestradiol y β-estradiol.

Parámetros	HPLC Beckman Gold		HPLC Agilent 1260	
	α-etinil estradiol	β-estradiol	α-etinil estradiol	β-estradiol
k´	0.78	1.3	2.4	2.06
α	1.6		1.2	
R	7.9		8	
N (m^{-1})	36512		11738	
H (µm)	0.02		0.0051	

3.2 Adsorción de Perlutal® en carbón

En la Figura 3.3 se muestra la isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno a 77K del carbón utilizado como adsorbente. Es una isoterma tipo I, es cóncava con respecto al eje presión relativa y se eleva abruptamente a presiones relativas bajas debido al llenado de microporos y alcanza una meseta a cantidad adsorbida por unidad de masa de sólido, se acerca a un valor límite que refleja ausencia de multicapas sobre la superficie sólida.[37].

La superficie específica fue de 202 m^2 g^{-1} y una superficie de microporo de 119 m^2 g^{-1}. El diámetro medio de poro fue de 2.7 nm, que corresponde a mesoporos (obtenido con el método BJH) y se observa una distribución de tamaño de poro unimodal (Fig. 1b) [38]. Presenta un ciclo de histéresis del tipo H4 que se asocia a poros estrechos en forma de hendidura. El pH_{pzc} del adsorbente fue de 7.0.

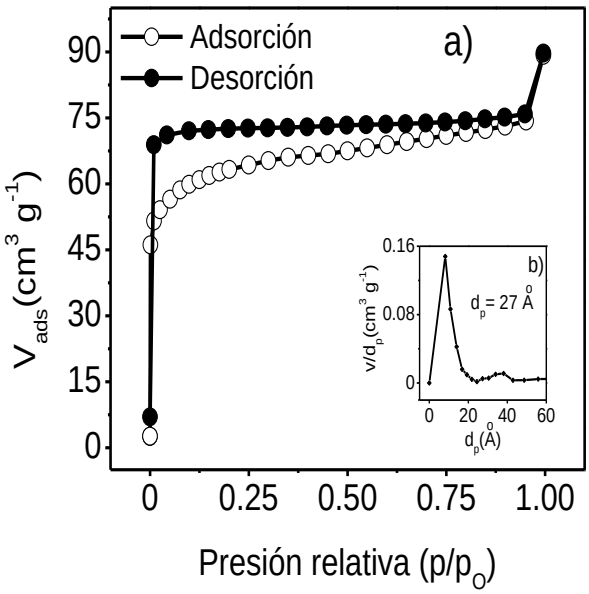


Figura 3.3 a) Isoterma de adsorción de N_2 a 77K del carbón. b) Distribución del tamaño de poro.

La Figura 3.4 muestra el cromatograma de una muestra de (a) Perlutal®. Para la confirmación de la identidad de cada uno de los picos principales, se extrajeron los espectros UV (b).

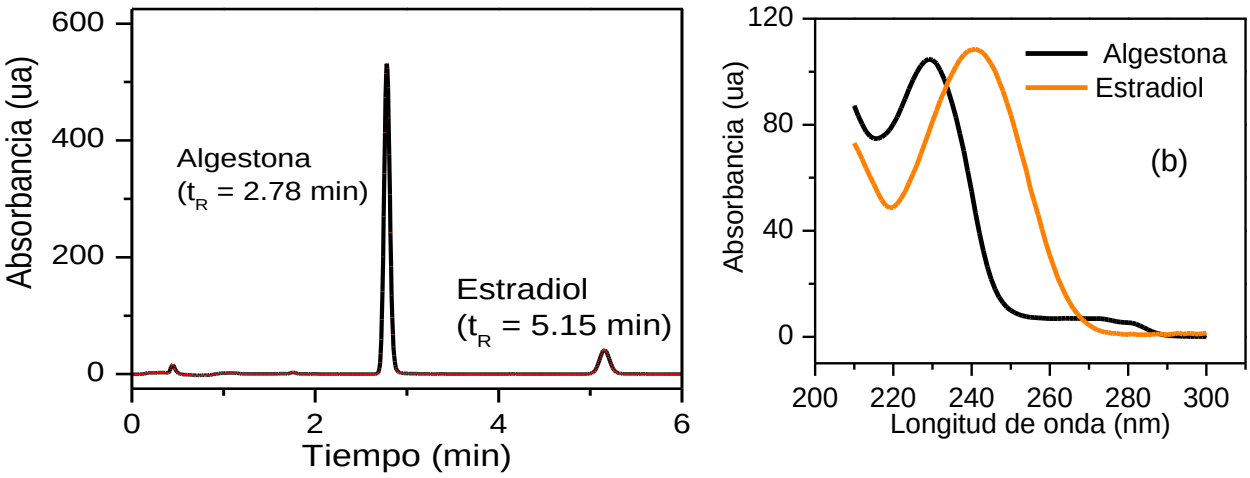


Figura 3.4 (a) Cromatograma DAD-HPLC de una disolución acuosa de Perlutal®, (b) espectros UV de los picos correspondientes a Algestona y Estradiol.

En la figura 3.5 se muestra la cinética de adsorción para de Algestona y Estradiol. El orden de la cinética para ambos compuestos fue de *pseudo* primer orden, con un valor de $k_{1=}$1.32 min^{-1} para Algestona y k_1=1.02 min^{-1} para Estradiol. Aunque la Algestona se encuentra en una concentración 15 veces mayor, la velocidad de adsorción es similar para ambos.

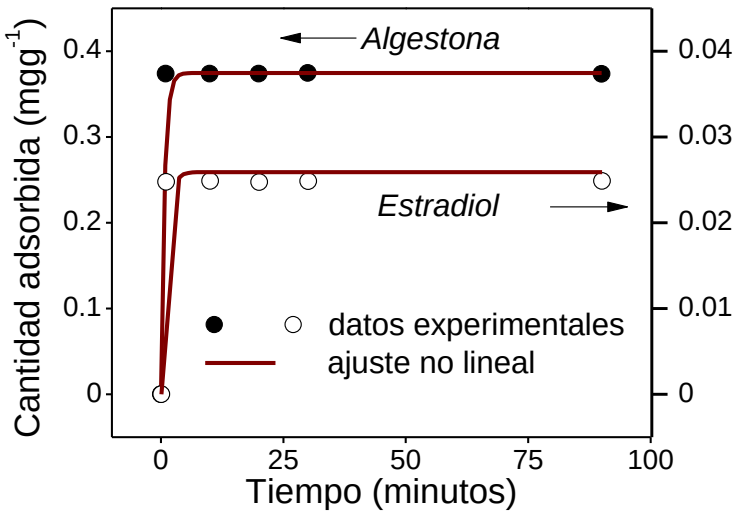


Figura 3.5 Cinética de adsorción de a) Algestona, b) Estradiol.

En la figura 3.6 se muestran las isotermas de Algestona y Estradiol, la cantidad adsorbida depende de la concentraciónes de los compuestos. Los datos se ajustaron a la ecuación de Henry, con un valor de k_H=0.0299 min^{-1} para Algestona y k_H=0.0298 min^{-1} Estradiol 0.0298 min^{-1}. El porcentaje de adsorción fue de 99%. Por la baja solubilidad de Perlutal® en agua, no se aumentó la concentración inicial para alcanzar la saturación en la superficie del carbón.

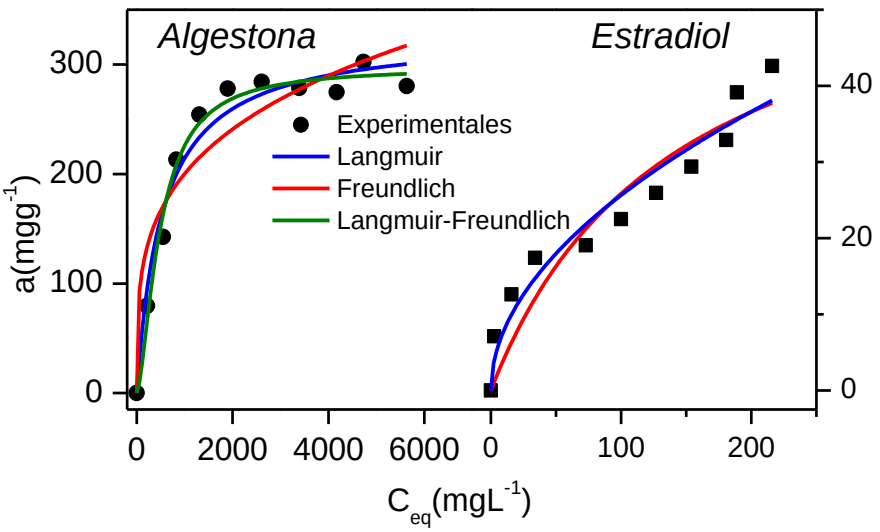


Figura 3.6 Isoterma de adsorción de Algestona y Estradiol sobre carbón.

3.3 Análisis de productos de degradación de Estronol®.

La caducidad es definida por la NOM-073-SSA1-2005 (Estabilidad de fármacos y medicamentos) como la fecha que indica el fin del periodo de vida útil del medicamento. También es considerada como el periodo de tiempo durante el cual el medicamento mantiene un mínimo del 90% de principio activo sin que se aprecien modificaciones fisicoquímicas y microbianas [38].

La luz, humedad, temperatura y tiempo son los principales agentes causantes de la degradación de un medicamento. Los mecanismos más comunes son la hidrólisis, oxidación y descomposición fotoquímica entre otros.

Específicamente los estrógenos pueden estar presentes en el ambiente como contaminante hasta más de 20 años [40]. En la figura 3.8 se muestra el cromatograma de Estronol®, con 20 años de antigüedad. Se pudieron observar 7 picos que fueron analizados con un detector QTOF-MS para conocer sus respectivas masas y proponer los posibles productos de degradación de los principios activos de Estronol®, benzoato de Estradiol y progesterona, que se muestran en la Tabla 3.7.

El pico 1 es un subproducto de la progesterona con pérdida de dos grupos carbonilo y metilo. La molécula esta reportada en la bibliografía como precursora de la síntesis del principio activo [41]. El pico 2 tiene dos masas, una de ellas pertenece a progesterona y la otra (2a) es un derivado de ella producto de una reducción del grupo carbonilo,

mientras la especie observada en el pico número 3 pierde un metilo en la posición C-18.

La masa del benzoato de Estradiol fue encontrada en el pico número 4. En el mismo pico se detectó la masa de 399 (4a) que es un producto de la pregnenolona usada para obtener el principio activo [42].

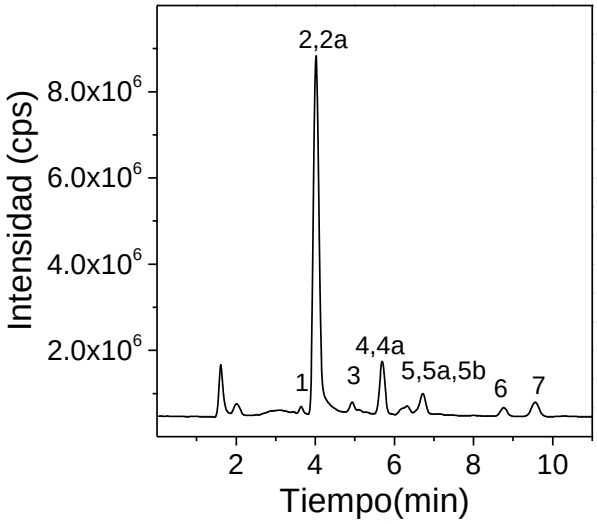


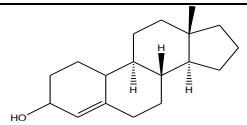
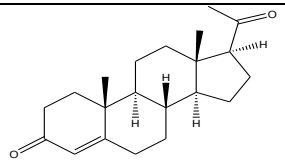
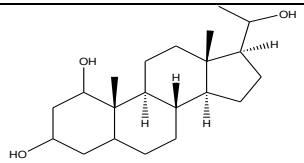
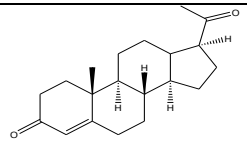
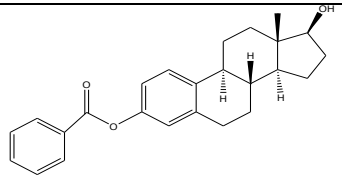
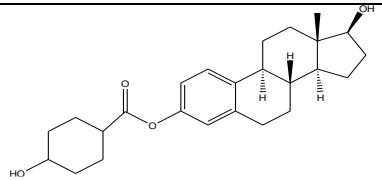
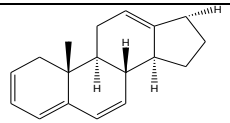
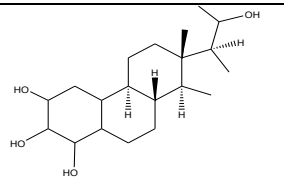
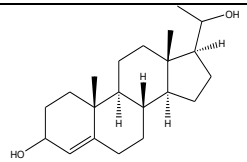
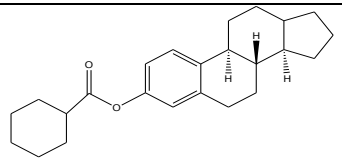
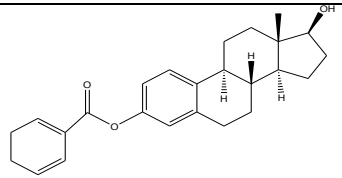
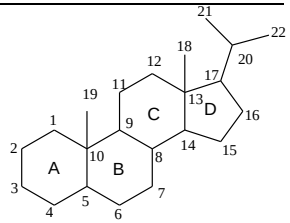
Figura 3.8. Cromatograma de Estronol® en el análisis HPLC-MS.

Para el pico número 5 se observaron tres masas, la primera de ellas es 10-Metil-17-octahidro-1H-ciclopentanofenantreno (5) precursor de hormonas sintéticas y naturales el cual es un derivado de la estrona [43]. Las otras dos masas (5a, 5b) se propone que son subproductos de la progesterona, con la apertura del ciclopentano, reacciones de hidratación en las posiciones C-2, C-3 y C-4 (5a) y reducción en los carbones C-3, C-20 (5b)

Se propone que el pico 6 es derivado del benzoato de Estradiol con la pérdida de un grupo metilo, hidroxilo y pérdida de aromaticidad del sustituyente benzoato. El pico 7 tiene la masa de un producto que es utilizado para la síntesis del benzoato de Estradiol con la ayuda de una hidrólisis catalítica [42].

Se puede observar que en todos los productos se conserva el ciclo-pentanoperhidrofenantreno o sus derivados. Esta estructura es la molécula principal de la síntesis de estrógenos, es muy estable y permanece en el ambiente hasta 20 años sin degradarse totalmente [8].

Tabla 3.7. Posibles productos de degradación de benzoato de Estradiol (pico 4) y progesterona (pico 2) determinados por HPLC-QTOF-MS ionización en modo positivo.

Estructura				
Pico	1 [41]	2 progesterona	2a	3
t_r (min)	3.6	4.0		4.9
Fórmula	$C_{18}H_{28}O$	$C_{21}H_{30}O_2$	$C_{21}H_{36}O_3$	$C_{20}H_{28}O_2$
$m/z_{calculada}$	261.1313	315.2339	337.2137	301.1462
$m/z_{experimental}$	261.1305	315.2339	337.2139	301.1409
Estructura				
Pico	4 benzoato de Estradiol	4a [42]	5 [41]	5a
t_r (min)	5.6		6.3	
Fórmula	$C_{25}H_{28}O_3$	$C_{25}H_{34}O_4$	$C_{18}H_{22}$	$C_{20}H_{36}O_4$
$m/z_{calculada}$	377.2111	399.1876	239.1504	341.2689
$m/z_{experimental}$	377.2117	399.1939	239.1494	341.2661
Estructura				
Pico	5b	6	7 [42]	
t_r (min)	6.3	8.7	9.5	
Fórmula	$C_{21}H_{34}O_2$	$C_{24}H_{32}O_2$	$C_{25}H_{30}O_3$	
$m/z_{calculada}$	319.2832	353.2575	353.2575	
$m/z_{experimental}$	319.2841	353.2564	353.2516	Esquema general

Los números en los corchetes indican la referencia donde se han identificado productos de degradación.

CAPÍTULO IV.
CONCLUSIONES.

- El método analítico desarrollado y validado permitió la determinación de estrógenos presentes en fármacos comerciales.

- El método analítico demostró ser robusto para el análisis de 6 estrógenos con una metodología de extracción que reduce tiempos y costos.

- La adsorción con carbón activado obtenido a partir de residuos agrícolas es una alternativa efectiva y de bajo costo para la eliminación de estrógenos en agua que llegan a los ecosistemas acuáticos de manera indiscriminada.

- Los probables compuestos de degradación identificados son producto de reacciones de reducción, hidratación y pérdida de grupos metilo, el núcleo causante de los efectos toxicológicos el (ciclopentanoperhidrofenantreno) se conserva después de 20 años de antigüedad.

- La metodología de adsorción podría aplicarse a efluentes específicos con alto contenido de estrógenos, como es el caso de las industrias avícolas.

- La metodología de análisis cromatográfico desarrollada puede aplicarse a la cuantificación de estrógenos en aguas residuales que no está reportada en nuestro país.

CAPITULO IV.

BIBLIOGRAFIA.

[1] E. Estrada-Arriaga, P. Mijaylova-Nacheva, G. Moeller-Chavez, N. Ramírez-Salinas, M. Sánchez-Zarza, Presencia y tratamiento de compuestos disruptores endócrinos en aguas residuales de la Ciudad de México empleando un biorreactor con membranas sumergidas, Ingeneria investigación y tecnología, 14 (2013) 276-282.

[2] O.A. Quattrocchi, S.I. Aberaira, R.F. Laba Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica, Artes Graficas Farro SA, Buenos Aires (1992).

[3] R.A. Genaro, Remington Farmacia Tomo 1, Médica Panamericana S.A., Barcelona (2003).

[4] A.C. Calpena, Validación de los métodos analíticos, Médica Panamericana S.A., Valencia (1991).

[5] S.E. Kolthoff, E.B. Sandell, Tratado de química analítica cuantitativa, Revolucionaria, La Habana (1966).

[6] M.D. Hernando, M. Mezcua, M.J. Gómez, O. Malato, A. Agüera, A.R. Fernández-Alba, Comparative study of analytical methods involving gas chromatography–mass spectrometry after derivatization and gas chromatography–tandem mass spectrometry, 1047 (2004) 129–135.

[7] R.L. Pérez, G.M. Escandar, Liquid chromatography with diode array detection and multivariate, ANAL CHIM ACTA , 835(2014) 19-28.

[8] H. Hamid, C. Eskiaoglu, Fate of estrogenic hormones in wastewater and sludge treatment: a review of properties and analytical detection techniques in sludge matrix, WATER RES,46 (2012) 5813–5833.

[9] B.L. Karger, An introduction to separation science, John Wiley and Sons, Canada (1973).

[10] F.E. Kegnier, HPLC of Biological Macromolecules: The first decada, Chromatographia, 24 (1987) 35-53.

[11] L.S. Rams, High Performance Liquid Chromatography, John Wiley and Sons: UK (2002).

[12] L. Nyder, Practical HPLC method development, John Wiley and Sons, California (2007).

[13] B. Castillo, R. Gonzáñez-Hernández, Validation protocol of analytical methods for finished pharmaceutical products. ATP Pharma Practique, REV CUB FARM, 30 (1996) 197-202.

[14] Norma Oficial Mexicana NOM-059-SSA1-2013, Buenas prácticas de fabricación de medicamentos, Diario Ofical de la Federación.

[15] Convention United States Pharmacopeia, USP XXII.

[16] L. Bruton, B. Chabner, B. Knollman, Goodman and Gilman´s las bases farmacológicas de la terapéutica, MacGraw-Hill.Interamericana, Valencia (2000).

[17] A.P. Arnorld, R.A. Gorski, Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system, ANN REV NEUROSCI, 7 (1984) 413-442.

[18] P. Lorenzo, A. Moreno, I. Lizasoain, J.C. Leza, M.A. Moro, A. Portales, Vélazquez Farmacología Básica y Clínica, Médica Panamericana, Buenos Aires (2008).

[19] J.L. Ezpinoza, M.E. Hernández, G.E. Aranda, F. Rojas, J. Manzo, G. Coria, C. Yerena-Aguilar, A.H. Soto-Cid, El papel de los estrógenos y sus receptores en la prevención y promoción de enfermedades proliferativas de la glándula prostática, ANN REV NEUROBIO, 48 (2013) 20-25.

[20] R.J Handa, T.R. Pak, A.E. Kudwa, T.D. Lund, L. Hinds, An alternate pathway for androgen regulation of brain fuction: Activation of estrogen receptor beta by the metabolite of dihydrotestosterone, 5α-androstane-3β,17β-diol, HORM BEHAV, 53(2008) 441-752.

[21] Organización Muldial de la Salud, Recomendaciones sobre prácticas seleccionadas para el uso de anticonceptivos,OMS,92 (2008) 7-12.

[22] Instituto Mexicano del Seguro Social, Cuadro Básico de Medicamentos, Distrito Federal (2012).

[23] Comité de Farmacopeas Europeas, Estrategia comunitaria en materia de alteradores endocrinos (Sustancias de las que se sospecha interfieren en lo sistemas hormonales de seres humanos y animales), Bruselas (1999).

[24] M.J. Peterson, F.S. Vom, T. Benson, K. Belcher, S. Colborn, T. Chahound, I. Crain, D. Andrew, F. Guillette, Endocrine disrupting chemicals: A challenge for the EU, ENVIRON HEALTH PERSP, 117 (2009) 309-315.

[25] M. Auriol, Y. Filali-Meknassi, R.D. Tyagi, C.D. Adams, R.Y. Surampail, Endocrine disrupting compounds removal from wastewater, a new challenge, PROCESS BIOCHEM, 41 (2006) 529-539.

[26] N. Shappell, Egg wash wastewater: estrogenic risk or environmental asset?, Integr Environn Assess Manag, Biosciences Research,18 (2013) 517-523.

[27] N.A Ashford, C.S. Miller, Low-Level Chemical Exposures: A Challenge for Science and Policy Environ, Viewpoint, 208 (1998) 32-39.

[28] A.M. Soto, C.L. Michaelson, N.V. Prechtl, B.C. Weill, C. Sonnenschein, F. Orea-Serrano, N. Olea, Assay to measure estrogen and androgen agonist and antagonists, MED BIOL, 444 (1998) 9-23.

[29] T. Colborn, F.S. Vom, A.M. Soto, Development effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, ENVIRON HEALTH PERSP,102 (1993) 78-84.

[30] J.A. McLachan, Functional toxicology: a new approach to detect biologically active xenobiotics, ENVIRON HEALTH PERSP,101 (1993) 386-397.

[31] T. Colborn, C. Clement, Chemically-induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/Human Connection, PRIN SCI PUBL, 21 (1992) 24-32.

[32] R. Hertz, The estrogen problem-retrospect and prospect, in estrogens in the environment II-influences on developement, Horth Holland,34 (2005) 1-11.

[33] S.P. Verna,B.R. Goldin, P.S. Lin, The inhibition of estrogenic effects of pesticides and environmental chemicals by curcumin and isoflavonoids,» ENVIRON HEALTH PERSP, 106 (1998) 7-12.

[34] G.N Nikov, N.E. Hopkins, S. Boue, W.L. Alworth, Interactions of dietary estrogens with human estrogen receptors and the effect on estrogen receptor-estrogen response element complex formation, Environ Health Perspect, 108 (2001) 67-72.

[35] F. Martín, El carbón vegetal propiedades y Obtención, Agroguías mundi prensa, Sevilla (2012).

[36] Famacopea de los Esados Unidos Mexicanos XI, Secretaría de salud, (2014)

[37] S. Lowell, J.E. Shields, M.A. Thomas, M. Thommes, Characterization of porous solids and powders: Surface area, pore size and density, Springer ,Florida (2006).

[38] J.M. Martín-Martínez, Adsorción física de gases y vapores por carbones, Espagrafic, Alicante (1990).

[39] Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de Medicamentos, Diario Oficial de la Federación.

[40] T.P. Carreño, Estrogenos Ambientales ¿Feminización Masculina?, RACVAO, 10 (1997) 39-66.

[41] A.Z. Gómez, Caracterización y determinación de bisfenol a compuestos relacionados en muestras ambientales y fluidos biólogicos por espectrofluorometría y cromatográfia gases-espectrometría de masas, CHEMICAL ABSTRACT, 70 (2001) 69-82.

[42] J.F. Bruzón, Validación de un método para la determinación de 19-norandrosterona en orina humana por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas de Trampa de Iones, *CENIC,* 35 (2004) 59-68.

[43] J.G. Aceituno, Nuevas metodologías analíticas basadas en el empleo de sílices mesoporosas y polímeros de impronta molecular para el análisis de disruptores endocrinos en alimentos, CENIC, 80 (2014) 80-109.

ANEXOS

A1. Reactivos utilizados en el presente trabajo.

Reactivo	Marca	Pureza
Acetonitrilo	Honeywel	Grado HPLC
Ácido clorhídrico	MERCK	0.1 N
Ácido acético	BAKER ANALYZED	99.8%
Agua	HERCOTEC	Agua grado tridestilada
α-etinilestradiol	SIGMA-ALDRICH	98%
17 β-estradiol	SIGMA-ALDRICH	98%
Benzoato de Estradiol	Intercontinental de medicamentos	98%
Cloruro de sodio	MERCK	0.1 N
Estronol®	Intercontinental de medicamentos	100%
Hidróxido de sodio	MERCK	0.1 N
Metanol	Honeywel	Grado HPLC
Nitrógeno líquido	NITRO-GEN	100%
Perlutal®	Boehringer Ingelheim	100%
Progesterona	Intercontinental de medicamentos	98%

A2. Equipos utilizados en el presente trabajo.

Equipo	Marca	Modelo
AUTOSORB-1	Quantachrome (USA)	AS1C-RGA-2
Columna cromatográfica	phenomenex	Synergi 4u Fusion-RP 80A
HPLC	Beckman (GER)	System Gold WELL2262
HPLC	Agilent (USA)	6525 Q-TOF-MS
Termostato	SEV (MEX)	mLw 16
Titulador potenciométrico	Beckman (GER)	Titrando 809

A3. Cálculos para la obtención de la precisión del método cromatográfico para los diferentes estrógenos.

Progesterona

Dato	Concentración	Dato	Concentración
1	91.55	4	92.06
2	91.17	5	92.18
3	91.31	6	87.51

Numero de datos (n)	6
Media $\bar{X}$	91.65
Desviación estándar (*s*)	1.58
RSD	1.73
Intervalo de confianza del 99.7% de la media	87.4 $\bar{X}$ 93.14

Benzoato de estradiol

Dato	Concentración	Dato	Concentración
1	55.32	4	55.11
2	55.16	5	55.15
3	55.03	6	55.00

Numero de datos (n)	6
Media $\bar{X}$	55.13
Desviación estándar (*s*)	0.1
RSD	0.19
Intervalo de confianza del 99.7% de la media	54.9 $\bar{X}$ 55.3

α-etinilestradiol

Dato	Concentración	Dato	Concentración
1	10.20	4	10.59
2	10.22	5	10.71
3	10.44	6	10.20

Numero de datos (n)	6
Media $\bar{X}$	10.39
Desviación estándar (*s*)	0.20
RSD	1.94
Intervalo de confianza del 99.7% de la media	10.11 $\bar{X}$ 10.73

β-estradiol

Dato	Concentración	Dato	Concentración
1	11.75	4	11.96
2	11.83	5	12.11
3	11.96	6	11.80

Numero de datos (n)	6
Media $\bar{X}$	11.90
Desviación estándar (*s*)	0.12
RSD	0.193
Intervalo de confianza del 99.7% de la media	11.73 $\bar{X}$ 12.2

A4. Cálculos para la obtención de la exactitud del método cromatográfico para los diferentes estrógenos.

Progesterona

Concentración real (mgL^{-1})	Concentración hallada (mgL^{-1})			%Recuperación		
45	46.0	46.1	49.8	102.2	102.4	102.2
55	54.9	54.8	54.4	99.8	99.7	99.0
70	68.5	68.5	68.6	97.8	97.9	98.0
$t_{ob}\frac{\lvert 100-99.8\rvert\sqrt{9}}{1.7}=0.35$			$t_{ob} < t_{tabla}$ (0.35<2.036)		R	99.8
					s	1.8
					RSD	1.7

Benzoato de estradiol

Concentración real (mgL^{-1})	Concentración hallada (mgL^{-1})			%Recuperación		
75	74.8	75.7	75.3	99.8	101.0	100.4
90	88.0	89.8	90.2	97.8	99.7	100.2
100	100.3	102.9	104.0	100.3	102.9	104.0
$t_{ob}\frac{\lvert 100-100.7\rvert\sqrt{9}}{1.7}=1.23$			$t_{ob} < t_{tabla}$ (1.23<2.036)		R	100.7
					s	1.7
					RSD	1.7

α-etinilestradiol

Concentración real (mgL^{-1})	Concentración hallada (mgL^{-1})			%Recuperación		
80	79.26	80.02	80.09	99.07	100.03	100.11
100	99.80	100.69	102.22	99.80	100.69	102.22
120	120.79	122.16	121.70	100.65	101.80	101.42
$t_{ob}\frac{\lvert 100-100.64\rvert\sqrt{9}}{0.96}=2$			$t_{ob} < t_{tabla}$ (2 <2.036)		R	100.64
					s	0.95
					RSD	0.96

β-estradiol

Concentración real (mgL^{-1})	Concentración hallada (mgL^{-1})			%Recuperación		
90	89.28	90.51	89.25	99.20	100.57	99.17
110	110.93	111.16	111.57	100.84	101.05	101.429
130	130.57	129.30	131.93	100.43	99.46	101.49

$t_{ob}\frac{\lvert 100-100.41\rvert\sqrt{9}}{0.87}=1.41 \qquad t_{ob} < t_{tabla}\ (1.41 < 2.036)$	R	100.41
	s	0.86
	RSD	0.87

A5. Cálculos para la obtención de la sensibilidad del método cromatográfico para los diferentes estrógenos.

Progesterona.

µg iny.	Área			Área media	s
100	3812.9	3797.3	3803.4	3804.5	6.41
40	2513.9	2505.8	2499.2	2506.3	6.01
10	369.9	369.4	374.1	371.13	2.10

1. Calculo de la respuesta en la concentración cero:

El análisis de la regresión tomando los valores medios del área de la recta son Y=35790X+437.82.

La estimación de la concentración cero es $Y_{bl=}$ 437.82

2. Calculo de la desviación estándar de la respuesta a la concentración cero:

Se efectuó el análisis de la regresión tomando la concentración como X y la desviación estándar como Y.

La recta calculada es Y=42X+2.72 y se toma $S_{bl=}$2.72.

Tomando como pendiente 41.65 se realizan las ecuaciones 9 y 10 para el cálculo de los límites.

Límite de detección: (437.82 + 3 · 2.72) / 41.65 = 10.7µg

Límite de cuantificación: (437.82 + 10 · 2.72) / 41.65 = 11.1µg

Benzoato de estradiol

µg iny.	Área			Área media	s
100	2447.2	2440	2435	2440.73	5.00
40	327.5	325.7	317.7	323.63	4.25
10	216.9	216.3	216.4	216.53	0.26

1. Calculo de la respuesta en la concentración cero:

El análisis de la regresión tomando los valores medios del área de la recta son Y=26.22X-317.55.

La estimación de la concentración cero es $Y_{bl=}$ 317.55

2. Calculo de la desviación estándar de la respuesta a la concentración cero:

La recta calculada es Y=0.047X+0.827 y se toma $S_{bl=}$0.827.

Tomando como pendiente 44.23 se realizan las ecuaciones 9 y 10 para el cálculo de los límites.

Límite de detección: (317.55 + 3 · 0.827) / 44.23 = 7.22µg

Límite de cuantificación: (317.55+ 10 · 0.827) / 44.23 = 7.37µg

α-etinilestradiol

µg iny.	Área			Área media	s
25	38.5	38.3	38.8	38.5	0.205
2.5	3.3	3.3	3.3	3.3	4.49E-16
0.5	0.79	0.86	0.76	0.79	0.042

La estimación de la concentración cero es $Y_{bl=}$ 0.2616 y de desviación estándar cero es $S_{bl=}$0.0106.

Límite de detección: (0.2616+ 3 · 0.0106) / 4.06= 0.72µg

Límite de cuantificación: (0.2616+ 10 · 0.0106) / 4.06 = 0.90µg

β-estradiol

µg iny.	Área			Área media	s
25	41.6	41.5	41.7	41.6	0.081
2.5	3.8	3.7	3.6	3.7	0.0816
0.5	0.78	0.73	0.72	0.743	0.0262

La estimación de la concentración cero es $Y_{bl=}$ 0.2819 y de desviación estándar cero es $S_{bl=}$0.0508

Límite de detección: (0.2819+ 3 · 0.0508) / 3.8= 0.11µg

Límite de cuantificación: (0.2819+ 10 · 0.0508) / 3.8 = 0.20µg